



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Actividad herbicida del compuesto natural carvacrol en
malas hierbas de cereales

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ingeniería Agronómica

AUTOR/A: Izquierdo Ortín, Carmen

Tutor/a: Verdeguer Sancho, Mercedes María

Cotutor/a externo: Sánchez Moreiras, Adela María

Director/a Experimental: Torres Pagán, Natalia

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO NATURAL

MÁSTER EN INGENIERÍA AGRONÓMICA



*Actividad herbicida del compuesto natural carvacrol en malas
hierbas de cereales.*

Trabajo final de máster

Curso 23-24

CARMEN IZQUIERDO ORTÍN

TUTORA: MERCEDES VERDEGUER SANCHO

VALENCIA, septiembre de 2024

Alumna: Carmen Izquierdo Ortín

Tutor académico: Prof. Mercedes Verdeguer Sancho

Título: Actividad herbicida del compuesto natural carvacrol en malas hierbas de cereales.

Resumen:

Las malas hierbas pueden ocasionar pérdidas muy importantes en el rendimiento de los cultivos. Existen diversos métodos de control de las malas hierbas, como son métodos culturales, mecánicos y físicos, biológicos, biotecnológicos y químicos, pero desde su descubrimiento en los años 40, el uso de herbicidas ha sido el método más utilizado para el control de las malas hierbas.

Debido al uso abusivo de los herbicidas han surgido problemas en la salud humana y el medio ambiente, además de promover la aparición de biotipos de malas hierbas resistentes a herbicidas debido al uso repetido de herbicidas con el mismo modo de acción.

En el año 2009 la Unión Europea cambió la legislación sobre el uso de pesticidas, promoviendo un uso sostenible de los mismos, mediante la Directiva I2009/128/CE, del Parlamento Europeo y del Consejo, por la que se establece el marco de actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas. A través de esta directiva se fomenta la gestión integrada de plagas y de planteamientos o técnicas alternativas, como las alternativas no químicas a los plaguicidas.

Una alternativa al uso de productos químicos es el uso de productos naturales. Esta es una herramienta muy poderosa y de gran interés en el sector agrícola, que está demandando nuevas soluciones para una agricultura sostenible.

El carvacrol es un compuesto natural presente como metabolito secundario en los aceites esenciales de numerosas plantas aromáticas, como *Thymbra capitata* (L.) Cav., *Thymus vulgaris* L. y *Origanum vulgare* L., con demostrada acción herbicida.

El objetivo de este trabajo es estudiar la actividad herbicida del carvacrol en malas hierbas de cereales, tanto en ensayos in vitro como in vivo, en condiciones de invernadero, y determinar si el carvacrol produce efectos fitotóxicos en los cereales.

En los ensayos in vitro, se concluye que dosis altas de carvacrol aplicadas en *Avena fatua* L. inhibieron la germinación y dosis bajas redujeron el crecimiento, mientras que los tratamientos con DMSO y el control no mostraron diferencias significativas. En *Papaver rhoeas* L., el tratamiento con DMSO favoreció la germinación, pero no el crecimiento, y dosis altas de carvacrol inhibieron completamente la germinación.

En ensayos in vivo, la pulverización de carvacrol fue efectiva para controlar *Avena fatua*, pero la aplicación vía riego no fue eficaz. En el cultivo de trigo, dosis altas de carvacrol aplicadas por riego afectaron negativamente al cultivo.

Palabras clave: control de malas hierbas, productos naturales, cereales, carvacrol, actividad herbicida, fitotoxicidad

Valencia, septiembre de 2024

Student: Carmen Izquierdo Ortín

Academic tutor: Mercedes Verdeguer Sancho

Title: Herbicidal activity of the natural compound carvacrol in weeds of cereals.

Abstract:

Weeds can cause significant losses in crop yields. There are different weed control methods, such as cultural, mechanical and physical, biological, biotechnological and chemical methods, but since its Discovery in 1940, the use of herbicides has been the most widely used method for weed control.

The overuse of herbicides has caused problems in human health and the environment and has promoted the development of herbicide-resistant weed biotypes due to the repeated use of herbicides with the same mode of action.

In 2009, the European Union changed the legislation on the use of pesticides, promoting their sustainable use, through Directive 2009/128/EC, of the European Parliament and of the Council, which establishes the framework for community action to achieve a sustainable use of pesticides. This directive encourages integrated pest management and alternative approaches or techniques, such as non-chemical alternatives to pesticides.

This is a very powerful tool of a great interest in the agricultural sector, which is demanding new solutions for sustainable agriculture.

Carvacrol is a natural compound present as a secondary metabolite in the essential oils of numerous aromatic plants, such as *Thymbra capitata* (L.) Cav., *Thymus vulgaris* L. and *Origanum vulgare* L., with proved herbicidal action.

The objective of this work is to study the herbicidal activity of carvacrol in cereal weeds, in vitro and in vivo conditions, and to determine if carvacrol produces phytotoxic effects in cereals.

In the in vitro experiments, it was concluded that high doses of carvacrol applied to *Avena fatua* L. inhibited germination, and low doses reduced growth, while treatments with DMSO and the control showed no significant differences. In *Papaver rhoeas* L., DMSO treatment promoted germination but not growth, and high doses of carvacrol completely inhibited germination.

In in vivo experiments, carvacrol spraying was effective for controlling *Avena fatua*, but application via irrigation was not effective. In wheat crops, high doses of carvacrol applied through irrigation negatively affected the crop.

Keywords: weed control, natural products, cereal crops, carvacrol, herbicidal activity, phytotoxicity

Valencia, september 2024

Alumna: Carmen Izquierdo Ortín

Tutor acadèmic: Mercedes Verdeguer Sancho

Títol: Activitat herbicida del compost natural carvacrol en males herbes de cereals.

Resum:

Les males herbes poden ocasionar pèrdues molt importants en el rendiment dels cultius. Existeixen diversos mètodes de control de les males herbes, com són mètodes culturals, mecànics i físics, biològics, biotecnològics i químics, però des del seu descobriment en els anys 40, l'ús d'herbicides ha sigut el mètode més utilitzat per al control de les males herbes.

A causa de l'ús abusiu dels herbicides han sorgit problemes en la salut humana i el medi ambient, a més de promoure l'aparició de biotips de males herbes resistents a herbicides a causa de l'ús repetit d'herbicides amb la mateixa manera d'acció.

L'any 2009 la Unió Europea va canviar la legislació sobre l'ús de pesticides, promovent un ús sostenible d'aquests, mitjançant la Directiva I2009/128/CE, del Parlament Europeu i del Consell, per la qual s'estableix el marc d'actuació comunitària per a aconseguir un ús sostenible dels plaguicides. A través d'aquesta directiva es fomenta la gestió integrada de plagues i de plantejaments o tècniques alternatives, com les alternatives no químiques als plaguicides.

Una alternativa a l'ús de productes químics és l'ús de productes naturals. Aquesta és una eina molt poderosa i de gran interès en el sector agrícola, que està demandant noves solucions per a una agricultura sostenible.

El carvacrol és un compost natural present com a metabòlit secundari en els olis essencials de nombroses plantes aromàtiques, com *Thymbra capitata* (L.) Cav., *Thymus vulgaris* L. i *Origanum vulgare* L., amb demostrada acció herbicida.

L'objectiu d'aquest treball és estudiar l'activitat herbicida del carvacrol en males herbes de cereals, tant en assajos in vitro com in vivo, en condicions d'hivernacle, i determinar si el carvacrol produeix efectes fitotòxics en els cereals.

En els assajos in vitro, es conclou que dosis altes de carvacrol aplicades en *Avena fatua* L. van inhibir la germinació i dosis baixes van reduir el creixement, mentres que els tractaments amb DMSO i el control no van mostrar diferències significatives. En *Papaver rhoeas* L., el tractament amb DMSO va afavorir la germinació, però no el creixement, i dosis altes de carvacrol van inhibir completament la germinació.

En assajos in vivo, la polvorització de carvacrol va ser efectiva per a controlar *Avena fatua*, però l'aplicació via regue no va ser eficaç. En el cultiu de blat, dosis altes de carvacrol aplicades per reg van afectar negativament el cultiu.

Paraules clau: control de males herbes, productes naturals, cereals, carvacrol, activitat herbicida, fitotoxicitat

València, setembre de 2024

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La flora arvense y su problemática.	1
1.2. Manejo integrado de arvenses.....	1
1.3. Herbicidas. Necesidad de alternativas.....	2
1.4. Uso de productos naturales como bio herbicidas. Alelopatía.	2
1.5. El carvacrol como herbicida natural.....	3
1.6. Especies arvenses estudiadas.	4
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	6
2.1. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030.	6
3. MATERIAL Y MÉTODOS	7
3.1. ENSAYOS IN VITRO	7
3.1.1. Diseño experimental	7
3.1.2. Tratamientos y momento de aplicación	7
3.1.3. Procedimiento	8
3.1.4. Adquisición y análisis de datos.....	9
3.2. ENSAYOS IN VIVO	10
3.2.1. Preparación de los ensayos.....	10
3.2.2. Tratamientos y momento de aplicación	11
3.2.3. Adquisición y análisis de datos.....	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
4.1. ENSAYOS IN VITRO	16
4.1.1. Aplicación de carvacrol sobre la germinación de semillas en las arvenses ensayadas.	16
4.1.1.1. <i>Avena fatua</i> L.	16
4.1.1.2. <i>Papaver rhoëas</i> L.	17
4.1.2. <i>Papaver rhoëas</i> L.	17
4.2. ENSAYOS IN VIVO	19
4.2.1. <i>Avena fatua</i> L.	19
4.2.2. <i>Triticum aestivum</i> L.	23
5. CONCLUSIONES	27
6. BIBLIOGRAFÍA	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos, nomenclatura y dosis para el ensayo in vivo.	8
Tabla 2. Fechas de siembra y evaluación de las placas Petri en <i>Papaver rhoeas</i> y <i>Avena fatua</i> . .	8
Tabla 3. Tratamientos, nomenclatura y dosis aplicadas en el ensayo in vivo vía riego.....	12
Tabla 4. Tratamientos, nomenclatura y dosis aplicadas en el ensayo in vivo mediante pulverización.	12
Tabla 5. Fecha de siembra, trasplante, tratamiento y evaluación de <i>Triticum aestivum</i> y <i>Avena fatua</i> en los ensayos in vivo.	13
Tabla 6. Eficacia y nivel de daño del carvacrol sobre <i>Avena fatua</i> en función del tratamiento y la forma de aplicación.	19
Tabla 7. Eficacia y nivel de daño del carvacrol sobre <i>Avena fatua</i> aplicado mediante pulverización en función del tratamiento.....	20
Tabla 8. Parámetros de crecimiento (longitud) de las plantas de <i>Avena fatua</i> tratadas con carvacrol pulverizado en función de su tratamiento.	21
Tabla 9. Parámetros de crecimiento (peso) de las plantas de <i>Avena fatua</i> tratadas con carvacrol pulverizado en función de su tratamiento.....	21
Tabla 10. Eficacia y nivel de daño del carvacrol sobre <i>Avena fatua</i> aplicado mediante riego en función del tratamiento.	22
Tabla 11. Parámetros de crecimiento (longitud) de las plantas de <i>Avena fatua</i> tratadas con carvacrol vía riego en función de su tratamiento.	22
Tabla 12. Parámetros de crecimiento (peso) de las plantas de <i>Avena fatua</i> tratadas con carvacrol vía riego en función de su tratamiento.	23
Tabla 13. Eficacia y nivel de daño del carvacrol sobre <i>Triticum aestivum</i> en función del tratamiento y el modo de aplicación.	23
Tabla 14. Eficacia y nivel de daño del carvacrol sobre <i>Triticum aestivum</i> aplicado mediante pulverización en función del tratamiento.....	24
Tabla 15. Parámetros de crecimiento (longitud) de las plantas de <i>Triticum aestivum</i> tratadas con carvacrol pulverizado en función de su tratamiento.	24
Tabla 16. Parámetros de crecimiento (peso) de las plantas de <i>Triticum aestivum</i> tratadas con carvacrol pulverizado en función de su tratamiento.	25
Tabla 17. Eficacia y nivel de daño del carvacrol sobre <i>Triticum aestivum</i> aplicado mediante riego en función del tratamiento.	25
Tabla 18. Parámetros de crecimiento (longitud) de las plantas de <i>Triticum aestivum</i> tratadas con carvacrol vía riego en función de su tratamiento.	26
Tabla 19. Parámetros de crecimiento (peso) de las plantas de <i>Triticum aestivum</i> tratadas con carvacrol vía riego en función de su tratamiento.	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Avena fatua</i> : A) panícula, B) espiguilla, C) semilla. Fuente: Torres, N. (2019).	4
Figura 2. <i>Papaver rhoeas</i> : A) flor, B) inflorescencia, C) hojas, D) semilla. Fuente: Flora catalana (2022).	4
Figura 3. Cámara de cultivo modelo EGCHS. Equitec.	7
Figura 4. A) Semillas de <i>Papaver rhoeas</i> , B) Semillas de <i>Avena fatua</i>	9
Figura 5. Disposición de las placas Petri en la cámara de cultivo in vitro.....	9
Figura 6. Programa de análisis de imagen Digimizer con semillas de <i>Avena fatua</i> L.....	9

Figura 7. Preparación del sustrato para el ensayo in vivo en invernadero. Fuente: Pastor, C (2021).	11
Figura 8. Preparación de las macetas para el ensayo in vivo en invernadero. Fuente: Pastor, C. (2021).	11
Figura 9. Agrupación de plantas en bandejas ordenadas por tratamiento en el invernadero. Fuente: Pastor, C. (2021).....	11
Figura 10. Pulverizador de presión con gatillo MATABI Berry1,5 litros.....	12
Figura 12. Aplicación radicular (izquierda) y aplicación pulverizada (derecha) en el invernadero.	13
Figura 13. Escala nivel de daño para plantas de Avena fatua.....	14
Figura 14. Escala nivel de daño para plantas de Triticum aestivum.....	14
Figura 15. Porcentaje de germinación de semillas de Avena fatua en función del tratamiento y los días después de la aplicación.....	16
Figura 16. Longitud (cm) de la parte aérea (coleóptilo y hoja primera), radícula y total de las plántulas de Avena fatua en función del tratamiento.	17
Figura 17. Porcentaje de germinación de las semillas de Papaver rhoeas en función del tratamiento y los días después de la aplicación.....	18
Figura 18. Longitud (cm) del hipocótilo, radícula y total de las plántulas de Papaver rhoeas en función del tratamiento.	19

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La flora arvense y su problemática.

La agricultura es una de las actividades primordiales en el mundo, puesto que garantiza la alimentación de la población y el sustento económico de los productores. Sin embargo, está afectada por la aparición de flora arvense que reduce la producción y el rendimiento de los cultivos (Cruz y Flores, 2021).

No existe una definición compartida por todos los científicos para el concepto de mala hierba. La Weed Science Society of America definió, en 1967, “mala hierba” como una planta que crece donde no se desea. Más adelante, en 1986, la Sociedad Europea de Investigación de las Malas Hierbas definió una mala hierba como “cualquier planta o vegetación, excluidos los hongos, que interfiere con los objetivos o necesidades de las personas” (Zimdahl, 2018).

Según Vyvyan (2001), las malas hierbas se definen como plantas que crecen en un lugar no deseado, compiten con los cultivos por los recursos, reducen los rendimientos de éstos y pueden contaminar el cultivo con sus semillas, perpetuando así el problema en las siguientes temporadas de cultivo.

El proceso de competencia entre dos plantas depende, en parte, de los recursos limitantes existentes en el medio en el que se encuentran, como son el agua, la luz y los nutrientes. La flora arvense es capaz de dispersarse, estar presente durante largos periodos de tiempo y competir con el cultivo a pesar de las alteraciones que el hombre realiza en el medio. La forma y tamaño de la semilla es, en muchos casos, similar en tamaño y forma a los cultivos, provocando una difícil separación de dichas semillas y una fácil dispersión de las arvenses, también, poseen mecanismos de permanencia por medio del viento, la fauna o el agua, sincronización con el cultivo para aprovechar los recursos disponibles, elevado vigor y capacidad de rebrote (García y Fernández-Quintanilla, 1991).

En el período entre 2001 y 2003, se realizaron estimaciones de las pérdidas potenciales para los cultivos de trigo, arroz, maíz, patatas, soja y algodón en 19 regiones, así como para el total mundial por la presencia de plantas adventicias y cuyos resultados mostraban que las arvenses provocaban unas pérdidas aproximadamente del 34% del potencial más alto, valores por encima de plagas y patógenos que representaba entre el 18 y 16% (Torres, 2019).

1.2. Manejo integrado de arvenses.

El Manejo Integrado de Arvenses, se define como el desarrollo de un conjunto de prácticas o métodos, encaminadas a mantener la vegetación arvense dentro de un nivel inferior al que produciría pérdidas económicamente importantes.

La selección del método o métodos empleados para el manejo de cualquier especie debe estar fundamentada en el conocimiento de las arvenses y su biología, sus hábitos de desarrollo, modo de reproducción, comportamiento de las semillas en el suelo, medios de dispersión, número de semillas por planta y su viabilidad, así como el área invadida, la especie y el estado de cultivo, y la capacidad económica del agricultor (Pinilla y García, 2001).

Existen varios métodos para el control de la flora arvense o para reducir su infestación a un determinado nivel (Labrada y Parker, 1996):

- Métodos preventivos dónde se incluyen procedimientos de cuarentena para prevenir la entrada de una maleza exótica en el país o en un territorio particular.

- Métodos físicos o mecánicos, incluyen cualquier acción física que se lleve a cabo para destruir las malas hierbas, como son labores de cultivo, arranque manual, escarda con azada, etc.
- Métodos culturales, consisten en la modificación del ambiente donde crecen las malezas de forma que se disminuye la competencia de las arvenses con el cultivo puesto que este se refuerza, comprende la rotación de cultivos, el uso de variedades competitivas, la implantación de cultivos intercalados, preparación del terreno, acolchado, etc.
- Control químico, es el método más usado y está basado en el uso de herbicidas.
- Control biológico se basa en el empleo de enemigos naturales específicos para el control de especies de malas hierbas, entre ellos están los animales de pastoreo, virus contra las arvenses, parásitos y patógenos.
- Métodos no convencionales: solarización del suelo.

Según Córdoba y Casas (2003), la selección de un método o conjunto de ellos para llevar a cabo el control de arvenses va a depender en gran medida de las posibilidades del productos. Teniendo en cuenta la necesidad de preservar el medio ambiente, el manejo integrado es lo más aconsejable, obedeciendo a criterios técnicos basados en las situaciones del cultivo específicas.

1.3. Herbicidas. Necesidad de alternativas.

El descubrimiento en la década de los cuarenta de las propiedades selectivas de los compuestos fenoxiacéticos (Marth y Mitchell, 1945; Nutman et. al., 1945; Slade et al., 1945), representó el comienzo de una nueva etapa en los métodos de control de la flora arvense. El potencial de estos productos disminuyó la problemática ocasionada por las malezas en los cultivos, no obstante, el empleo extensivo de los herbicidas durante todos estos años no ha provocado la desaparición de las arvenses, si no que, en casos particulares, se han agravado.

El uso indiscriminado de estos productos químicos implica un impacto sobre el medio ambiente y sobre la salud humana, pudiendo enumerar una serie de razones para fomentar la búsqueda de alternativas más racionales para solventar el problema derivado de las malas hierbas (Fernández, A., 1982):

- i. Perjuicios e interacciones en el mantenimiento de los ecosistemas naturales.
- ii. Aparición de nuevas arvenses con tolerancia a los herbicidas.
- iii. Coste creciente de los productos químicos a aplicar en situaciones específicas.
- iv. Capacidad competitiva y estratégica de sobrevivencia de las malas hierbas constituyendo problemas graves a nivel mundial.

Los herbicidas poseen efectos perjudiciales relacionados con el medio ambiente, la salud de las personas y los animales, por lo que, con el paso de los años, la sociedad está tomando conciencia sobre el empleo de técnicas más efectivas, respetuosas con el medio ambiente y enfocadas al desarrollo de una agricultura sostenible.

1.4. Uso de productos naturales como bio herbicidas. Alelopatía.

La alelopatía se define como cualquier efecto directo o indirecto (estimulador o inhibitorio) de una planta (incluyendo microorganismos) sobre otra, mediante la liberación de compuestos químicos (aleloquímicos) al medio ambiente (Rice, 1984). La liberación de los compuestos aleloquímicos puede ser realizado de diversas formas: exudación de las raíces, lixiviación de las hojas, deshechos vegetales en el suelo por la precipitación y volatilización de la hojas (Putnam, 1983). Dentro de este grupo de compuestos, poseen gran relevancia aquellos que son capaces de eliminar o suprimir plantas competentes cerca de la planta fuente, debido a su potencial como

herbicidas naturales selectivos (Stonard y Miller-Wideman, 1994; Benner, 1996; Duke *et al.*, 2000).

Según Macías *et al.* (2007), los compuestos aleloquímicos se clasifican de acuerdo con su origen biosintético siendo los grupos principales: compuestos fenológicos, terpenoides, benzoxacinoides y glucosinolatos.

Los productos naturales son una importante fuente de obtención de nuevos herbicidas por su potencial especificidad de su acción biológica y por la reducida probabilidad de producir acumulaciones dañinas y residuos perjudiciales en aguas y suelos (Macías, 1995).

La alelopatía se ha propuesto dentro de las estrategias de control de plantas arvenses como una alternativa de carácter multidisciplinar mediante el desarrollo de técnicas que impliquen su uso, como el uso de aleloquímicos naturales o modificados como herbicidas, la transferencia genética de propiedades alelopáticas a cultivares comerciales de cultivos, la utilización de cultivares alelopáticos como plantas acompañantes o como abono verde y el uso de “mulchings” fitotóxicos (Verdeguer, 2011).

El término se usó por primera vez en 1937 por el botánico austriaco, Molisch, y a lo largo del tiempo se han creado listas con las 50 malas hierbas acusadas de interferir en uno o más cultivos a lo largo del tiempo y se citan más de 25 plantas con conocida actividad herbicida alelopática, además, los residuos de varios cultivos tienen actividad fitotóxica sobre otras plantas, este concepto se suele atribuir a aleloquímicos. Para demostrar el potencial aleloquímico se deben realizar estudios de laboratorio y posteriormente estudios en campo (Zimdahl, 2018).

Los productos naturales reducen la probabilidad de producir acumulaciones dañinas y residuos perjudiciales en aguas y suelo, las fitotóxicas naturales suelen actuar en puntos distintos a los herbicidas convencionales, presentando numerosos y diversos modos de acción lo que evita la aparición de resistencias, no todos los compuestos fitotóxicos tienen actividad alelopática, algunos tienen acción interna o defensiva (Verdeguer, 2011).

1.5. El carvacrol como herbicida natural

La técnica de arrastre por vapor de agua o hidrodestilación se emplea para la obtención de los aceites esenciales, los cuales se obtienen principalmente de las partes no leñosas de la planta, en especial de las hojas (Batish *et al.*, 2008). La presencia de estos aceites en las plantas muestra una estrategia de defensa contra hongos patógenos, insectos perjudiciales y herbívoros (Lagenheim, 1994).

El principal inconveniente del uso de aceites esenciales como herbicidas naturales es que requieren el empleo de surfactantes para su aplicación y éstos están limitados en la agricultura orgánica. Son compuestos que actúan muy rápido en el control de arvenses, pero poseen actividad limitada debido a que la mayoría se volatilizan rápidamente (Dayan *et al.*, 2009).

El carvacrol supone más del 75% de la composición del aceite esencial *Thymus capitata* L. Cav y ambos han mostrado efectos fitotóxicos sobre la germinación de semillas y sobre el crecimiento de plántulas de diferentes especies (Verdeguer, 2011).

Según De Assis (2018), el carvacrol actúa causando daño al ADN de la especie, siendo su mecanismo de acción clastogénico, pero no provoca cambios en la formación del huso mitótico.

1.6. Especies arvenses estudiadas.

Avena fatua L.

La avena silvestre es una de las malezas más dañinas y resistentes de los cultivos de cereales en el mundo (Sharama y Born, 1978). Los daños que ocasiona se deben a la competencia con el cultivo en cuanto a espacio vital, extracción de agua y utilización de nutrientes, así como reducción de la iluminación. Debido a su potente raíz y a su gran poder colonizador, reduce también el ahijado del cultivo (Gómez e Ibáñez, 1980).

A. fatua (Figura 1) es una especie perteneciente a la familia Gramineae. Es una planta anual de 30 – 150 cm. Hojas de 5 – 15 mm de anchura, pelosas en el margen del limbo y con lígula de 3 – 6 mm. Las espiguillas están formadas por 2 – 3 flores cubiertas por glumas, una vez maduro el fruto las flores se separan de forma individual. Inflorescencia en panícula, raquis peloso en toda su longitud.

Se caracteriza por completar todo su ciclo de desarrollo durante la estación favorable, pasando la estación desfavorable en forma de semilla (Herbario de la Universidad Pública de Navarra, 2019).

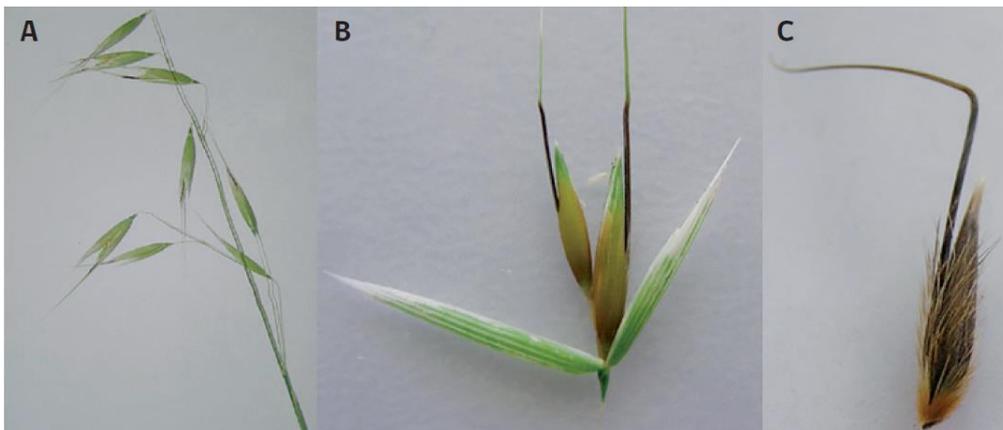


Figura 1. *Avena fatua*: A) panícula, B) espiguilla, C) semilla. Fuente: Torres, N. (2019).

Papaver rhoeas L.

La amapola (Figura 2) es una especie perteneciente a la familia Papaveraceae. Se trata de una planta anual de 15 – 60 cm. Presenta hojas pinnatupartidas, con lóbulos dentados y agudos. Sus flores están formadas por cuatro pétalos rojos, dos sépalos y numerosos estambres.

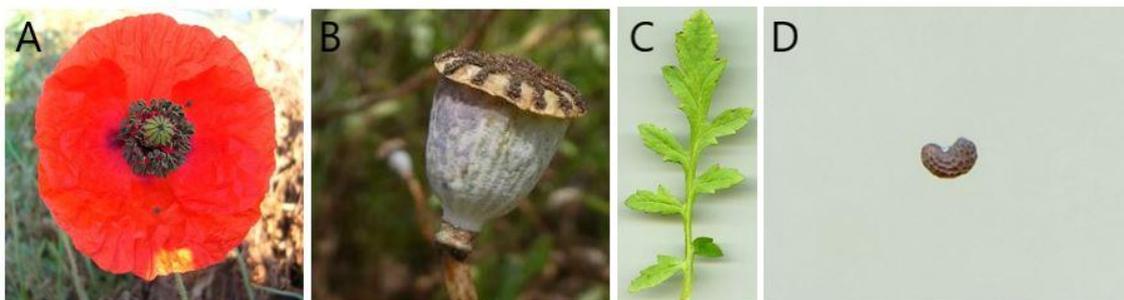


Figura 2. *Papaver rhoeas*: A) flor, B) inflorescencia, C) hojas, D) semilla. Fuente: Flora catalana (2022).

Es la especie arvense de hoja ancha más extendido en campos de cultivo de cereales de invierno en Europa, infestado cerca del 50% de zonas cerealeras mediterráneas, y existiendo alrededor del mundo (Asia, Oceanía, Australia, Sudáfrica, América), posicionada como una de las arvenses dicotiledóneas más peligrosas, tanto por su competitividad con el cultivo, como por la existencia de biotipos resistentes a herbicidas (Stankiewicz-Kosyl et al., 2020; Rey-Caballero et al., 2014).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar el potencial fitotóxico del carvacrol frente a arvenses presentes en cultivos de cereales, para su posterior desarrollo como herbicida natural. Para ello, se llevaron a cabo ensayos in vitro, contra arvenses presentes en cereales (*Avena fatua* y *Papaver rhoeas*), e in vivo, en condiciones de invernadero, frente a *Avena fatua* y *Triticum aestivum*, con el fin de determinar la eficacia del carvacrol para el control de arvenses y evaluar su potencial fitotoxicidad sobre los cultivos de cereales.

2.1. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030.

La interconexión entre los objetivos de desarrollo sostenible, como el hambre cero, la salud y el bienestar, el acceso a agua limpia, y la protección de la vida submarina y de los ecosistemas terrestres, es fundamental para construir un futuro sostenible. En este contexto, el uso de herbicidas naturales, como el carvacrol, se presenta como una alternativa viable para el control de malas hierbas, contribuyendo a un enfoque más responsable en la producción y el consumo.

El hambre cero implica garantizar que todas las personas tengan acceso a alimentos suficientes y nutritivos. La agricultura sostenible, que incluye el uso de herbicidas naturales, puede aumentar la productividad de los cultivos al reducir la competencia de malas hierbas sin recurrir a productos químicos sintéticos que pueden contaminar el suelo y el agua. La producción y el consumo responsables son esenciales para un desarrollo sostenible. Al integrar prácticas agrícolas que utilizan herbicidas naturales, se fomenta un ciclo de producción que respeta el medio ambiente, mejora la salud de los cultivos y, además, promueve la salud y el bienestar de las comunidades al proporcionar alimentos más seguros.

El acceso a agua limpia es otro aspecto crítico. Los herbicidas químicos pueden filtrarse al agua, afectando a la calidad de ésta y, por ende, la salud de las personas y los ecosistemas. Al optar por herbicidas naturales se reduce el riesgo de contaminación, lo que contribuye a mantener el agua limpia y segura para el consumo humano y la vida acuática. La vida submarina y los ecosistemas terrestres son igualmente vulnerables a la fitotoxicidad de los herbicidas sintéticos. El carvacrol tiene un perfil de toxicidad más bajo y puede ser menos perjudicial para la biodiversidad. Al utilizarlo para el control de malas hierbas se protege la flora y la fauna de los ecosistemas, promoviendo un equilibrio saludable en la naturaleza.

En resumen, el uso de herbicidas naturales como el carvacrol no solo es una estrategia efectiva para el control de malas hierbas, sino que también se alinea con los objetivos de hambre cero, salud y bienestar, agua limpia, y la protección de la vida de ecosistemas submarinos y terrestres.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ENSAYOS IN VITRO

Los ensayos de germinación in vitro se realizaron en una cámara de cultivo modelo EGCHS (Equitec; Madrid, España) (Figura 3). Se compararon diferentes dosis de carvacrol frente a la no aplicación de éste en semillas de *Papaver rhoeas* L. y *Avena fatua* L.

Las semillas de *P. rhoeas* fueron recolectadas en un campo de Vigo (Galicia) en 2019, y las semillas de *A. fatua* se compraron a HERBISEED (Reading, Reino Unido) en 2018. La conservación de las semillas hasta su uso se realizó en bolsas de plástico con cierre hermético a temperatura ambiente.

Durante la realización del ensayo, las condiciones de trabajo de la cámara de cultivo (Figura 4) fueron 25°C/15°C, es decir, durante el día se encontraba a 25°C y durante la noche a 15°C; y se estableció un fotoperiodo de 10/14, es decir, 10 horas de luz y 14 horas de oscuridad.



Figura 3. Cámara de cultivo modelo EGCHS. Equitec.

El carvacrol utilizado era de Sigma Aldrich, se adquirió a Merck KGaA y el DMSO (dimetilsulfóxido) era de PanReac AppliChem ITW Reagents.

3.1.1. Diseño experimental

El diseño experimental para ambas especies en cuanto a la disposición de las placas Petri dentro de la cámara de cultivo fue totalmente aleatorio.

La unidad experimental era una placa Petri de 9 cm en la que se dispusieron dos capas de papel de filtro en la base, sobre ella se colocaron las semillas y, las semillas se cubrieron con dos capas de papel de filtro, incorporando el tratamiento al papel de la capa superior. Finalmente, cada placa Petri fue sellada con Parafilm antes de introducirla en la cámara de cultivo.

3.1.2. Tratamientos y momento de aplicación

Se realizaron un total de 8 tratamientos para cada especie. El caldo empleado para los tratamientos estaba formado por 70 ml de agua, 35 µl de DMSO y un volumen de Carvacrol correspondiente a la concentración de cada tratamiento.

En ambas especies se dispuso un tratamiento control, el cual únicamente se trató con agua; además de un tratamiento control junto con DMSO, cuyo objeto era verificar el efecto del DMSO sobre las especies, ya que el DMSO se utilizó como emulsionante para poder diluir el carvacrol en

agua. Se establecieron las siguientes concentraciones de carvacrol a ensayar: IC80, IC80x2, IC80x4, IC80x8, IC80x16 e IC80x32. La IC80 es la dosis que inhibe el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* al 80%, que es de 315 microMolar, determinada por el grupo de trabajo de la profesora Adela Sánchez Moreiras de la Universidad de Vigo, con la que se estaba colaborando cuando se realizó este trabajo, en el marco del proyecto “Estudio del modo de acción y el potencial bioherbicida de compuestos naturales con actividad fitotóxica” (RTI2018-094716-B-I00), financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.

Los tratamientos ensayados se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1. *Tratamientos, nomenclatura y dosis para el ensayo in vivo.*

NOMENCLATURA	TRATAMIENTOS	DOSIS
CONTROL	Control	70 ml H ₂ O
DMSO	Control DMSO	70 ml H ₂ O + 35 µl de DMSO
CARV	IC80	70 ml H ₂ O + 35 µl de DMSO + 3,395 µl de Carvacrol
CARV-2	IC80x2	70 ml H ₂ O + 35 µl de DMSO + 6,804 µl de Carvacrol
CARV-4	IC80x4	70 ml H ₂ O + 35 µl de DMSO + 13,58 µl de Carvacrol
CARV-8	IC80x8	70 ml H ₂ O + 35 µl de DMSO + 27,02 µl de Carvacrol
CARV-16	IC80x16	70 ml H ₂ O + 35 µl de DMSO + 54,04 µl de Carvacrol
CARV-32	IC80x32	70 ml H ₂ O + 35 µl de DMSO + 108,09 µl de Carvacrol

En la Tabla 2 se indican las fechas de siembra y tratamiento para cada una de las especies, así como los días de evaluación (EV) de las placas Petri, siendo estos una vez transcurridos 3, 5, 7, y 10 días tras la incubación.

Tabla 2. *Fechas de siembra y evaluación de las placas Petri en Papaver rhoeas y Avena fatua.*

	PAPAVER RHOEAS L.	AVENA FATUA L.
SIEMBRA	17/03/2021	23/04/2021
EV-1	20/03/2021	26/04/2021
EV-2	22/03/2021	28/04/2021
EV-3	24/03/2021	30/04/2021
EV-4	27/03/2021	03/05/2021

La evaluación de las semillas consiste en hacer conteo y registro de las semillas germinadas, así como la toma de fotografías de las placas, mediante las cuales posteriormente se miden las longitudes de la radícula y del coleóptilo de cada una de las semillas germinadas.

3.1.3. Procedimiento

En función de la especie se seleccionaron un número determinado de semillas por cada placa Petri, debido a su tamaño y a la experiencia adquirida en ensayos previos, siendo 20 semillas por placa en el caso de *Papaver rhoeas* (Figura 4A) y 5 semillas por placa en el caso de *Avena fatua* (Figura 4B). Además, en el primer ensayo se realizaron 5 repeticiones para cada concentración, teniendo un total de 100 semillas para cada una de las concentraciones y 40 placas en total. Por otro lado, para el ensayo de *Avena fatua* se realizan 10 repeticiones para cada concentración, siendo un total de 50 semillas por concentración, es decir, en total 80 placas Petri.

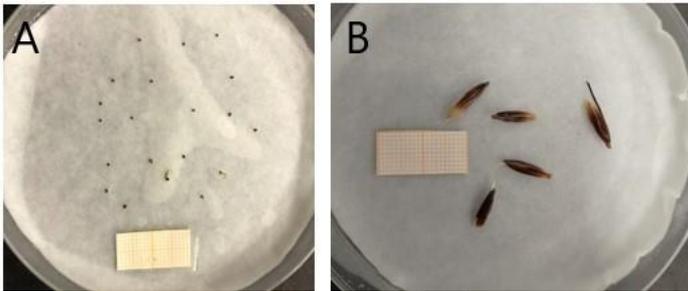


Figura 4. A) Semillas de *Papaver rhoeas*, B) Semillas de *Avena fatua*.

La disposición de las semillas en cada placa fue la siguiente: en la base de la placa se colocaron dos capas de papel de filtro, encima de estas se situaron las semillas, siempre intentado evitar el contacto entre las mismas, a continuación, se colocaron nuevamente dos capas de papel de filtro, cubriendo así las semillas y aplicando sobre este papel el tratamiento correspondiente para cada una de las placas. Para lograr un sellado correcto, las placas Petri se sellaron mediante Parafilm. Y finalmente, se introdujeron en la cámara de cultivo bajo condiciones controladas (Figura 5).



Figura 5. Disposición de las placas Petri en la cámara de cultivo *in vitro*.

Transcurridos los días indicados anteriormente se hicieron las evaluaciones.

3.1.4. Adquisición y análisis de datos.

La obtención de los datos se realizó mediante el programa de análisis de imagen Digimizer (v.4.6.1. MedCalc Software, Ostend, Bélgica, 2005-2016) (Figura 6), el cual permite conocer las longitudes de las plántulas, así como las longitudes de radícula, coleóptilo e hipocotilo de forma separada.

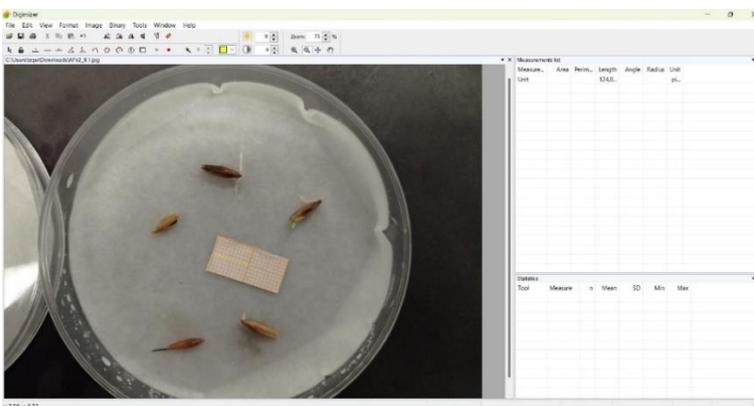


Figura 6. Programa de análisis de imagen Digimizer con semillas de *Avena fatua* L.

Una vez registrados los datos, mediante la aplicación Excel, se calculó el porcentaje de germinación, la media, la desviación estándar, el error estándar y el porcentaje de germinación estándar.

El porcentaje de germinación se calcula como:

$$\text{Porcentaje de germinación} = \frac{\text{Semillas germinadas}}{\text{Semillas totales}} \cdot 100$$

Los datos se procesaron mediante el paquete estadístico Statgraphics® Centuron XVII (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA). Se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA, Analysis of Variance) multifactorial de los porcentajes de germinación en función del tratamiento aplicado, la especie y el tiempo de cada observación. Además, mediante un análisis de la varianza simple se evaluó la germinación y el crecimiento de las plántulas.

3.2. ENSAYOS IN VIVO

El ensayo in vivo se realizó en el invernadero número 8, multicapilla, de cristal, perteneciente a la Universitat Politècnica de València, cuyas dimensiones son 6,5 x 25 x 5 m y en su interior consta de 8 bancadas de 1,7 x 3,2 m. El invernadero dispone de un sistema de refrigeración mediante “cooling system” con manga de distribución y ventilación mediante practicables cenitales automáticas.

En este caso el ensayo se realizó sobre *Avena fatua* como mala hierba y el cultivo *Triticum aestivum*, en ambos casos se compararon distintas dosis de Carvacrol tanto vía foliar como radicular, frente a la no aplicación de éste (tratamiento control).

Las primeras fueron recolectadas en un campo de Vigo (Galicia) en 2019, las semillas del cultivo se obtuvieron de Limagrain Ibérica (Elorz, Navarra) en 2018. La conservación de las semillas hasta su uso se ha realizado en bolsas de plástico con cierre hermético a temperatura ambiente de 25°C.

El carvacrol utilizado era de Sigma Aldrich y el DMSO (dimetilsulfóxido) de PanReac AppliChem ITW Reagents.

3.2.1. Preparación de los ensayos

La preparación de los ensayos se dividió en tres partes: obtención del lecho de cultivo, semillero y trasplante. El lecho de cultivo se obtuvo de la mezcla 3:1 de turba y perlita, es decir, en un mismo recipiente se aportó $\frac{3}{4}$ de turba y $\frac{1}{4}$ de perlita. Una vez homogeneizada la mezcla, se regó buscando una hidratación óptima y se homogenizó nuevamente (Figura 7). Finalizado el lecho de cultivo, se dispuso en bandejas de plástico (24x36x8 cm.) para realizar la siembra, tanto de los cultivos como de las arvenses, regándolas de forma periódica con el objetivo de mantener el sustrato húmedo y lograr la germinación de las semillas hasta el estado de desarrollo óptimo para realizar los tratamientos. Alcanzado el estado fenológico BBCH11 – BBCH12, fue el momento de trasplantar a las macetas de polipropileno (PP) de dimensiones 8x8x7 cm.

En el trasplante se introdujo en cada maceta 1 capa de papel de filtro de superficie similar a la base de esta. A continuación, se añadió lecho de cultivo de igual relación que en el proceso del semillero y, para finalizar, la planta (Figura 8).

Una vez finalizado el trasplante, las macetas se organizaron en grupos homogéneos de 10 plantas, numerando las macetas y se colocó cada grupo en bandejas de 24x36x6 cm (Figura 9). Cada especie ensayada estaba formada por 14 grupos, habiendo un total de 140 plantas por cada una de éstas.



Figura 7. Preparación del sustrato para el ensayo in vivo en invernadero. Fuente: Pastor, C (2021).



Figura 8. Preparación de las macetas para el ensayo in vivo en invernadero. Fuente: Pastor, C. (2021).



Figura 9. Agrupación de plantas en bandejas ordenadas por tratamiento en el invernadero. Fuente: Pastor, C. (2021)

3.2.2. Tratamientos y momento de aplicación

Para cada una de las especies ensayadas se realizaron un total de 7 tratamientos y de cada uno de ellos se evaluó la aplicación vía foliar y radicular. El caldo empleado estaba formado por 200 ml de agua, 100 μ l de DMSO y el volumen de Carvacrol correspondiente a la concentración de cada tratamiento en el caso de la pulverización; y 20 ml de agua, 10 μ l de DMSO y el Carvacrol oportuno para la aplicación vía radicular.

En todas las especies se dispuso de un tratamiento control, el cual únicamente fue tratado con agua; además de un tratamiento control junto con DMSO, cuyo objeto era la normalización de los resultados. Respecto a las concentraciones de Carvacrol, se establecieron las siguientes concentraciones: IC80x16, IC80x32, IC80x64, IC80x128, IC80x256.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los tratamientos ensayados se agrupan en las siguientes tablas (Tabla 3 y 4):

Tabla 3. Tratamientos, nomenclatura y dosis aplicadas en el ensayo in vivo vía riego.

NOMENCLATURA	TRATAMIENTO	DOSIS
CONT-R	Control	200 ml H ₂ O
DMSO-R	DMSO	200 ml H ₂ O + 100 µl de DMSO
CARV-R-1	IC80x16	200 ml H ₂ O + 100 µl de DMSO + 155,2 µl de Carvacrol
CARV-R-2	IC80x32	200 ml H ₂ O + 100 µl de DMSO + 310,4 µl de Carvacrol
CARV-R-3	IC80x64	200 ml H ₂ O + 100 µl de DMSO + 620,8 µl de Carvacrol
CARV-R-4	IC80x128	200 ml H ₂ O + 100 µl de DMSO + 1241,6 µl de Carvacrol
CARV-R-5	IC80x256	200 ml H ₂ O + 100 µl de DMSO + 2483,2 µl de Carvacrol

Tabla 4. Tratamientos, nomenclatura y dosis aplicadas en el ensayo in vivo mediante pulverización.

NOMENCLATURA	TRATAMIENTO	DOSIS
CONT-P	Control	20 ml H ₂ O
DMSO-P	DMSO	20 ml H ₂ O + 10 µl de DMSO
CARV-P-1	IC80x16	20 ml H ₂ O + 10 µl de DMSO + 15,52 µl de Carvacrol
CARV-P-2	IC80x32	20 ml H ₂ O + 10 µl de DMSO + 31,04 µl de Carvacrol
CARV-P-3	IC80x64	20 ml H ₂ O + 10 µl de DMSO + 62,08 µl de Carvacrol
CARV-P-4	IC80x128	20 ml H ₂ O + 10 µl de DMSO + 124,16 µl de Carvacrol
CARV-P-5	IC80x256	20 ml H ₂ O + 10 µl de DMSO + 248,32 µl de Carvacrol

Los tratamientos se realizaron mediante una única aplicación tanto en riego como pulverización cuando el 80% de las plantas habían alcanzado el desarrollo de 3 – 4 hojas verdaderas en *Avena fatua* y *Triticum aestivum*.

Para realizar las aplicaciones foliares se empleó un pulverizador de la marca Matabi. (Figura 7).



Figura 10. Pulverizador de presión con gatillo MATABI Berry1,5 litros.



Figura 11. Aplicación radicular (izquierda) y aplicación pulverizada (derecha) en el invernadero.

En la siguiente tabla (Tabla 5) se indican las fechas de siembra y tratamiento para cada una de las especies, así como los días de evaluación de estas, siendo estos una vez transcurridos 1, 3, 5, 7, 15 y 30 días después de la aplicación (dda).

Tabla 5. Fecha de siembra, trasplante, tratamiento y evaluación de *Triticum aestivum* y *Avena fatua* en los ensayos *in vivo*.

	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Avena fatua</i>
Siembra	08/03/2021	05/04/2021
Trasplante	22/03/2021	16/04/2021
Tratamiento	26/03/2021	19/04/2021
1 dda	27/03/2021	20/04/2021
3 dda	28/03/2021	22/04/2021
5 dda	30/03/2021	24/04/2021
7 dda	01/04/2021	26/04/2021
15 dda	08/04/2021	04/05/2021
30 dda	25/04/2021	19/05/2021

La evaluación de los ensayos se llevó a cabo mediante la toma de fotografías de cada tratamiento el día previo a la aplicación del producto y durante los 30 días siguientes. Una vez transcurridos este periodo se dieron por concluidos los ensayos.

3.2.3. Adquisición y análisis de datos

La actividad herbicida del Carvacrol se evaluó mediante dos parámetros: la eficacia y el nivel de daño. Por una parte, la eficacia se define con dos valores, asignando el valor 0 en el caso de que la planta este viva y el valor 100 si está muerta. Por otra parte, el nivel de daño se determina mediante una escala de nivel de daño, donde el valor 0 significa que la planta está sana, el valor 1 la planta está ligeramente dañada, el valor 2 la planta presenta daños severos y el valor 3 la planta no ha sobrevivido al tratamiento. En la figura 13 se representa la escala de nivel de daño para plantas de *Avena fatua*, y en la figura 14 para plantas de *Triticum aestivum*.



Figura 12. Escala nivel de daño para plantas de *Avena fatua*.

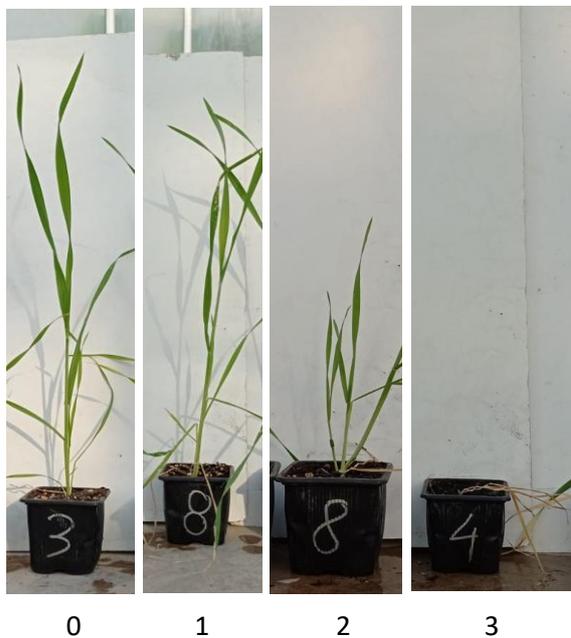


Figura 13. Escala nivel de daño para plantas de *Triticum aestivum*.

Una vez transcurridos los 30 días desde el tratamiento, las plantas se extrajeron de las macetas y se limpiaron las raíces con cuidado, eliminando la tierra sobrante, se obtuvo su peso fresco mediante una báscula y se hicieron fotografías para posteriormente medir la longitud de la raíz y de la parte aérea. Esta medición se realizó empleando el programa de análisis de imagen Digimizer (v.4.6.1. MedCalc Software, Ostend, Bélgica, 2005-2016).

Una vez pesadas, las plantas se envolvieron en papel de aluminio y se introdujeron en una estufa a 60°C durante 7 días, para obtener su peso seco mediante una báscula de precisión.

Los datos se evaluaron mediante análisis multifactoriales de la varianza para las variables eficacia y nivel de daño en función del tratamiento y la especie. De igual forma se evaluaron las variables eficacia, nivel de daño y los parámetros de crecimiento mediante análisis de la varianza simples (ANOVA), en función de los tratamientos.

Los ANOVAS se realizaron utilizando el test de comparación múltiple de Fisher (intervalos LSD, Least Significant Difference) para la separación de medias, con un nivel de confianza del 95% ($P \leq 0.05$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se recoge la interpretación de los resultados que se han obtenido a lo largo de todo el ensayo en función de cada tipo de ensayo, especie, tratamiento y forma de aplicación. Los resultados se exponen estructurados en dos apartados en función de dónde se han llevado a cabo y a su vez por especies ensayadas.

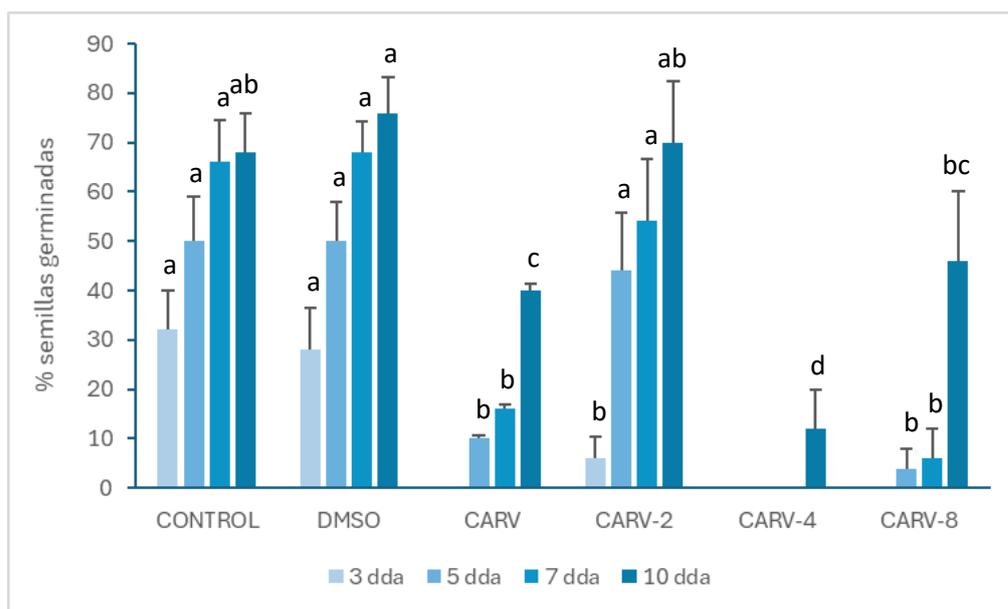
4.1. ENSAYOS IN VITRO

4.1.1. Aplicación de carvacrol sobre la germinación de semillas en las arvenses ensayadas.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos sobre los efectos del uso de diferentes concentraciones de carvacrol sobre la germinación y el desarrollo inicial de *Avena fatua*, y *Papaver rhoeas* con el fin de explorar su posible uso como alternativa natural para el control de malezas.

4.1.1. *Avena fatua* L.

La gráfica presentada (Figura 15) muestra el porcentaje de semillas germinadas de *Avena fatua* a lo largo de diferentes días después de la aplicación de los tratamientos (dda) bajo diferentes dosis de tratamiento. Aquellos tratamientos en los que la germinación no se produjo (CARV-16, y CARV-32) no se representan en la misma.



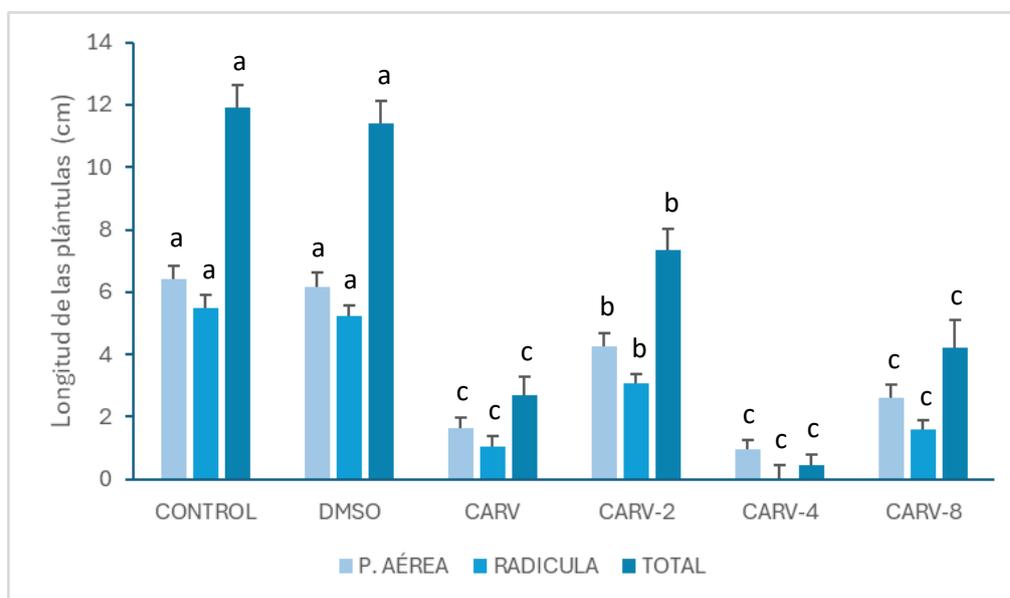
Los datos presentados son media \pm error estándar de las plántulas germinadas en cada tratamiento. Los tratamientos no representados (CARV-16, CARV-32) no tenían plántulas germinadas. Letras diferentes en las columnas de los mismos colores indican diferencias significativas entre tratamientos, según el test de separación de medias LSD (Least Significant Difference) de Fisher LSD, diferencia mínima significativa, $p < 0,05$.

Figura 14. Porcentaje de germinación de semillas de *Avena fatua* en función del tratamiento y los días después de la aplicación.

Los tratamientos CONTROL y DMSO mostraron un alto porcentaje de germinación y un patrón muy similar, con un incremento constante en el porcentaje de germinación conforme pasaron los días. De la misma forma, CARV-2 logró un aumento de la germinación conforme fue avanzando el tiempo, logrando alcanzar valores sin diferencias estadísticamente significativas entre los anteriores a partir del quinto día desde la aplicación del carvacrol. Por otro lado, los tratamientos CARV-4 y CARV -8, fueron los más inhibidores de la germinación, puesto que los porcentajes

obtenidos fueron muy bajos durante el periodo de observación. Cabe destacar que el tratamiento CARV tuvo valores próximos a CARV-8, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos.

Respecto a los parámetros de crecimiento de las plántulas, en la figura 16, se observa que los tratamientos CONTROL y DMSO permitieron un desarrollo óptimo de éstas, con un crecimiento equilibrado entre la parte aérea y la radícula, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos. De igual forma que en la germinación, el tratamiento CARV tuvo valores similares a CARV-4 y CARV-8, mostrando valores de longitud total inferiores al último y sin diferencias significativas. Por último, el tratamiento CARV-2 mostró longitudes superiores tanto de parte aérea, radícula y total, respecto al resto de tratamientos que incluyen carvacrol.



Los datos presentados son media \pm error estándar de las plántulas germinadas en cada tratamiento. Los tratamientos no representados (CARV-16, CARV-32) no tenían plántulas germinadas. Letras diferentes en las columnas de los mismos colores indican diferencias significativas entre tratamientos, según el test de separación de medias LSD (Least Significant Difference) de Fisher LSD, diferencia mínima significativa, $p < 0,05$.

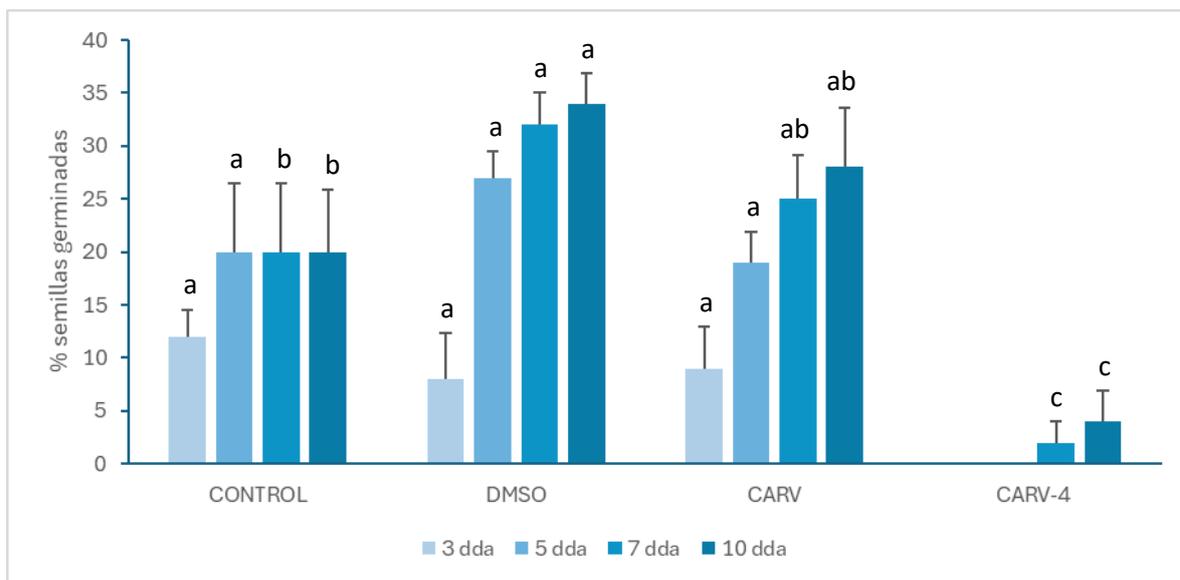
Figura 15. Longitud (cm) de la parte aérea (coleóptilo y hoja primera), radícula y total de las plántulas de *Avena fatua* en función del tratamiento.

El carvacrol tuvo un efecto inhibitorio claro sobre el crecimiento de las plántulas, y su impacto fue dosis-dependiente. A mayores concentraciones (CARV-4 y CARV-8), las plántulas mostraron una inhibición severa del crecimiento, tanto en la parte aérea como en la radícula. El tratamiento con DMSO no afectó negativamente el crecimiento, ya que las plántulas mostraron un desarrollo similar o superior al control.

4.1.2. *Papaver rhoeas* L.

En la siguiente figura (Figura 17) se muestra un gráfico de barras en el que está representada el porcentaje de germinación obtenido durante los días de evaluación, siendo estos a los 3, 5, 7 y 10 días después de la aplicación del tratamiento, y en función de cada tratamiento. En ella se observa que las semillas tratadas con DMSO fueron las que mayor germinación obtuvieron, esto podría deberse a un efecto estimulador del producto sobre la germinación. Seguido del tratamiento con DMSO estuvo la aplicación con CARV y CONTROL con las que no existen diferencias estadísticamente significativas. La dosis CARV-4 fue la que menor germinación logró,

no habiendo diferencias significativas entre esta y CARV-2, CARV-8, CARV-16 y CARV-32, las cuales la inhibieron por completo y por ello no están representadas en la gráfica.



Los datos presentados son media \pm error estándar de las plántulas germinadas en cada tratamiento. Los tratamientos no representados (CARV-8, CARV-16, CARV-32) no tenían plántulas germinadas. Letras diferentes en las columnas de los mismos colores indican diferencias significativas entre tratamientos, según el test de separación de medias LSD (Least Significant Difference) de Fisher LSD, diferencia mínima significativa, $p < 0,05$.

Figura 16. Porcentaje de germinación de las semillas de *Papaver rhoeas* en función del tratamiento y los días después de la aplicación.

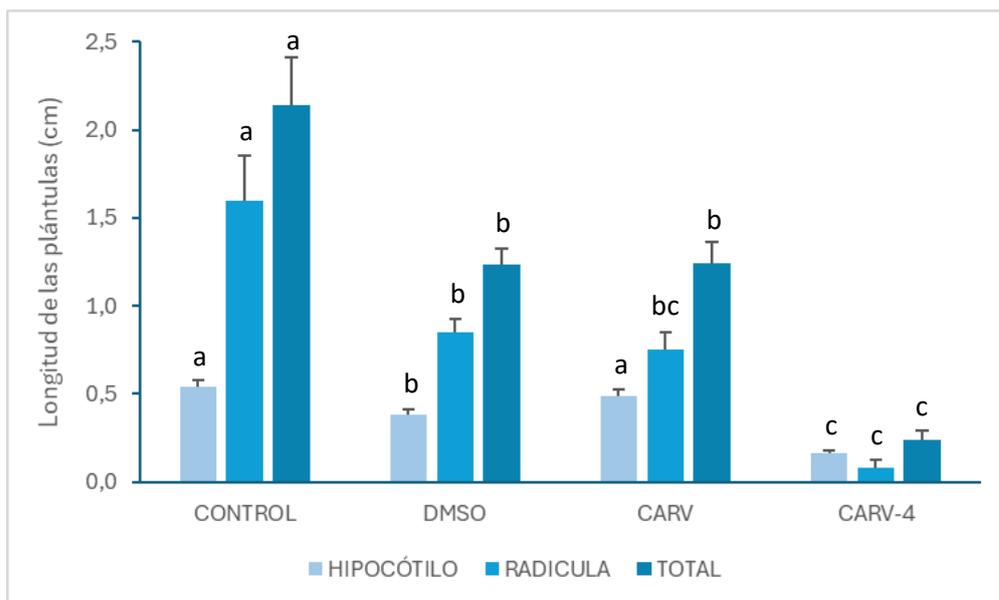
El carvacrol mostró un efecto dosis-dependiente en la inhibición de la germinación de las semillas. En concentraciones más bajas (CARV), la inhibición fue moderada, permitiendo aún cierta germinación, mientras que en concentraciones más altas (CARV-4), el efecto fue mucho más fuerte, reduciendo drásticamente la germinación.

En la siguiente figura (Figura 18) se muestra la afección del carvacrol a distintas dosis sobre los parámetros de crecimiento de las plántulas.

Por una parte, el tratamiento CONTROL fue el que mayor crecimiento radicular y total obtuvo, siendo estadísticamente significativo respecto al resto de aplicaciones en estos parámetros y, respecto al crecimiento del hipocótilo, compartió valores próximos con el tratamiento CARV.

Por otra parte, el tratamiento DMSO mostró un efecto inhibitor del crecimiento de las plántulas respecto al CONTROL, no habiendo diferencias estadísticamente significativas con el tratamiento CARV.

El tratamiento CARV-4 fue el único que reduce el crecimiento más drásticamente, obteniendo longitudes inferiores a 0,5 cm.



Los datos presentados son media \pm error estándar de las plántulas germinadas en cada tratamiento. Los tratamientos no representados (CARV-8, CARV-16, CARV-32) no tenían plántulas germinadas. Letras diferentes en las columnas de los mismos colores indican diferencias significativas entre tratamientos, según el test de separación de medias LSD (Least Significant Difference) de Fisher LSD, diferencia mínima significativa, $p < 0,05$.

Figura 17. Longitud (cm) del hipocótilo, radícula y total de las plántulas de *Papaver rhoeas* en función del tratamiento.

El carvacrol muestra un claro efecto dosis-respuesta sobre el crecimiento de las plántulas de *Papaver rhoeas*.

4.2. ENSAYOS IN VIVO

En este apartado se recogen todos los resultados obtenidos una vez finalizado el ensayo en el invernadero, transcurridos 30 días desde la aplicación de los tratamientos, los cuales se realizaron cuando las plantas tenían entre 3 y 4 hojas verdaderas.

4.2.1. *Avena fatua* L.

La primera evaluación se realizó sobre la eficacia y el nivel de daño del carvacrol en función de la dosis y la forma de aplicación de este.

Los resultados mostrados en la tabla 6 indican, en primer lugar, que hubo diferencias estadísticamente significativas entre las dosis ensayadas, así como entre las distintas formas de aplicación: riego (R) y pulverizado (P), en una misma dosis.

En segundo lugar, las dosis elevadas fueron las que mayor efecto tuvieron sobre la arvense y también fueron más efectivos los tratamientos aplicados mediante pulverización para el control de *Avena fatua* respecto a los aplicados mediante riego.

El tratamiento más eficaz, consiguiendo controlar el 100% de la arvense, fue la dosis máxima de carvacrol aplicada por pulverización (CARV-P-5).

Tabla 6. Eficacia y nivel de daño del carvacrol sobre *Avena fatua* en función del tratamiento y la forma de aplicación.

Tratamiento	Eficacia	Nivel de daño
CONT-P	0 \pm 0 d	0 \pm 0 f
CONT-R	0 \pm 0 d	0 \pm 0 f

DMSO-P	0 ± 0 d	0,2 ± 0,1 f
DMSO-R	0 ± 0 d	0 ± 0 f
CARV-P-1	0 ± 0 d	0,3 ± 0,2 ef
CARV-R-1	0 ± 0 d	0,1 ± 0,1 f
CARV-P-2	0 ± 0 d	0,3 ± 0,2 ef
CARV-R-2	0 ± 0 d	0,4 ± 0,2 ef
CARV-P-3	10 ± 10 cd	0,9 ± 0,3 d
CARV-R-3	0 ± 0 d	0,1 ± 0,1 f
CARV-P-4	40 ± 16,3 b	2,3 ± 0,2 b
CARV-R-4	10 ± 10 cd	0,7 ± 0,3 de
CARV-P-5	100 ± 0 a	3 ± 0 a
CARV-R-5	20 ± 13 c	1,5 ± 0,3 c

Los datos presentados son media ± error estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,15$), tras ANOVA y test LSD (Least significant difference) de Fisher.

En cuanto al nivel de daño se observa una variación significativa entre los tratamientos. Los tratamientos con las mayores concentraciones de carvacrol fueron los más eficaces para el control de la mala hierba, destacando el CARV-P-5, el cual logró una eficacia del 100%.

4.2.1.1. Resultados sobre la aplicación de carvacrol pulverizado.

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos respecto a la eficacia y el nivel de daño del uso de carvacrol aplicado mediante pulverización para cada una de las dosis ensayadas. Las dosis CONTROL, DMSO, CARV-P-1 y CARV-P-2 no mostraron diferencias entre ellas y su eficacia para el control de la arvense fue baja. Por otro lado, las dosis elevadas (CARV-P-3, CARV-P-4 y CARV-P-5) fueron las que presentaron mayor eficacia, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre ellas. El tratamiento CARV-P-5 fue el único que consiguió erradicarla por completo.

Tabla 7. Eficacia y nivel de daño del carvacrol sobre *Avena fatua* aplicado mediante pulverización en función del tratamiento.

Tratamiento	Eficacia	Nivel de daño
CONT-P	0 ± 0 c	0 ± 0 d
DMSO-P	0 ± 0 c	0,2 ± 0,1 d
CARV-P-1	0 ± 0 c	0,3 ± 0,2 d
CARV-P-2	0 ± 0 c	0,3 ± 0,2 d
CARV-P-3	10 ± 10 c	0,9 ± 0,3 c
CARV-P-4	40 ± 16,3 b	2,3 ± 0,2 b
CARV-P-5	100 ± 0 a	3 ± 0 a

Los datos presentados son media ± error estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,15$), tras ANOVA y test LSD (Least significant difference) de Fisher.

En cuanto al nivel de daño, los tratamientos CONT-P, DMSO-P, CARV-P-1 y CARV-P-2, presentaron niveles de daño bajos, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellos. A medida que aumentó la concentración de carvacrol, el nivel de daño también lo hizo. El tratamiento CARV-P-5 fue el más efectivo y el que más daño provocó a la arvense con diferencias significativas respecto al resto de tratamientos.

En la siguiente tabla (Tabla 8) se recogen los parámetros de crecimiento respecto a la longitud total (LT), longitud del tallo (Lt) y longitud de la raíz (LR) en las plantas de *Avena fatua*.

Tabla 8. Parámetros de crecimiento (longitud) de las plantas de *Avena fatua* tratadas con carvacrol pulverizado en función de su tratamiento.

Tratamiento	LT (cm)	Lt (cm)	LR (cm)
CONT-P	73,6 ± 2,3 a	50,4 ± 1,8 a	23,2 ± 1,0 a
DMSO-P	66,9 ± 2,0 b	43,5 ± 2,0 b	23,4 ± 0,7 a
CARV-P-1	61,3 ± 2,1 b	43,1 ± 1,9 bc	18,2 ± 0,7 b
CARV-P-2	61,0 ± 1,9 b	43,1 ± 1,6 bc	17,9 ± 0,6 b
CARV-P-3	61,3 ± 2,3 b	43,1 ± 2,0 bc	18,2 ± 0,7 b
CARV-P-4	45,2 ± 6,5 c	31,7 ± 4,7 c	13,4 ± 2,1 b
CARV-P-5	-	-	-

Los datos presentados son media ± error estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,15$), tras ANOVA y test LSD (Least significant difference) de Fisher.

Analizando el efecto provocado por los distintos tratamientos, se observó que las plantas tratadas con la dosis CARV-P-4 redujeron significativamente la longitud total respecto a la dosis CONT-P, siendo esta reducción de un 39% de su tamaño. En relación con la longitud total y la longitud del tallo, el DMSO-P mostró diferencias significativas respecto al control. Además, cabe destacar que, la longitud de la raíz no obtuvo diferencias estadísticamente significativas entre las distintas dosis de carvacrol aplicadas, provocando todas una reducción semejante de su longitud. No obstante, sí que hubo diferencias significativas entre el CONT-P y DMSO-P, respecto a las dosis ensayadas que incluyen carvacrol. Los valores de las plantas tratadas con CARV-P-5 no se muestran puesto que estaban muertas al finalizar el ensayo.

Continuando con los parámetros de crecimiento, en la Tabla 9 se muestran los valores de peso fresco (PF) y peso seco (PS) transcurridos 30 días desde la aplicación.

Tabla 9. Parámetros de crecimiento (peso) de las plantas de *Avena fatua* tratadas con carvacrol pulverizado en función de su tratamiento.

Tratamiento	PF (g)	PS (g)
CONT-P	8,0 ± 0,3 a	1,0 ± 0,1 a
DMSO-P	7,3 ± 0,5 ab	0,9 ± 0,1 a
CARV-P-1	6,4 ± 0,5 bc	0,6 ± 0,1 b
CARV-P-2	6,0 ± 0,5 bc	0,6 ± 0,0 b
CARV-P-3	5,2 ± 0,7 c	0,3 ± 0,1 c
CARV-P-4	1,7 ± 0,3 d	0,2 ± 0,1 c
CARV-P-5	-	-

Los datos presentados son media ± error estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,15$), tras ANOVA y test LSD (Least significant difference) de Fisher.

Las plantas tratadas con carvacrol tuvieron valores de peso fresco significativamente menores que las plantas control y DMSO. La dosis CARV-P-4 fue la que mayor reducción presentó, siendo esta próxima al 79% respecto al control. En cuanto al peso seco se observaron diferencias estadísticamente significativas por grupos, quedando agrupados CONT-P y DMSO-P, CARV-P-1 y CARV-P-2, y CARV-P-3 y CARV-P-4, ordenados de mayor a menor peso seco. Las plantas tratadas con CARV-P-5 no resistieron la dosis de aplicación.

4.2.1.2. Resultados sobre la aplicación de carvacrol vía riego.

En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos respecto a la eficacia y el nivel de daño del uso de carvacrol aplicado mediante riego para cada una de las dosis ensayadas. Las dosis CONT-R, DMSO-R, CARV-R-1, CARV-R-2 y CARV-R-3 fueron ineficaces para el control de *Avena fatua*., asimismo las diferencias significativas entre estos tratamientos fueron ausentes. Cabe destacar que la dosis CARV-R-4 careció de diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo anterior, no obstante, mostró eficacia sobre la arvense. El tratamiento CARV-R-5 resultó el más eficaz del conjunto a pesar de no controlar por completo la mala hierba.

Tabla 10. Eficacia y nivel de daño del carvacrol sobre *Avena fatua* aplicado mediante riego en función del tratamiento.

Tratamiento	Eficacia	Nivel de daño
CONT-R	0 ± 0 b	0 ± 0 c
DMSO-R	0 ± 0 b	0 ± 0 c
CARV-R-1	0 ± 0 b	0,1 ± 0,1
CARV-R-2	0 ± 0 b	0,4 ± 0,2 bc
CARV-R-3	0 ± 0 b	0,1 ± 0,1 c
CARV-R-4	10 ± 10 ab	0,7 ± 0,3 b
CARV-R-5	20 ± 13,3 a	1,5 ± 0,3 a

Los datos presentados son media ± error estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0,15), tras ANOVA y test LSD (Least significant difference) de Fisher.

Tanto la eficacia como el nivel de daño mostraron una dosis-respuesta, ya que al incrementar la dosis de carvacrol el efecto sobre la planta fue mayor.

En la siguiente tabla (Tabla 11) están agrupados los parámetros de crecimiento respecto a la longitud total (LT), longitud del tallo (Lt) y longitud de la raíz (LR) en las plantas de *Avena fatua*.

Tabla 11. Parámetros de crecimiento (longitud) de las plantas de *Avena fatua* tratadas con carvacrol vía riego en función de su tratamiento.

Tratamiento	LT (cm)	Lt (cm)	LR (cm)
CONT-R	78,1 ± 2,8 b	53,0 ± 2,6 ab	25,1 ± 1,0 ab
DMSO-R	83,1 ± 2,8 a	56,2 ± 2,1 a	26,9 ± 1,0 a
CARV-R-1	75,1 ± 1,5 b	52,0 ± 1,6 ab	23,1 ± 0,6 b
CARV-R-2	72,5 ± 1,8 bc	49,6 ± 1,4 bc	22,9 ± 1,1 b
CARV-R-3	67,5 ± 1,6 cd	49,7 ± 1,6 bc	17,8 ± 0,5 c
CARV-R-4	61,7 ± 2,3 de	44,3 ± 2,3 cd	17,4 ± 0,7 c
CARV-R-5	55,6 ± 1,5 e	41,0 ± 1,6 d	14,6 ± 0,4 d

Los datos presentados son media ± error estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0,15), tras ANOVA y test LSD (Least significant difference) de Fisher.

El tratamiento CARV-R-5 fue el que alcanzó una mayor reducción del tamaño de la planta, en cuanto a longitud total, longitud del tallo y de la raíz, siendo estas del 26%, 25% y 36% respectivamente. Cabe destacar que las plantas tratadas con DMSO vía riego mostraron mayor crecimiento tanto en tallo como en raíz respecto al total de tratamientos, habiendo diferencias significativas en la longitud total frente al CONT-R.

Permaneciendo en los parámetros de crecimiento, en la Tabla 12 se muestran los valores de peso fresco (PF) y peso seco (PS). En este caso y en relación con las longitudes comentadas anteriormente, fue el tratamiento CARV-P-5 el que presentó de forma significativa menor peso

fresco que el resto de las plantas. De igual forma, las plantas tratadas con DMSO-R fueron las que mayor peso fresco obtuvieron, siendo este un 57% superior respecto al más pequeño.

En cuanto al peso seco no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos realizados.

Tabla 12. Parámetros de crecimiento (peso) de las plantas de *Avena fatua* tratadas con carvacrol vía riego en función de su tratamiento.

Tratamiento	PF (g)	PS (g)
CONT-R	9,5 ± 0,2 ab	1,4 ± 0,3 a
DMSO-R	10,1 ± 0,9 a	2,1 ± 0,4 a
CARV-R-1	9,6 ± 0,7 ab	1,4 ± 0,3 a
CARV-R-2	8,8 ± 0,2 abc	1,3 ± 0,2 a
CARV-R-3	8,5 ± 0,3 bc	1,2 ± 0,3 a
CARV-R-4	7,9 ± 0,3 c	1,1 ± 0,2 a
CARV-R-5	4,4 ± 0,2 d	0,9 ± 0,2 a

Los datos presentados son media ± error estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,15$), tras ANOVA y test LSD (Least significant difference) de Fisher.

4.2.2. *Triticum aestivum* L.

La primera evaluación se realizó sobre la eficacia y el nivel de daño del carvacrol en función de la dosis y la forma de aplicación de este. Los resultados mostrados en la tabla 13 indican, en primer lugar, que hubo diferencias estadísticamente significativas entre la media de eficacia entre un nivel de tratamiento y otro. En segundo lugar, el tratamiento realizado con CARV-5 y aplicado vía riego fue el único que ha perjudicado al cultivo.

Tabla 13. Eficacia y nivel de daño del carvacrol sobre *Triticum aestivum* en función del tratamiento y el modo de aplicación.

Tratamiento	Eficacia	Nivel de daño
CONT-P	0 ± 0 b	0 ± 0 c
CONT-R	0 ± 0 b	0 ± 0 c
DMSO-P	0 ± 0 b	0 ± 0 c
DMSO-R	0 ± 0 b	0 ± 0 c
CARV-P-1	0 ± 0 b	0 ± 0 c
CARV-R-1	0 ± 0 b	0 ± 0 c
CARV-P-2	0 ± 0 b	0 ± 0 c
CARV-R-2	0 ± 0 b	1 ± 0 b
CARV-P-3	0 ± 0 b	0 ± 0 c
CARV-R-3	0 ± 0 b	1 ± 0 b
CARV-P-4	0 ± 0 b	0 ± 0 c
CARV-R-4	0 ± 0 b	1 ± 0 b
CARV-P-5	0 ± 0 b	0 ± 0 c
CARV-R-5	20 ± 13,3 a	1,4 ± 0,3 a

Los datos presentados son media ± error estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,15$), tras ANOVA y test LSD (Least significant difference) de Fisher.

4.2.2.1. Resultados sobre la aplicación de carvacrol pulverizado.

En la siguiente tabla (Tabla 14) se observa la eficacia y el nivel de daño del carvacrol sobre plantas de *Triticum aestivum* aplicado mediante pulverización en las hojas. De la misma se puede concluir que no hubo respuesta a ninguna de las dosis sobre las plantas ni diferencias significativas entre ellas.

Tabla 14. Eficacia y nivel de daño del carvacrol sobre *Triticum aestivum* aplicado mediante pulverización en función del tratamiento.

Tratamiento	Eficacia	Nivel de daño
CONT-P	0 ± 0 a	0 ± 0 c
DMSO-P	0 ± 0 a	0 ± 0 c
CARV-P-1	0 ± 0 a	0 ± 0 c
CARV-P-2	0 ± 0 a	1 ± 0 b
CARV-P-3	0 ± 0 a	1 ± 0 b
CARV-P-4	0 ± 0 a	1 ± 0 b
CARV-P-5	0 ± 0 a	1,4 ± 0,3 a

Los datos presentados son media ± error estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,15$), tras ANOVA y test LSD (Least significant difference) de Fisher.

A pesar de que la eficacia del carvacrol no varió entre tratamientos, sí que lo hizo en cuanto al nivel de daño que le causó al cultivo.

Considerando el efecto provocado por los distintos tratamientos sobre los parámetros de crecimiento longitud total (LT), longitud del tallo (Lt) y longitud de la raíz (LR) (Tabla 15), se observó que, en cuanto a la longitud total, las plantas tratadas con DMSO y CARV-P-1 que sobrevivieron a los tratamientos no presentaron diferencias significativas con respecto a las control, en cambio, las plantas tratadas con las dosis CARV-P-2, 3 y 4 presentaron una longitud significativamente menor que las control pero no que las tratadas con DMSO, mientras que las tratadas con CARV-P-5 no presentaron diferencias con las control. Esto quiere decir que las plantas que sobrevivieron de los distintos tratamientos presentaron longitudes similares. En cuanto al efecto de estos tratamientos sobre la longitud de la parte aérea (Tabla 15) se observó que la primera dosis de carvacrol ejerció un cierto efecto estimulante sobre el crecimiento de la parte aérea, ya que las plantas tratadas que sobrevivieron presentaron una longitud de parte aérea mayor que las control, mientras que las tratadas con la dosis CARV-P-2 presentaron diferencias significativas con las control en cuanto a la longitud de la parte aérea pero no con las plantas tratadas con las siguientes dosis más altas, ni con las tratadas con DMSO (Tabla 15). No se observaron diferencias significativas en cuanto a la longitud de las raíces de las plantas de los diferentes tratamientos (Tabla 15).

Tabla 15. Parámetros de crecimiento (longitud) de las plantas de *Triticum aestivum* tratadas con carvacrol pulverizado en función de su tratamiento.

Tratamiento	LT (cm)	Lt (cm)	LR (cm)
CONT-P	83,0 ± 2,0 ab	57,6 ± 1,2 b	25,4 ± 1,0 a
DMSO-P	80,0 ± 2,0 bc	56,6 ± 1,4 bc	23,3 ± 1,6 a
CARV-P-1	85,7 ± 1,3 a	63,8 ± 1,3 a	21,9 ± 1,2 a
CARV-P-2	77,8 ± 1,3 c	53,3 ± 1,3 d	24,5 ± 0,7 a
CARV-P-3	77,4 ± 1,8 c	54,0 ± 1,4 cd	23,4 ± 0,9 a
CARV-P-4	75,4 ± 1,8 c	55,6 ± 1,1 bcd	20,8 ± 0,8 a
CARV-P-5	78,6 ± 0,8 bc	55,8 ± 0,3 bcd	22,8 ± 0,9 a

Los datos presentados son media \pm error estándar de las plantas vivas al final del ensayo. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,15$), tras ANOVA y test LSD (Least significant difference) de Fisher.

De la misma manera que ocurrió con la longitud de las plantas, respecto al peso fresco (PF) y al peso seco (PS) fue la dosis de CARV-P-1 la que mayor peso obtuvo, habiendo diferencias significativas en el peso fresco frente al CONT-P y DMSO-P. Además, las plantas tratadas con CARV-P-2 tuvieron menor peso fresco que las tratadas con CARV-P-3 y 4, presentando diferencias significativas entre ellas. (Tabla 16).

Tabla 16. Parámetros de crecimiento (peso) de las plantas de *Triticum aestivum* tratadas con carvacrol pulverizado en función de su tratamiento.

Tratamiento	Peso fresco	Peso seco
CONT-P	6,6 \pm 0,4 b	3,0 \pm 0,4 ab
DMSO-P	6,5 \pm 0,4 b	3,1 \pm 0,4 a
CARV-P-1	7,8 \pm 0,5 a	3,2 \pm 0,5 a
CARV-P-2	3,7 \pm 0,2 d	1,3 \pm 0,0 c
CARV-P-3	5,4 \pm 0,3 c	2,1 \pm 0,3 bc
CARV-P-4	6,7 \pm 0,4 b	2,3 \pm 0,4 ab
CARV-P-5	6,5 \pm 0,3 b	0,0 \pm 0,0 d

Los datos presentados son media \pm error estándar de las plantas vivas al final del ensayo. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,15$), tras ANOVA y test LSD (Least significant difference) de Fisher.

4.2.2.2. Resultados sobre la aplicación de carvacrol vía riego.

Los tratamientos ensayados en el cultivo de *Triticum aestivum* sobre la aplicación de carvacrol mediante el riego mostraron que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de eficacia entre un nivel de tratamiento y otro. Es importante mencionar que el tratamiento CARV-R-5 fue el único que perjudicó al cultivo, provocando el deceso de dos plantas. No obstante, respecto al nivel de daño las plantas tratadas con CARV-R-2, 3 y 4 presentaron daños ligeros significativamente diferentes a CARV-R-5 (Tabla 17).

Tabla 17. Eficacia y nivel de daño del carvacrol sobre *Triticum aestivum* aplicado mediante riego en función del tratamiento.

Tratamiento	Eficacia	Nivel de daño
CONT-R	0 \pm 0 b	0 \pm 0 c
DMSO-R	0 \pm 0 b	0 \pm 0 c
CARV-R-1	0 \pm 0 b	0 \pm 0 c
CARV-R-2	0 \pm 0 b	1 \pm 0 b
CARV-R-3	0 \pm 0 b	1 \pm 0 b
CARV-R-4	0 \pm 0 b	1 \pm 0 b
CARV-R-5	20 \pm 13,3 a	1,4 \pm 0,3 c

Los datos presentados son media \pm error estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,15$), tras ANOVA y test LSD (Least significant difference) de Fisher.

En la Tabla 18 se muestra el efecto de los distintos tratamientos sobre los parámetros de crecimiento de las plantas longitud total (LT), longitud del tallo (Lt) y longitud de la raíz (LR). En este caso, respecto a la longitud total no hubo diferencias significativas entre el tratamiento CONT-R y el tratamiento CARV-R-2, tampoco frente a CARV-R-5. Esto indicó que el carvacrol aplicado vía riego en plantas de *Triticum aestivum* en las condiciones en las que se realizó el ensayo, no afecta al cultivo. Por otro lado, la longitud de las raíces tampoco se vio afectada, siendo en este caso no significativas las diferencias entre tratamientos.

Tabla 18. Parámetros de crecimiento (longitud) de las plantas de *Triticum aestivum* tratadas con carvacrol vía riego en función de su tratamiento.

Tratamiento	LT (cm)	Lt (cm)	LR (cm)
CONT-R	80,6 ± 1,2 ab	60,1 ± 0,8 a	20,5 ± 1,1 a
DMSO-R	77,0 ± 2,4 bc	55,5 ± 1,6 bc	21,6 ± 1,4 a
CARV-R-1	74,9 ± 1,6 c	52,8 ± 0,4 c	22,1 ± 1,5 a
CARV-R-2	81,9 ± 2,6 ab	59,4 ± 1,5 a	22,5 ± 1,6 a
CARV-R-3	74,9 ± 1,5 c	53,8 ± 1,1 bc	21,2 ± 1,0 a
CARV-R-4	82,6 ± 1,3 a	59,6 ± 1,4 a	22,9 ± 1,4 a
CARV-R-5	77,3 ± 1,6 abc	56,6 ± 0,7 ab	20,7 ± 1,4 a

Los datos presentados son media ± error estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,15$), tras ANOVA y test LSD (Least significant difference) de Fisher.

Por último, en cuanto al peso fresco (PF) y el peso seco (PS) se muestran los datos de los resultados obtenidos en la Tabla 19. Se observaron diferencias significativas en cuanto al peso fresco de las plantas control y las tratadas con todos los tratamientos excepto CARV-R-5, no se observó un efecto dosis-respuesta en este parámetro. Las plantas tratadas con la dosis CARV-R-3 fueron las que menor peso fresco presentaron (Tabla 19). Las plantas tratadas con DMSO también presentaron un peso fresco significativamente menor que las control, lo que indica un efecto fitotóxico de este compuesto. En cuanto al peso seco (Tabla 19), las plantas tratadas con DMSO también presentaron un peso seco significativamente menor que las control, confirmando cierto efecto fitotóxico del compuesto. Las plantas tratadas con CARV-R-1, 4 y 5 no presentaron diferencias en cuanto a peso seco con respecto a las control, mientras que las tratadas con CARV-R-2 y 3 presentaron un peso seco significativamente distinto de las control, pero no de las tratadas con DMSO. No se observó un efecto dosis-respuesta en este parámetro.

Tabla 19. Parámetros de crecimiento (peso) de las plantas de *Triticum aestivum* tratadas con carvacrol vía riego en función de su tratamiento.

Tratamiento	PF (g)	PS (g)
CONT-R	8,2 ± 0,6 a	3,0 ± 0,5 ab
DMSO-R	4,8 ± 0,5 d	1,6 ± 0,2 cd
CARV-R-1	6,0 ± 0,3 c	2,6 ± 0,4 b
CARV-R-2	4,7 ± 0,3 de	1,7 ± 0,1 cd
CARV-R-3	3,6 ± 0,4 e	1,1 ± 0,1 d
CARV-R-4	6,8 ± 0,3 bc	2,2 ± 0,3 bc
CARV-R-5	7,4 ± 0,4 ab	3,9 ± 0,3 a

Los datos presentados son media ± error estándar de las plantas que sobrevivieron a los tratamientos. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,15$), tras ANOVA y test LSD (Least significant difference) de Fisher.

5. CONCLUSIONES

En los ensayos de germinación in vitro, se observaron los siguientes efectos de la aplicación de carvacrol en las semillas de *Avena fatua* y *Papaver rhoeas*.

Respecto a *Avena fatua*, la aplicación de carvacrol inhibió la germinación en las dosis más elevadas (CARV-16 y CARV-32). Además, en las dosis menores de carvacrol, se observó una reducción en los parámetros de crecimiento de las plántulas. Los tratamientos con DMSO y el control resultaron en valores similares, sugiriendo que carvacrol tiene un efecto negativo más pronunciado en comparación con estos tratamientos.

En cuanto a *Papaver rhoeas*, el tratamiento con DMSO promovió una mayor germinación de las semillas en comparación con el control. Sin embargo, esta ventaja en la germinación no se mantuvo en los parámetros de crecimiento de las plántulas, donde el control superó a DMSO. Además, la germinación de las semillas de *P. rhoeas* tratadas con CARV-4 no tuvo lugar hasta el séptimo día después de la aplicación, quedando totalmente inhibida en CARV-8, CARV-16 y CARV-32.

En los ensayos in vivo, la aplicación de carvacrol mediante pulverización ha demostrado ser el método más efectivo para el control de la arvense *Avena fatua*, con la dosis de mayor concentración (CARV-P-5) logrando un control total de las plantas. En contraste, la aplicación mediante riego no resultó eficaz para el control directo de la arvense; sin embargo, puede ser útil para reducir su crecimiento, disminuyendo así la competitividad de la arvense respecto al cultivo y, por ende, contribuyendo a la conservación de la biodiversidad.

En cuanto al cultivo de trigo, la aplicación en pulverización del tratamiento CARV-P-5 no causó la muerte del cultivo, aunque sí redujo su crecimiento. Por otro lado, las aplicaciones por riego con dosis altas sí afectaron negativamente al cultivo.

Por lo tanto, se recomienda realizar nuevos ensayos que evalúen la aplicación de carvacrol en diferentes estados fenológicos y con otras dosis, con el fin de determinar el momento y la dosis óptimos para su aplicación, minimizando el impacto adverso en los cultivos mientras se maximiza el control de las malas hierbas.

6. BIBLIOGRAFÍA

BATISH, D., SINGH, H., KOHLI, R., KAUR, S. (2008). Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management* 256, 2166-2174.

BENNER, J.P- (1996). Crop protection agents from higher plant. An overview, en: Copping, L. G. (Ed.), *Crop protection agents from nature: natural products and analogues*. The Royal Society of Chemistry Cambridge, England, pp. 217-229.

CÓRDOBA, O., CASAS, H. (2003). Principales arvenses asociadas al cultivo de frijol en la Región Andina. *Guía de Reconocimiento*. Estación Experimental El Nus.

CRUZ, L., FLORES, M. (2021). Avances en el desarrollo de nuevos herbicidas biológicos a partir de extractos vegetales fitotóxicos aplicado in vitro. *Informador técnica*, 86 (1), 18-29.

DAYAN, F., CANTRELL, C., DUKE, S. (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 17, 4022-4034.

DUKE, S., DAYAN, F., ROMAGNI, J., RIMANDO, A., (2000). Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. *Weed research* 40, 99-111.

DE ASSIS ALVES, T., PINHEIRO, P.F., PRAÇA-FONTES, M., ANDRADE-VIEIRA, L-F., CORRÊA, K.B., SOARES, T. C. B. (2018). Toxicity of thymol, carvacrol and their respective phenoxyacetic acids in *Lactuca sativa* and *Sorghum bicolor*. *Industrial crops and products*, 114, 59-67.

FERNÁNDEZ, A. (1982). Manejo Integrado de Malezas. *Planta Daninha* V (2): 69-79.

GARCÍA, L., FERNÁNDEZ-QUINTANILLA, C. (1991). *Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ediciones MundiPrensa. Madrid.

GÓMEZ, A.J., IBAÑEZ, L. (1980). La avena loca en el cultivo cerealista. Ministerio de Agricultura. Hojas divulgadoras. Núm. 17-18/80 HD.

JOUINI, A. (2020). Herbicidal activity of Mediterranean essential oils and their effects on soil bioindicators. *Dottorato di Ricerca Internazionale in Biodiversità Mediterranea*. Dipartimento di Scienze Agraria, Alimentari e Forestali. P 34.

LABRADA R. (1992). Weed Management- a component of IPM. *Proceedings, International Workshop "Weed Management of Asia and the Pacific Region"*, IAST (Taegu, Korea) FAO, Special supplement No.7 pp 5-14.

LANGENHEIM, J. (1994). Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology* 20, 1223-1280.

MACIAS, F. A. (1995). Allelopathy in the search for natural herbicide model. *ACS Symposium series* 582, 310-329.

MACIAS, F. A., MOLINILLO, J. M., VALERA, R., GALINDO J. C. (2007). Allelopathy a natural alternative for weed control. *Pest Management Science* 63, 327-348.

PARKER, C., FRYER, J. (1975). Problemas de control de malezas que provocan una importante reducción del suministro mundial de alimentos. *Boletín de Protección Fitosanitaria de la FAO* 23 (3/4): 83-95.

BIBLIOGRAFÍA

PUTNAM, A. R. (1983). Allelopathic chemicals: nature's herbicides in action. *Chemical and Engineering News* 61, 34-45.

PINILLA, C. H., GARCÍA, J.M. (2001). Manejo integrado de malezas en plantaciones de banano. Unibán. Urabá. P 11-48.

REY-CABALLERO J, TORRA J & RECASENS J, 2014. "Manejo integrado de amapola (*Papaver rhoeas*) resistente". *Salamaq-Feria del Sector Agropecuario* 220, 56-63.

RICE, E.L. (1984). *Allelopathy*, second ed. Academic Press. Orlando, Florida.

STANKIEWICZ-KOSYL M, SYNOWIEC A, HALINIARZ M, WENDA-PIESIK A, DOMARADZKI K, PARYLAK D, WROCHNA M, PYTLARZ E, GALA-CZEKAJ D, MARCZEWSKA-KOLASA K, MARCINKOWSKA K & PRACZYK T, 2020. "Herbicide Resistance and Management Options of *Papaver rhoeas* L. and *Centaurea cyanus* L. in Europe: A Review". *Agronomy* 10(874), 1-22.

STONARD, R.J., MILLER-WIDEMAN, M. A. (1995). *Herbicides and plant growth regulators*. Godfrey, C.R.A. (Ed.), *Agrochemicals from natural products*. Marcel Dekker, New York, pp. 285-310.

TORRES, N. (2019). Estudio de la actividad herbicida de tres compuestos naturales sobre arvenses importantes en cultivos mediterráneos para su desarrollo como producto comercial. Trabajo fin de máster universitario en Ingeniería Agronómica. Universitat Politècnica de València.

VERDEGUER, M. (2011). Fitotoxicidad de aceites esenciales y extractos acuosos de plantas mediterráneas para el control de arvenses. Tesis doctoral. Universitat Politècnica de València.

VYVYAN, J.R. 2001. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron* 58, 1631-1646.

ZIMDAHL, R. L. 2018. *Fundamentals of weed science*. Academic Press. ELSERVIER.