
ACTIVIDAD FITOTÓXICA *IN VITRO* DE EXTRACTOS ACUOSOS DE *SANTOLINA CHAMAECYPARISSUS* L.



DEPARTAMENTO DE ECOSISTEMAS AGROFORESTALES

TESIS FINAL DE MÁSTER

Francisco Raga Casañ

Directora: Mercedes Verdeguer Sancho

Valencia, septiembre de 2013

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	2
1.1 Herbicidas naturales.....	2
1.2 <i>Santolina chamaecyparissus</i> L.....	3
1.3 Arvenses seleccionadas.....	6
1.4 Objetivos.....	8
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
2.1 Material vegetal.....	8
2.2 Obtención de extractos acuosos de flores y hojas de <i>Santolina chamaecyparissus</i>	8
2.3 Ensayos de actividad herbicida <i>in vitro</i>	9
2.4 Análisis estadístico de datos.....	10
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
3.1 Efectos del extracto acuoso de hojas de <i>Santolina chamaecyparissus</i> sobre la germinación y el crecimiento de arvenses.....	11
3.2 Efectos del extracto acuoso de flores de <i>Santolina chamaecyparissus</i> sobre la germinación y el crecimiento de arvenses.....	13
4. CONCLUSIONES.....	16
5. BIBLIOGRAFÍA.....	17

1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Herbicidas naturales.

Uno de los problemas a los que se enfrenta la agricultura es el control de las malas hierbas, que pueden interferir en el desarrollo de los cultivos, causando una reducción de la producción, tanto en calidad como en cantidad, de las cosechas, y acarreado en consecuencia pérdidas económicas a los agricultores. Las malas hierbas son responsables del 12% de las pérdidas de producción en los cultivos del mundo (Anaya, 1999). Existen diferentes métodos para controlar las plantas arvenses, siendo el uso de herbicidas sintéticos el más extendido. En todo el mundo, alrededor del 60% de los pesticidas comercializados son herbicidas, y en 2002 las ventas globales de herbicidas fueron de 28 millones de dólares (Anaya, 1999; Singh, 2005). Sin embargo, la aplicación indiscriminada de herbicidas sintéticos tiene un impacto negativo debido a la contaminación del suelo y de los acuíferos, provocando toxicidad a los organismos vivos, incluyendo a los seres humanos. Además, el número de malas hierbas resistentes a los herbicidas disponibles se va incrementando continuamente. Actualmente se han reportado 403 casos únicos de resistencias a herbicidas a nivel global (especies x mecanismo de acción), con 218 especies (129 dicotiledóneas y 89 monocotiledóneas). Las especies arvenses han desarrollado resistencia a 21 de los 25 mecanismos de acción conocidos de los herbicidas, y a 148 herbicidas diferentes (Heap, 2013). Todo esto hace necesario buscar nuevos componentes con actividad herbicida que sean respetuosos con el medio ambiente. Las plantas poseen como característica general ser sedentarias, desarrollándose en el mismo lugar donde germinan, este hecho limita a las plantas su movilidad y por tanto su capacidad de escape, el principal mecanismo de defensa en la naturaleza. Sin embargo, esta limitación ha sido en parte compensada con otros mecanismos defensivos, como la comunicación con su entorno, que le permite detectar agentes que pueden ser perjudiciales. Dentro de los sistemas de comunicación, aquellos mediados por agentes químicos han sido los más estudiados, en especial aquellos que tienen lugar entre diferentes especies, donde un agente químico es el responsable de controlar tal comunicación. Este fenómeno es conocido como aleopatía, y los agentes causantes de la comunicación son denominados aleloquímicos, capaces de reducir o inhibir el crecimiento de otra planta en el entorno de la planta fuente (Oliveros-Bastidas, 2008). La naturaleza y los modos de acción de los aleloquímicos son diversos, pueden ser liberados mediante volatilización, exudación, lixiviación y descomposición de tejidos vegetales (Verdeguer, 2011). Algunos

investigadores prefieren inicialmente la extracción acuosa del material vegetal porque afirman que la interferencia alelopática es más probable debido a compuestos solubles en agua que son introducidos en el medio ambiente (Vyvyan, 2002). La alelopatía también ha sido utilizada en agro-ecosistemas con fines prácticos; entre otros cabe destacar la utilización de cubiertas alelopáticas vegetales (Ormeño, 1999), las rotaciones con cultivos alelopáticos (Barnes y Putnam, 1986) y el uso de extractos fitotóxicos de plantas alelopáticas (Duke *et al.*, 1997). Los metabolitos secundarios producidos por algunas especies que reducen la germinación y el desarrollo de otras pueden servir para el desarrollo de herbicidas naturales, teniendo algunas ventajas sobre los herbicidas sintéticos convencionales, como el hecho de que por su diversidad estructural pueden tener modos de acción distintos, actuando en diferentes puntos del metabolismo y creando menores problemas de resistencias que los herbicidas sintéticos (Verdeguer, 2011).

1.2. *Santolina chamaecyparissus* L.

En el presente trabajo nos planteamos estudiar el potencial alelopático de los extractos acuosos de *Santolina chamaecyparissus* L. para su posible desarrollo como herbicida natural.

S. chamaecyparissus, es una planta perenne, con numerosos tallos leñosos rectos que alcanzan hasta 60 cm de altura. Los tallos floridos son simples. Las hojas son glabras a tomentosas, angostas y lineales, y están profundamente divididas desde la base hasta el vértice en lóbulos cortos, no superiores a 2 mm de longitud y dispuestos en varias filas. Son escasas en la parte superior del tallo, y ausentes en la parte apical. Los capítulos son terminales, hemiesféricos y subglobulosos, sobre pedúnculos un poco hinchados en el vértice. Todos los capítulos son iguales, carecen de flores liguladas, comunes en otras especies; las flores son amarillas, gamopétalas, tubuladas y con cinco dientes en su extremo. Las del centro son hermafroditas y las de la periferia femeninas (Giner y Ríos, 2000).



Santolina chamaecyparissus

retrasarse

Florece entre mayo y junio, pudiendo según el clima de la zona. Desde el punto de vista ecológico esta especie es un caméfito basófilo y subnitrófilo, originario de Europa

meridional y frecuente en la parte oriental de la Península Ibérica. Se desarrolla en los collados y laderas pedregosas y arcillosas, principalmente sobre materiales ricos en bases, en suelos calcáreos y silíceos, desde el nivel del mar hasta cerca de los 2000 m de altura. Alcanza su óptimo en los pisos de vegetación termomediterráneo y mesomediterráneo. Crece silvestre en la región mediterránea, sobre todo en los campos de cultivo de secano (almendros, olivos, etc.), especialmente cuando dejan de ser labrados, en barbechos, pastizales, orillas de caminos, pistas forestales, junto con romeros, tomillos y aliagas. Se enrarece hasta desaparecer en todo el oeste y noroeste de la península (Giner y Ríos, 2000).

Se cultiva en Europa, Asia y África, debido a las propiedades antihelmínticas, antiespasmódicas y emenagógicas de las infusiones preparadas a partir de sus hojas y flores. Esta hierba también es útil en el tratamiento de infecciones oculares, en la estimulación de la cicatrización de tejidos, en el alivio de las picaduras de insectos y en el tratamiento de trastornos digestivos (Ahuja *et al.*, 2005; Lopez *et al.*, 2008). Extractos de *S. chamaecyparissus* obtenidos por maceración y extracción Soxhlet mostraron diferentes tipos de actividades biológicas: antioxidante (Lopez *et al.*, 2008), antifúngica (Lopez *et al.*, 2008) y antiinflamatoria (Giner *et al.*, 1988), además de ser eficaces contra diferentes tipos de dermatitis (Sala *et al.*, 2000). Además de los extractos realizados con disolventes, también el aceite esencial obtenido por destilación de vapor de las partes aéreas de las plantas con flores mostró una fuerte actividad antifúngica frente a *Candida albicans* (Suresh *et al.*, 1997). Si comparamos los estudios anteriores sobre los aceites esenciales de *S. chamaecyparissus* L. encontramos que la composición química es muy variable (Tabla 1). La existencia de diferentes subespecies puede ser uno de los factores responsables de estas diferencias, junto con el origen geográfico del material vegetal (Garg *et al.*, 2001).

Tabla 1. Porcentaje de los principales componentes del aceite esencial de *S. chamaecyparissus* L. obtenido por destilación (Grosso *et al.*, 2010)

Subespecie	Lugar de recolección	Parte de la planta	Procedimiento Aislamiento	Rendimiento del aceite	Principales componentes
-	-	FLORES	-	0,9	Artemisa ketona (45%) Mirceno (8%)
<i>squarrosa</i>	ESPAÑA	FLORES PARTE AEREA	Destilación por arrastre de vapor	0,4	Alcanfor (25%) Aloaromadendreno (19%), 1,8-Cineol+ <i>p</i> -Cimeno (10%)
-	EGIPTO	PARTE AEREA**	-	1,0	Artemisa ketona (45%), Alcanfor (15%)
-	FRANCIA	FLORES PARTE AEREA*	Destilación por arrastre de vapor	0,1-0,2	Artemisa ketona (25-40%), β -Felandreno (10-15%), Mirceno (8-15%)
-	FRANCIA	HOJAS	Destilación	-	Artemisa ketona (45%), Mirceno (15%)
<i>squarrosa</i>	ESPAÑA	PARTE AEREA*	Destilación por arrastre de vapor	0,2-0,3	Borneol (12-26%), Alcanfor (9-25%), Copaeno (3-15%)
<i>tomentosa</i>	ESPAÑA	PARTE AEREA*	Destilación por arrastre de vapor	0,2	Copaeno (15%), Borneol (11%)
<i>incana</i>	ESPAÑA	PARTE AEREA*	Destilación por arrastre de vapor	1,2	Borneol (28%), Alcanfor (23%) 1,8-Cineol (18%)
<i>magonica</i>	ESPAÑA	PARTE AEREA*	Destilación por arrastre de vapor	1,6	Alcanfor (43%), Cubenol (17%)
-	TURKIA	PARTE AEREA*	Hidrodestilación	1,6	Artemisa ketona (38%), Alcanfor (11%)
-	INDIA (Colinas del sur)	PARTE AEREA**	Hidrodestilación	1,1	Artemisia ketona (32%), 1,8-Cineole (16%), Mirceno (15%)
-	INDIA (Región subtropical)	PARTE AEREA**	Hidrodestilación	-	β -Ocimeno (14%), Limoneno (12%)
-	INDIA (Región templada)	PARTE AEREA*	Hidrodestilación	-	Linalol (12%), β -Ocimeno (10%) Mirceno (10%)

-: no se menciona; *:no se especifica.

No se han encontrado estudios anteriores sobre la actividad herbicida de extractos acuosos de *S. chamaecyparissus*, aunque si existen trabajos sobre la actividad herbicida de esta especie (Grosso *et al.*, 2010). Compuestos volátiles de *S. chamaecyparissus* se

aislaron por hidrodestilación (aceite esencial) y por extracción con fluidos supercríticos (aceite volátil) para comprobar su efecto sobre la germinación de semillas y el crecimiento de raíces y brotes de plántulas de cuatro cultivos (*Zea mays* L., *Triticum durum* L., *Pisum sativum* L., y *Lactuca sativa* L.) y dos malas hierbas (*Portulaca oleracea* L. y *Vicia sativa* L.), comparándose su actividad con la de dos herbicidas sintéticos, AGROCIDE, (ácido 2-metill-4-chlorophenoxiacetico (MCPA) y Prowl (pendimentalina). Los aceites volátiles de *S. chamaecyparissus* parecían prometedoras alternativas a los herbicidas sintéticos, al tener menos efectos perjudiciales sobre los cultivos.

Extractos acuosos de algunas especies han mostrado una actividad herbicida selectiva frente a determinadas arvenses, como el extracto de *Hypericum perforatum* L., que presentó un efecto significativo sobre la germinación de *Amaranthus retroflexus* L., pero no sobre *Portulaca oleracea* L. (Azizi *et al.*, 2006).

1.3. Arvenses seleccionadas.

Para ensayar la actividad herbicida del extracto acuoso de *S. chamaecyparissus* se seleccionaron las arvenses *Amaranthus hybridus*, *Conyza canadensis* y *Portulaca oleracea* por su importancia en diversos cultivos y por presentar resistencias a herbicidas sintéticos.

***Amaranthus hybridus* L.**, también llamado bleo o amaranto, pertenece a la familia Amaranthaceae. Es una planta anual, de germinación primaveral-estival.



Amaranthus hybridus

La plántula es erecta, pelosa o glabrescente, con coloraciones rosadas o purpúreas en el hipocotilo y en el envés de los cotiledones, que son oval-alargados, de 15-25 X 4mm, glabros y peciolados. Las hojas son alternas, oval-alargadas a romboidales, enteras, glabras o glabrescentes y ligeramente mucronadas en su ápice. El tallo es generalmente glabrescente, aunque peloso en la parte superior. Tiene su origen en América tropical

(Recasens y Conesa, 2009) En España se descubrieron las primeras resistencias a herbicidas del grupo C1 / 5 en 1985. Los herbicidas del grupo C1 / 5 son conocidos como inhibidores del Fotosistema II (inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II). La investigación ha demostrado que estos biotipos particulares descubiertos en España son resistentes a la atrazina y que pueden tener resistencia cruzada a otros herbicidas del grupo C1 / 5 (Heap, 2013).

***Conyza canadensis* (L.) Cronquist**, llamada comúnmente erigeron o zamárraga,



pertenece a la familia Compositae. Es una planta anual (bienal), de germinación invernal. La plántula es en roseta, glabrescente y generalmente de color verde brillante. Posee cotiledones de 4 x 2 mm, elípticos o redondeados, glabros y con peciolo aplanados. Las hojas verdaderas son alternas, glabrescentes, pero con los bordes ciliados. Las primeras hojas son pequeñas, enteras o dentadas, con el peciolo claramente diferenciado del limbo, y más tarde se tornan pinnatífidas, aunque una vez desarrollado el tallo son linear-lanceoladas y enteras. Tiene su origen en América del Norte (Recasens y Conesa, 2009). En España esta planta ha

adquirido resistencias a herbicidas del Grupo G / 9, que son más conocidos como Glycinas (Inhiben la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa). Se ha demostrado que estos biotipos particulares son resistentes a glifosato y que pueden tener resistencia cruzada a otros herbicidas del Grupo G / 9 (Heap, 2013).

***Portulaca oleracea* L.**, también llamada verdolaga, pertenece a la familia Portulacaceae.



Es una planta anual, de germinación primaveral-estival. La plántula es en roseta, glabra, más tarde decumbente, y a menudo con tintes rojizos. Posee cotiledones oval-alargados, de hasta 10 mm de longitud, carnosos como las hojas y con coloraciones rojizas en su margen. Las hojas verdaderas son decusadas y espatuladas, redondeadas en el ápice y muy

Portulaca oleracea s, aunque más anchas (Recasens y Conesa, 2009). En 1991 en Estados Unidos esta planta desarrolló una resistencia múltiple (a dos modos de acción herbicidas, en concreto a los grupos C1 / 5 y C2 / 7. Estos biotipos en particular, tienen

resistencia a la atrazina, y el linurón y pueden tener resistencia cruzada a otros herbicidas de los Grupos C1 / 5 y C2 / 7 (Heap, 2013).

1.4. Objetivos.

El principal objetivo de este trabajo es el estudio del potencial fitotóxico de los extractos acuosos de flores y hojas de *Santolina chamaecyparissus* L. para su posible aplicación y desarrollo como herbicidas naturales.

Se plantean para ello los siguientes objetivos parciales:

- Selección de una población espontánea de *S. chamaecyparissus* fuente del material vegetal del que se obtendrán los extractos acuosos.
- Selección de las especies arvenses objeto de estudio (*Portulaca oleracea*, *Conyza canadensis* y *Amaranthus hybridus*).
- Obtención de los extractos acuosos de hojas y flores de *S. chamaecyparissus*.
- Realización de ensayos de inhibición de la germinación y el crecimiento *in vitro* para evaluar el potencial fitotóxico de los extractos acuosos de hojas y flores de *S. chamaecyparissus*.

2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal.

Para la realización de los ensayos *in vitro* se extrajeron y seleccionaron semillas de *Portulaca oleracea* L., *Amaranthus hybridus* L. y *Conyza canadensis* (L.) Cronquist procedentes de plantas recolectadas en estado de fructificación de campos cultivados de la provincia de Valencia entre septiembre de 2010 y noviembre de 2011.

Para la obtención de extractos acuosos se recolectaron partes aéreas de *Santolina chamaecyparissus* L. en estado de floración (finales de junio de 2012) de una población natural situada en el término municipal de Picassent (provincia de Valencia).

2.2. Obtención de extractos acuosos de flores y hojas de *Santolina chamaecyparissus*.

Los extractos acuosos se obtuvieron inmediatamente a partir de planta fresca, según el método descrito por Pérez *et al.* (2002). Para la producción del extracto acuoso de flores,

se maceraron 140,6 g de flores con 2.101 ml de agua destilada y para la obtención del extracto acuoso de hojas se maceraron 132,6 g de hojas con 1.989 ml de agua destilada, introduciéndose en baño maría a 80°C durante 15 minutos.



Material vegetal al baño maría



Pesaje de flores de *S. chamaecyparissus*

A continuación se filtraron las soluciones acuosas obtenidas, extrayéndose de nuevo el marco con la mitad de agua destilada en baño maría a 80°C durante otros 15 minutos.

Se volvió a filtrar y se reunieron los filtrados de ambas extracciones, considerándose los extractos obtenidos las concentraciones del 100%, que se conservaron en congelador a -40°C hasta el momento de su aplicación en los ensayos. Para la preparación de las concentraciones de ensayo, se diluyó con agua destilada el extracto original (100%), obteniéndose las concentraciones de 50, 30 y 10%.

2.3. Ensayos de actividad herbicida *in vitro*

Los ensayos *in vitro* se realizaron sembrando 20 semillas de cada una de las plantas arvenses (*P. oleracea.*, *A. hybridus* y *C. canadensis* en placas petri de 9 cm. de diámetro, utilizando como sustrato cuatro discos de papel de filtro de 9 cm de diámetro y 50 g/m² de espesor, dos de los cuales se situaron debajo de las semillas y los otros dos por encima de estas. Los discos se impregnaron con 4 ml. de agua destilada en las placas control o con la solución correspondiente de 10, 30, 50 y 100% de los extractos acuosos de hojas y de flores de *S. chamaecyparissus*, realizándose cinco repeticiones por cada una de las concentraciones para cada una de las especies ensayadas. Las placas fueron selladas con Parafilm y se incubaron en cámara de germinación marca CLIMAS modelo APG-GROW a

una temperatura de $30.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ durante 16 horas de luz y $20.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ durante 8 horas de oscuridad.

Con el fin de evaluar la actividad fitotóxica de las distintas concentraciones de los extractos acuosos de hojas y de flores de *S.chamaecyparissus* L., se realizaron lecturas de las placas, a los 3, 5, 7, 10 y 14 días. Se registró el número de semillas germinadas y se obtuvieron imágenes digitales de las plántulas crecidas, para medir su longitud (coleoptilo más radícula), procesándolas mediante el programa Image Tool.

Cada vez que se leyeron las placas, se cerraron con Parafilm y no se agregó agua, ni soluciones de los extractos acuosos durante los ensayos.

2.4. Análisis estadístico de datos

Los datos se analizaron mediante el paquete estadístico Statgraphics Plus 5.1., efectuándose un análisis de la varianza (ANOVA) a los resultados obtenidos, porcentajes de germinación y longitud de las plántulas. Los porcentajes de germinación fueron transformados mediante la fórmula $y = \arcsen \sqrt{x}$, donde x era el porcentaje de germinación en tanto por uno antes de proceder a realizar el ANOVA, para satisfacer los requerimientos de homocedasticidad y normalidad de los datos.

El ANOVA se realizó 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%. Previamente se comprobó la homocedasticidad de los datos, mediante el test de Levene.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Efectos del extracto acuoso de hojas de *S. chamaecyparissus* sobre la germinación y el crecimiento de arvenses.

En *A. hybridus* y *C. canadensis* tuvieron efectos inhibitorios significativos sobre la germinación únicamente las concentraciones más altas del extracto (50% y 100%) (Tabla 2), mientras que en *P. oleracea* además de estas dos concentraciones también mostró efecto la del 30%. En las 3 especies se verificó que a mayor concentración del extracto, mayor fue la reducción de la germinación, logrando la concentración del 100% el máximo de inhibición, un 98.9% en *A. hybridus*, un 69.2% en *C. canadensis* y un 62.8% en *P. oleracea*.

Tabla 2. Efecto del extracto acuoso de hojas de *S. chamaecyparissus* sobre la germinación de arvenses.

Concentración (%)	Germinación (% ± e.s.)		
	<i>Amaranthus hybridus</i>	<i>Conyza canadensis</i>	<i>Portulaca oleracea</i>
0(control)	93,0 ± 3,7 ab	91,0 ± 4,0 a	78,0 ± 5,1 a
10	94,1 ± 2,9 b	75,0 ± 10,8 a	70,0 ± 5,2 ab
30	84,0 ± 4,0 a	82,0 ± 6,0 a	60,0 ± 2,7 bc
50	9,0 ± 2,9 c	45,0 ± 11,9 b	50,0 ± 2,7 c
100	1,0 ± 1,0 d	28,0 ± 9,3 b	23,8 ± 8,3 d

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de comparación múltiple de Fisher, intervalos LSD, con un nivel de confianza del 95% ($P \leq 0.05$).

En cuanto a los efectos del extracto acuoso de hojas sobre el crecimiento de plántulas, en *A. hybridus* se produjo una reducción significativa del crecimiento de las plántulas tratadas con las concentraciones 30, 50 y 100%, observándose porcentajes de inhibición del crecimiento de 29,6, 61,1 y 95,4% respectivamente para cada una de ellas. En cambio, sólo la concentración del 100% mostró efectos inhibitorios sobre el crecimiento de plántulas de *C. canadensis* y *P. oleracea*, que presentaron una reducción del 52.8% y 72% respectivamente con respecto a las plántulas control. En *P. oleracea* algunas concentraciones del extracto llegaron a estimular el crecimiento de las plántulas.

Tabla 3. Efecto del extracto acuoso de hojas de *S. chamaecyparissus* sobre el crecimiento de arvenses

Concentración (%)	Longitud (mm ± e.s.)		
	<i>Amaranthus hybridus</i>	<i>Conyza canadensis</i>	<i>Portulaca oleracea</i>
0 (control)	27,63 ± 1,39 a	7,26 ± 0,31 a	8,84 ± 0,52 a
10	23,72 ± 1,23 ab	7,55 ± 0,89 a	10,84 ± 0,62 b
30	21,94 ± 0,57 b	6,35 ± 0,48 a	8,88 ± 0,32 a
50	10,76 ± 2,23 c	5,91 ± 0,57 a	11,52 ± 0,82 b
100	1,27 ± 1,27 d	3,43 ± 0,59 b	2,50 ± 0,47 c

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de comparación múltiple de Fisher, intervalos LSD, con un nivel de confianza del 95% ($P \leq 0.05$).

3.2. Efectos del extracto acuoso de flores de *S. chamaecyparissus* sobre la germinación y el crecimiento de arvenses.

El extracto de flores de *S. chamaecyparissus* mostró un mayor efecto sobre *A. hybridus*, ya que redujo su germinación al ser aplicado a las 3 concentraciones superiores, logrando la máxima inhibición a la concentración de 100% (82%). En *C. canadensis* no se observaron efectos significativos sobre la germinación de las semillas tratadas con respecto a las control, mientras que en *P. oleracea* solamente las semillas tratadas con las concentraciones del 10% y 100% del extracto mostraron diferencias significativas con el control, sin diferencias entre ellas, siendo la inhibición máxima de la germinación del 58,49% (concentración del 10%). En trabajos anteriores se han citado efectos estimulatorios de extractos acuosos aplicados a bajas concentraciones e inhibitorios a altas (Verdeguer, 2011), pero en este caso el efecto inhibitorio de la concentración del 10% es algo anómalo y sería conveniente repetir el ensayo para verificar su efecto.

Tabla 4. Efecto del extracto acuoso de flores de *S. chamaecyparissus* sobre la germinación de arvenses.

Concentración (%)	Germinación (% ± e.s.)		
	<i>Amaranthus hybridus</i>	<i>Conyza canadensis</i>	<i>Portulaca oleracea</i>
control	83,0±3.4 a	85,0±4.2 a	53,0±4.6 ab
10	76,0±6.8 ab	83,0±2.0 a	22,0±4.9 d
30	57,0±8.6 bc	68,0±8.7 a	73.8±6.3 a
50	44,0±11.1 c	86,0±2.4 a	49,0±9.8 bc
100	18,0±8.5 d	87,0±4.1 a	30,0±9.6 cd

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de comparación múltiple de Fisher, intervalos LSD, con un nivel de confianza del 95% ($P \leq 0.05$)

Sólo las plántulas tratadas con la concentración del 100% del extracto mostraron diferencias significativas con el control en *A. hybridus* (33,1% de inhibición). En *C. canadensis* todas las concentraciones del extracto redujeron el crecimiento de las plántulas, sin mostrar diferencias significativas entre ellas. El efecto del extracto de flor sobre *P. oleracea* fue estimulador del crecimiento al aplicarse a las dosis bajas (10 y 30%), mostrando efectos inhibitorios a las dosis altas: las plántulas tratadas con la dosis de 50% presentaron un crecimiento menor que las control, aunque sin diferencias significativas, y las tratadas con 100% si que presentaron una reducción significativa en el crecimiento, del 34,1% respecto a las control.

Tabla 5. Efecto del extracto acuoso de hojas de *S. chamaecyparissus* sobre el crecimiento de arvenses.

Concentración (%)	Longitud (mm ± e.s.)		
	<i>Amaranthus hybridus</i>	<i>Conyza canadensis</i>	<i>Portulaca oleracea</i>
0 (control)	23,71±0,43 a	5,86±0,25 a	9,59±0,66 a
10	23,84±0,52 a	4,75±0,33 b	12,19±2.44 c
30	23,06±0,96 a	4,79±0.29 b	14,45±0.68 bc
50	22,32±1,05 a	4,44±0.20 b	7,29±3.00 ab
100	15,86±3,23 b	4,48±0.38 b	6,32±0.91 d

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de comparación múltiple de Fisher, intervalos LSD, con un nivel de confianza del 95% ($P \leq 0.05$).

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que el extracto acuoso de hojas de *S. chamaecyparissus* fue más efectivo que el de flores, al mostrar mayores efectos inhibitorios sobre la germinación y el crecimiento de todas las arvenses ensayadas.

Si comparamos nuestros resultados con los de estudios anteriores con otros extractos acuosos actuando sobre estas mismas arvenses, como son el extracto de *Lantana camara*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Eriosephalus africanus*, *Cistus ladanifer* y *Artemisia gallica* (Verdeguer, 2011), podemos decir, con respecto al extracto de *L. camara* que el extracto de hojas de *S. chamaecyparissus* fue más efectivo sobre *A. hybridus* y *P. oleracea*, mientras que sobre *C. canadensis* fue más efectivo el extracto de *L. camara*.

Si comparamos el extracto de hoja de *S. chamaecyparissus* con el de *E. camaldulensis*, se observa una efectividad superior de este último, cuando fue aplicado sobre semillas de *A. hybridus* y *C. canadensis*. Sobre *P. oleracea* los efectos de ambos extractos fueron similares, mostrándose ligeramente más efectivo a la máxima concentración el extracto de hoja de *S. chamaecyparissus*.

Al comparar el extracto de hoja de *S. chamaecyparissus* con el de *E. africanus* se observa una actividad similar sobre la germinación de *A. hybridus* y *P. oleracea*, ligeramente superior a la máxima concentración, de *E. africanus*. *C. canadensis* mostró una inhibición de la germinación superior con el extracto acuoso de *E. africanus* en las concentraciones del 10%, 20% y 30%, siendo la concentración del 100 % del extracto acuoso de *S. chamaecyparissus* más eficaz.

Por último, al comparar el extracto de hojas de *S. chamaecyparissus* con los de *C. ladanifer* y *A. gallica* observamos que el primero controla mejor las arvenses *A. hybridus* y *P. oleracea*, mientras que los otros extractos son más activos frente a *C. canadensis*.

El extracto de hojas de *S. chamaecyparissus* presenta gran actividad, sobre todo frente a *A. hybridus* y *P. oleracea*, por lo que podría utilizarse como herbicida natural selectivo contra estas especies. Es necesario realizar ensayos con otras especies

arvenses y en condiciones de invernadero y campo para poder valorar su potencial herbicida en condiciones reales.

El extracto de hojas presenta como ventaja respecto al de flor que tiene una mayor disponibilidad durante el periodo de desarrollo de la planta.

4- CONCLUSIONES

- Los extractos acuosos de hojas y flores de *S. chamaecyparissus* mostraron una actividad dependiente de la especie sobre la que actuaron y la concentración aplicada.
- El extracto de hojas fue más efectivo en la inhibición de la germinación y el crecimiento de las especies estudiadas.

5- BIBLIOGRAFÍA

Ahuja, A., Bakshi, S.K., Sharma, S.K., Thappa, R.K., Agarwal, S.G., Kichlu, S.K., Paul, R., Kaul, M.K., 2005. Production of volatile terpenes by proliferating shoots and micropropagated plants of *Santolina chamaecyparissus* L. (cotton lavender). *Flavour and Fragrance Journal* 20, 403-406.

Anaya, A. L., 1999. Allelopathy as a tool in the management of biotic resources in agroecosystems. *Critical reviews in plant science* 18, 697-739.

Azizi, M., Fuji, Y., 2006. Allelopathic effect of some medicinal plant substances on seed germination of *Amaranthus retroflexus* and *Portulaca oleracea*. *Acta Horticulturae* 699, 61-68

Barnes, J., Putnam, A., 1986. Evidence for allelopathy by residues and aqueous extract of rye (*Secale cereale* L.). *Weed Science* 34, 384-390.

Duke, S., Smeda, R., Weston, L., 1997. Potential for utilization of allelopathy for weed management. En: Palestras e mesas redondas. XXI Congresso Brasileiro da ciência das plantas daninhas. Caxambú. Minas Gerais, Brasil. 6-11 junio.

Grosso, C., Coelho, J.A., Urieta, J.S., Palavra, A.M.F., Barroso, J.G., 2010. Herbicidal activity of volatiles from coriander, winter savory, cotton lavender, and thyme isolated by hydrodistillation and supercritical fluid extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 11007-11013.

Garg, S.N., Gupta, D., Mehta, V.K., Kumar, S., 2001. *Journal of Essential Oil Research* 13, 234-235.

Giner, R.M., Rios, J.L., 2000. *Santolina chamaecyparissus*. *Revista de Fitoterapia* 1, 27-34.

Giner, R.M., Ríos, J.L., Villar, A., 1988. *Phytotherapy Research* 2, 37-41.

Heap, I., 2013. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Documento disponible online en Internet. www.weedscience.com. Accedido 15.9.2013.

Lopez, V., Akerreta, S., Casanova, E., García-Mina, J.M., Cavero, R.Y., Calvo, M.I., 2008. *Pharmaceutical Biology* 46, 602-609.

Ormeño, J., 1999. Manejo y control de malezas con plantas alelopáticas: Centeno. En: Agricultura orgánica. Céspedes, C. y Carvajal, P. Trama. Talcahuano, pp. 121-137.

Pérez, J.G., Torres, S., Puente, M., Aguilar, R., 2002. Efecto alelopático del extracto acuoso de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) sobre ocho cultivos económicos.

Documento online.

<http://www.ucf.edu.cu/URBES/CD/ALELOPATIA%20DEL%20TABACO.htm>

Recasens, J., Conesa, J.A., 2009, Malas Hierbas en plántula, pp. 116, 144 y 297

Oliveros-Bastidas, A.J., 2008. El fenómeno alelopático. El concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. *Química Viva* 7(1), 1-34.

Sala, A., Recio, M.C., Giner, R.M., Martínez, S., Rios, J.-L., 2000. *Life Sciences* 66, 35-40.

Salam, A., Noguchi, H., 2010. Evaluation of allelopathic potential of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) against seed germination and seedling growth of different test plant species. *Journal of Sustainable Agriculture* 2, 20-25.

Singh, H.P., Batish, D.R., Setia, N., Kohli, R.K., 2005. Herbicidal activity of volatile oils from *Eucalyptus citriodora* against *Parthenium hysterophorus*. *Annals of Applied Biology* 146, 89-94.

Suresh, B., Sriram, S., Dhanaraj, S.A., Elango, K., Chinnaswamy, K., 1997. *Journal of Ethnopharmacology* 55, 151-159.

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., 2002. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron* 58, 1631-1646.