

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA  
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

MÁSTER EN PRODUCCIÓN VEGETAL Y ECOSISTEMAS  
AGROFORESTALES

DEPARTAMENTO DE ECOSISTEMAS AGROFORESTALES



**Actividad herbicida del aceite  
esencial de *Thymus capitatus* (L.)  
Hoffmanns. et Link. y efectividad en  
función de distintos métodos de  
aplicación.**

**TRABAJO FINAL DE MÁSTER**

Susana García Plasencia

Directora: Mercedes Verdeguer Sancho

Valencia, septiembre de 2013

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero dar las gracias a las personas que han hecho posible que hoy presente este trabajo:

A mi directora Mercedes, porque desde el primer momento ha confiado en mí, me ha mostrado todo su apoyo y amistad, y me ha guiado y ayudado en la realización de este trabajo.

A David, por su ayuda en la preparación de los ensayos en el laboratorio y en el invernadero.

A mis compañeros y amigos del máster. A Paco Sevilla, por recomendarme hacer este trabajo, por recoger y traerme las muestras de tomillo, y por supuesto, por los buenos momentos que hemos pasado estos últimos años en el máster. A Paco Raga, por su compañía y ayuda en las largas horas en el laboratorio. A mis 'Petardikis', Berta, Marta y Suje, por hacer que los 3 años que llevo viviendo en Valencia hayan sido mucho mejores.

Quiero dar las gracias también a mi familia, a mis padres y a mi hermana, porque, aún en la distancia siempre han estado a mi lado, y a mi abuela, porque siempre tiene una sonrisa en la cara para mí.

Por último, quiero dar las gracias especialmente a Esteban por estar siempre conmigo, y apoyarme en todo lo que hago.

## INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1. Breve historia de la alelopatía .....	3
2.2. La alelopatía y el control de arvenses.....	4
2.3. Compuestos alelopáticos .....	6
2.5. Potencial herbicida de aceites esenciales.....	9
2.6. Estudios previos de las especies objeto de este trabajo.....	11
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	19
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	20
4.1. Material vegetal.....	20
4.2. Obtención y rendimiento del aceite esencial.....	20
4.3. Determinación de la composición del aceite esencial .....	21
4.4. Ensayo de actividad fitotóxica del aceite esencial <i>in vitro</i> . .....	22
4.5. Ensayo de la actividad fitotóxica del aceite esencial en invernadero. ....	23
4.6. Tratamiento y análisis estadístico de datos. ....	24
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	25
5.1. Composición del aceite esencial de <i>Thymus capitatus</i> (L.) Hoffmanns. et Link	25
5.2. Actividad fitotóxica <i>in vitro</i> del aceite esencial de <i>T. capitatus</i> .....	26
5.3. Actividad fitotóxica del aceite esencial en invernadero. ....	30
5.4. Efecto de la actividad fitotóxica del aceite esencial sobre la biomasa en el ensayo de invernadero. ....	33
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	36
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	37

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde la aparición de la agricultura, el hombre ha intentado con los medios disponibles, mejorar el rendimiento de su actividad agrícola (Laborda, 2008). Durante miles de años, las prácticas agrícolas se basaron en la rotación de cultivos o en la siembra de cultivos mixtos para optimizar el control natural de las plagas (insectos, enfermedades y arvenses) (Dayan *et al.*, 2009). Las malas hierbas competían con los cultivos e interferían con la ejecución de las diferentes labores, por lo que hubo que combatirlos (García y Fernández, 1991). Se definen como plantas que crecen en una localización no deseada, compitiendo por nutrientes con los cultivos, pudiendo contaminar con sus semillas, además de perpetuar el problema a lo largo del tiempo (Vyvyan, 2002).

En un estudio se ha demostrado que la reducción potencial de los rendimientos (sin aplicar medidas de protección vegetal) puede alcanzar entre un 50 y un 80% (Oerke, 2006). La pérdida real de producción (a pesar de que se tomen medidas para reducir daños, como los tratamientos fitosanitarios) puede situarse entre el 24 y el 38%. La distribución de los daños potenciales es así: 34% debido a las malas hierbas, 19% a las plagas animales, 13% a las enfermedades causadas por hongos y un 3% a las causadas por virus (Zaragoza, 2012).

Los métodos empleados para el combate de las malas hierbas fueron primero medios mecánicos manuales, como piedras afiladas, estacas, azadas; posteriormente arados y cultivadores de tracción animal, y finalmente, arrastrados por tractores. El desarrollo de productos químicos para controlar las malas hierbas es muy reciente. Ocasionalmente se había utilizado la sal común para suprimir la vegetación de ciertas áreas. A principios del siglo pasado también se usaron otros compuestos químicos inorgánicos, como el sulfato de cobre y el de hierro, el cloruro sódico y el arsénico sódico, cuyo uso para el control de malas hierbas en trigo dio a conocer Bolley a principios del siglo XX. Dicha información, entonces llevada a cabo en términos que hoy podrían considerarse como poco realistas, fue sin embargo la primera que anticipaba el uso potencial de compuestos químicos en el control de malas hierbas (García y Fernández, 1991). La idea básica en la investigación de los primeros herbicidas era rociar un grupo de plantas con un compuesto para controlar las hierbas sin dañar el cultivo. Este tipo de compuestos fueron llamados herbicidas de post-emergencia (Macías, 1995). Se puede considerar que el inicio de la síntesis y desarrollo de herbicidas, y por consiguiente de la Malherbología como disciplina agronómica, se inicia a principio de la década de los cuarenta con el descubrimiento del 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), primer herbicida orgánico sintetizado (García y Fernández, 1991). En los 30 años siguientes se descubrieron las fenilureas sustituidas, las triazinas, el glifosato y otros. Estos herbicidas permitieron por primera vez controlar las plantas arvenses selectivamente en pre- y postemergencia, en cultivos sembrados (Macías, 1995). El descubrimiento de los herbicidas sulfonilureas en los años 70 (Sauers y Levitt, 1984; Levitt, 1991) supuso el comienzo de la presente nueva era de los herbicidas químicos, caracterizada por el uso de herbicidas muy selectivos a dosis muy bajas (Macías, 1995). Desde su introducción comercial en 1974, el glifosato se ha convertido en el herbicida dominante en todo el mundo. Se trata de un herbicida altamente efectivo y de amplio espectro, sin embargo desde el punto de vista toxicológico y medio ambiental es seguro. Pero quizás el aspecto más importante de su éxito es la introducción de cultivos transgénicos, resistentes al glifosato en 1996 (Duke y Powles, 2008). Sin embargo, las primeras malas hierbas resistentes al glifosato están empezando a propagarse (Gross, 2011). Además, estudios diversos realizados en campo (Wardle y Parkinson, 1990) y en condiciones controladas (Johal y Rahe, 1984; Lévesque *et al.*, 1993; Descalzo *et al.*, 1996; Meriles *et al.*, 2006) han encontrado efectos del glifosato sobre la actividad de distintos

microorganismos del suelo (Bórtoli *et al.*, 2012). Se ha comprobado también que los brotes de diferentes especies de plantas son menos sensibles al glifosato cuando crecen en suelo previamente esterilizado, lo que sugiere un sinergismo entre el herbicida y ciertos microorganismos patógenos (Johal y Rahe, 1984; Lévesque *et al.*, 1993; Descalzo *et al.*, 1996).

La agricultura moderna alimenta a 6.000 millones de personas (Tilman *et al.*, 2002). La producción mundial de cereales se ha duplicado en los últimos 40 años, principalmente debido al aumento de los rendimientos de las cosechas, resultado de la aplicación de fertilizantes y pesticidas, la adecuada irrigación, el cultivo de nuevas variedades mejoradas genéticamente y al uso de otras tecnologías de la denominada 'Revolución Verde' (WHO, 1990; Tilman *et al.*, 2001). En el año 2050, la población mundial se prevé que será un 50% mayor que en la actualidad y la demanda mundial de cereales se duplicará (Alexandratos, 1999; Cassman, 1999). Por este motivo, duplicar la producción de alimentos de nuevo y mantenerla en este nivel, son los principales retos (Alexandratos, 1999; Postel, 1999). Actualmente la demanda mundial de productos agrícolas supera la oferta, por lo que se debe gestionar su producción de manera más eficiente (Mahlein *et al.*, 2012).

El aumento del uso de pesticidas desde 1960 ha permitido a los agricultores de muchas regiones aumentar la productividad de los cultivos considerablemente sin perder una cantidad económicamente no aceptable de los cultivos debido a las plagas (Oerke, 2006), pese a que, obviamente, no se ha traducido en una disminución significativa de las pérdidas en las cosechas (Oerke, 2006; Laborda, 2008).

Desde hace unos años, en los países desarrollados existe una gran preocupación por la calidad de los sistemas productivos y por el impacto ambiental de los plaguicidas (Gobbi, 2000). La intensificación de las técnicas de producción con la finalidad de lograr altos rendimientos, ha conducido al incremento en el uso de fertilizantes a la vez que ha aumentado la presión de las plagas, lo que se ha traducido en un aumento del uso de plaguicidas. Como consecuencia de esto, se han puesto de manifiesto graves problemas ambientales y sociales tales como la contaminación de los suelos, la pérdida de calidad del agua para consumo humano, y la destrucción de la fauna útil (Dehne y Schönbeck, 1994).

Los plaguicidas no sólo son tóxicos para los organismos que se proponen combatir, también afectan a otros seres vivos, entre ellos los trabajadores que los fabrican y aplican, e incluso a los consumidores del producto final. Además, se acumulan en el suelo y en el agua, planteando crecientes peligros para el futuro, y su eficacia disminuye con el tiempo, ya que los organismos a que están dirigidos adquieren resistencia a su toxicidad, haciendo que el producto químico resulte inútil (Laborda, 2008).

La reducción de las materias activas autorizadas como plaguicidas acometida por las políticas actuales de la Unión Europea (UE) (Birch y Begg, 2011; Zaragoza, 2012), ha hecho aún más importante la búsqueda de sustancias con nuevos modos de acción más específicos contra las malas hierbas, con menor toxicidad para el hombre y los animales y que no causen daños medioambientales (Dayan *et al.*, 1999).

En este sentido se puede destacar la importancia de la búsqueda de herbicidas naturales basándose en los mecanismos de defensa propios de las plantas, no solo frente a depredadores herbívoros, sino también frente a otras especies vegetales.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Breve historia de la alelopatía

Rice (1984) define la alelopatía como cualquier efecto directo o indirecto (estimulador o inhibitorio) causado por una planta (incluyendo microorganismos) sobre otra, a través de la liberación de compuestos químicos (aleloquímicos) al medio ambiente.

La alelopatía no es un descubrimiento reciente. Un documento del año 3000 antes de Cristo (a.C.) relata que muchas plantas cosechadas, como el guisante (*Pisum sativum*), la cebada (*Hordeum vulgare*) y la judía forrajera (*Phaseolus vulgaris*), destruyeron malas hierbas e inhibieron el crecimiento de otras cosechas (Rice, 1984).

Plinio, en el siglo I después de Cristo (dC) observó que el garbanzo (*Cicer arietinum*), la cebada (*Hordeum vulgare*) y la arveja amarga (*Vicia ervilia*) "abrasan la tierra" (Rice, 1984). También observó que la sombra del nogal (*Juglans spp.*) causa dolor de cabeza en el hombre y daño a las plantas de su alrededor. Plinio aparentemente era consciente de que la liberación de los productos químicos de las plantas causaba problemas en el suelo (Weston, 2005), ya que escribió que "la naturaleza de algunas plantas a pesar de no ser exactamente mortal es nociva debido a sus mezclas de fragancias o a sus jugos.

Young a principios del siglo XIX sostuvo que el trébol (*Trifolium pratense*) tenía dificultades para crecer en sitios donde se había cultivado constantemente porque el suelo adquiere "la enfermedad del trébol" y puntualizó que la enfermedad podía ser prevenida dejándose un intervalo de 7 a 8 años entre cultivos de trébol (Sampietro, 2002; Weston, 2005).

En 1832, De Candolle sugirió que los suelos enfermos en agricultura podrían deberse a exudados de raíces de plantas de cultivo y que la rotación de cultivos podría solventar el problema (Singh *et al.*, 2001). Observó que la presencia de cardos es nociva para la avena. Igualmente se dio cuenta de que la Euforbia es nociva para el lino y que las plantas de centeno lo eran para las de trigo (*Triticum aestivum*).

En la literatura hay muchos ejemplos descritos por botánicos, agricultores y jardineros que sugieren fuertes interacciones alelopáticas entre plantas. Es interesante observar que muchas de las especies que tienen efectos medicinales potentes en seres humanos también se ha demostrado posteriormente que tienen efectos alelopáticos (Rice, 1984; Chevallier, 1996; Wink, 1999).

Desde muy antiguo se han observado los fenómenos de alelopatía, pero hasta después de 1900 no se llevaron a cabo experimentos científicos para estudiar este fenómeno.

Massey, en 1925, observó plantaciones de tomate y alfalfa situadas en un radio de hasta 25 metros de troncos de nogales. Las plantas situadas en un radio de hasta 16 metros morían mientras las situadas más allá del mismo crecían sanas. Posteriormente se probó que la juglona, una hidroxinaftoquinona soluble en agua

causante del color pardo que tiñe las manos de quienes manipulan nueces, provocaba esta fitotoxicidad (Sampietro, 2002).

El fisiólogo alemán Hans Molish demostró el efecto negativo del crecimiento de vegetales en ambiente de gas etileno generado por manzanas. Este autor acuñó el término “alelopatía” en 1937 y lo definió como “la ciencia que estudia las interacciones bioquímicas entre todo tipo de plantas, incluyendo microorganismos” (Castellano, 2002).

Entre los años 1960 y 1990 se hicieron grandes avances en la cromatografía y la espectrometría de masas para la elucidación estructural de productos naturales desconocidos (Weston, 2005). McCalla y su grupo de investigadores publicaron una serie de artículos entre 1948 y 1965 en los que describían aleloquímicos producidos por residuos de plantas y la importancia de la interacción de los microbios en la descomposición de estos residuos (Putnam y Weston, 1986). En esta época se llevaron a cabo estudios más exhaustivos en el campo de la alelopatía gracias a los trabajos y publicaciones de Muller y Rice (Putnam y Weston, 1986; Weston, 2005).

En los últimos años del siglo XX y principios del siglo XXI se ha producido un aumento exponencial en el número de publicaciones en el campo de la alelopatía (Macías, 2002). Este aumento puede deberse al desarrollo de métodos sofisticados de aislamiento e identificación de aleloquímicos, así como al desarrollo de modelos experimentales innovadores. En la actualidad existen nuevos métodos de estudio relacionados con la biología molecular y la tecnología digital, teniendo como objetivo entender la perspectiva del fenómeno de alelopatía en los ecosistemas (Mallik, 2000).

## **2.2. La alelopatía y el control de arvenses**

Durante muchos años, los trabajos sobre alelopatías fueron llevados a cabo principalmente por botánicos. Consistían en ensayar la práctica de dejar los restos del cultivo como cubierta, y sus posibles efectos alelopáticos sobre los cultivos posteriores, estudiar la alelopatía en la rotación de cultivos o intercalar cultivos alelopáticos y analizar el efecto de extractos de plantas con propiedades alelopáticas sobre el rendimiento de cosechas (Oliveros-Bastidas, 2008). Estos trabajos continúan hoy en día, buscando la mejor forma de utilizar la alelopatía para el control de arvenses en campo (Weston, 1996; Olofsdotter, 2001; Vyvyan, 2002; Khanh *et al.*, 2005). Se ha producido un gran crecimiento en la investigación de los productos naturales responsables de estos efectos (Einhellig, 1994; Vyvyan, 2002).

El carácter multidisciplinar de esta ciencia, donde biólogos, fisiólogos vegetales, ecologistas, edafólogos, bioquímicos, ingenieros agrónomos, etc. juegan un importante papel, puede ofrecer métodos adicionales para el control de arvenses (Newman, 1982; Einhellig y Leather, 1988; Putnam, 1988; Worsham, 1989), desarrollando nuevas técnicas que impliquen el uso de la alelopatía, como las propuestas por Macías (1995):

- Uso de aleloquímicos naturales o modificados como herbicidas.
- Transferencia genética de propiedades alelopáticas a cultivares comerciales.

- Uso de plantas alelopáticas en rotación de cultivos, como plantas acompañantes y como abono verde.
- Uso de “mulchings” fitotóxicos y manejo de cubiertas vegetales para la supresión de arvenses, especialmente en sistemas de producción de conservación y de no laboreo.

El papel de los compuestos de origen natural, o miméticos producidos sintéticamente, para su uso como pesticidas ha sido ampliamente adoptado, en particular para el control de insectos (Kelton *et al.*, 2012). Varios compuestos derivados de plantas, tales como el piretro, el nim, y la nicotina, son productos químicos importantes para el control de insectos en muchas áreas (Isman, 2006). Algunos autores han indicado el potencial herbicida de extractos obtenidos de plantas, pero hasta la fecha pocos han sido comercializados. Compuestos sintéticos, tales como cinmetilina, y mesotriona, se han desarrollado sobre la base de aleloquímicos derivados de plantas, pero la salida al mercado de herbicidas basados en estos productos se ha retrasado (Lee *et al.*, 1997; Macías *et al.*, 2004; Secor, 1994; Vyvyan, 2002). Es probable que la lenta obtención y comercialización de herbicidas desarrollados de esta forma se deba a la limitada comprensión de los modos de acción de muchos de los aleloquímicos identificados. Hasta la fecha, se han aislado e investigado un cierto número de aleloquímicos para desarrollar herbicidas naturales. La comprensión de su modo de acción puede ayudar en el desarrollo de nuevos productos para el mercado (Kelton *et al.*, 2012).

Liebman y Ohno (1997), indican que el efecto inhibitorio de los compuestos aleloquímicos sobre la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas es debido al resultado de su efecto sobre muchos procesos individuales. Según Rizvi *et al.* (1992), los compuestos alelopáticos tienen dos modos de acción: indirecto, que incluye los efectos ocasionados por la alteración de las propiedades del suelo, el estado nutricional y la actividad de poblaciones de organismos beneficiosos; y directo, que comprende los efectos sobre varios procesos del crecimiento y el metabolismo de las plantas. Estos últimos se pueden clasificar en primarios (inhibición de la división celular, inhibición de la fotosíntesis, efectos en la respiración, efectos sobre la síntesis de proteínas, cambios en la permeabilidad de las membranas e inhibición de enzimas) y secundarios (interferencia con la germinación y el crecimiento) (Lovett y Ryuntyu, 1992).

Los productos naturales son una atractiva fuente potencial de obtención de nuevos herbicidas, no sólo por la gran diversidad y lo novedoso de sus fórmulas, sino también por la potencial especificidad de su acción biológica (Fischer *et al.*, 1990; Stonar y Miller-Wideman, 1995; Duke *et al.*, 2000), y por la escasa probabilidad de producir acumulaciones dañinas y residuos perjudiciales en aguas y suelos (Macías, 1995). Las fitotoxinas naturales presentan unas estructuras químicas poco probables de obtener con la química de síntesis y además, actúan en puntos en los que no suelen actuar los herbicidas convencionales (Duke *et al.*, 2000) lo que podría hacer más difícil a las arvenses desarrollar resistencias.

### 2.3. Compuestos alelopáticos

La mayoría de los compuestos liberados por las plantas son metabolitos secundarios producidos como resultado de las rutas metabólicas primarias (Hadacek, 2002). Dependiendo de su acción fitotóxica, su concentración bioactiva y su persistencia y destino en el entorno en que son liberados, pueden actuar como compuestos alelopáticos (Inderjit y Duke, 2003). Además, en la naturaleza, la actividad alelopática está probablemente originada por la acción conjunta de varios aleloquímicos, más que por la acción de uno solo (Inderjit *et al.*, 2002; Inderjit y Duke, 2003).

Siendo estos metabolitos secundarios responsables de la interacción entre las plantas y su entorno, no es sorprendente que les hayan sido asociadas una amplia variedad de actividades biológicas, medidas en ensayos *in vitro* (Singh *et al.*, 2003). El estudio de la dinámica de estas defensas químicas comprende dos aspectos fundamentales: primero, la observación del fenómeno en su hábitat natural y, en segundo lugar, debido a la gran variedad y complejidad de variables (Weldon y Slauson, 1986; Chapin *et al.*, 1994), llevar a nivel de laboratorio el estudio del efecto previamente observado.

El compuesto alelopático debe ser liberado al ambiente por un mecanismo lo suficientemente efectivo para garantizar un nivel de concentración tóxico a la planta u organismo receptora (Oliveros-Bastidas, 2008). Los mecanismos por los que los aleloquímicos son liberados al ambiente son: volatilización desde las hojas, lixiviado desde raíces o parte aérea, exudados de raíz o liberación por descomposición de tejidos vegetales por hongos y bacterias (Putnam, 1983). Las plantas superiores liberan regularmente compuestos orgánicos por volatilización de sus superficies y a través de lixiviados de hojas y exudados de raíces. Eventualmente, los constituyentes químicos de todos los organismos son liberados al entorno a través de procesos de descomposición, incorporándose a la matriz del suelo (Sampietro, 2002).

Se han caracterizado diversos aleloquímicos con diferentes estructuras químicas y sus propiedades fitotóxicas y biológicas han sido estudiadas (Macías *et al.* 2007). Rice (1984) estableció la primera clasificación, dividiéndolos en 14 grupos, de acuerdo a su origen biosintético. Los principales grupos de compuestos aleloquímicos son los siguientes:

**Glucosinolatos.** Son un grupo de compuestos que se encuentran en muchas especies de plantas, ampliamente conocidos por ser producidos por especies de la familia Brassicaceae (Mithen, 2001; Haramoto y Gallandt, 2005; Malik *et al.*, 2008). Los glucosinolatos, metabolitos secundarios que contienen azufre y nitrógeno, son hidrolizados enzimáticamente por mirosinasas a isotiocianatos, compuestos aleloquímicamente activos (Petersen *et al.*, 2001; Haramoto y Gallandt, 2005; Norsworthy y Meehan, 2005; Price *et al.*, 2005). Estudios anteriores de plantas productoras de glucosinolatos han demostrado que estos reducen y retardan la germinación, la emergencia de plántulas y el tamaño de estas (Wolf *et al.*, 1984; Brown y Morra, 1996; Al-Khatib *et al.*, 1997; Norsworthy *et al.*, 2007; Malik *et al.*, 2008). Aunque los modos específicos de acción de cada compuesto no se han

investigado a fondo, es evidente que algunas plantas son capaces de tolerar más fácilmente estos aleloquímicos que otras (Norsworthy y Meehan, 2005). Futuras investigaciones podrían ir encaminadas a responder esta cuestión con el fin de utilizar estos compuestos de forma más efectiva en la producción agrícola (Kelton *et al.*, 2012).

**Compuestos fenólicos.** Como la mayoría de aleloquímicos, los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios tipificados por una estructura de anillo aromático de diferente complejidad (Kelton *et al.*, 2012). Se encuentran en una gran variedad de especies, entre ellas el arroz, el trigo, el mango... (Chung *et al.*, 2002; Bais *et al.*, 2003; Fitter, 2003; El-Rokiek *et al.*, 2010). Muchas de estas plantas contienen varios compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos han sido objeto de numerosos estudios diseñados para establecer su modo de acción (Putnam, 1985). Investigaciones recientes indican la interrupción de la división celular y malformación en estructuras celulares en plantas expuestas a estos (Li *et al.*, 2010). Otros trabajos indican la reducción de la respiración y de la tasa fotosintética en presencia de compuestos fenólicos (Patterson, 1981; Yu *et al.*, 2003), o la alteración de funciones enzimáticas (Batish *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010). A pesar de la extensa investigación, los puntos diana para la actividad de muchos compuestos alelopáticos aún no se han determinado (Kelton *et al.*, 2012).

Entre los compuestos fenólicos se incluyen fenoles simples (ácido benzoico), fenilpropanoides (ácido cinámico), quinonas (juglona y sorgolenona), flavonoides (kaempferol y quercetina), y metabolitos de líquenes (ácido úsnico y derivados) (Verdeguer, 2011). Entre ellos también se encuentran las cumarinas, compuestos alelopáticos que están en las familias Apiaceae, Asteraceae y Fabaceae (Razavi, 2011), que reducen la germinación y el crecimiento de tallos y raíces, y que interfieren en la fotosíntesis, la respiración, la nutrición y el metabolismo de las plantas (Abenavoli *et al.*, 2001; Abenavoli *et al.*, 2004; Yamamoto, 2008; Razavi *et al.*, 2010). Tienen también efectos antibacterianos, nematicidas, antifúngicos e insecticidas, así como farmacológicos, reduciendo edemas e inflamaciones (Casley-Smith y Casley-Smith, 1992; Maddi *et al.*, 1992; Houlton y Paya, 1996; Razavi, 2011).

**Benzoxacinoides.** Entre ellos se encuentran compuestos como DIBOA [2,4-dihidroxi-(2H)-1,4-benzoxazin-3 (4H)-ona] y DIMBOA [2,3-dihidroxi-7-metoxi-(2H)-1,4-benzoxazin-3 (4H)-ona] (Burgos y Talbert, 2000; Macías *et al.*, 2005), incluidos en especies de la familia Poaceae. Estos compuestos se degradan fácilmente en otras formas alelopáticas, BOA (2-benzoxazolinona) y MBOA (7-metoxi-2-benzoxazolinona) en el suelo, y pueden disminuir la germinación y el crecimiento de las plantas (Barnes *et al.*, 1987; Burgos y Talbert, 2000; Macías *et al.*, 2005). A la vista de las propiedades alelopáticas de BOA y MBOA, son necesarias nuevas investigaciones para comprender el papel de los productos de la degradación de aleloquímicos iniciales en la inhibición del desarrollo de las plantas (Macías *et al.*, 2005).

**Terpenoides.** Son metabolitos secundarios presentes en muchos organismos, cuyas funciones naturales son muy diversas y se han registrado como moléculas de señalización, aleloquímicos, fitoalexinas, feromonas, pigmentos visuales, agentes

fotoprotectores, componentes de membrana, y hormonas reproductivas (Haig, 2008). Los terpenos se forman por el acoplamiento de un número entero de unidades pentacarbonadas ramificadas derivadas del 2-metil-1,3-butadieno (Bruneton, 1991). Cuando los terpenos son modificados químicamente, por ejemplo por oxidación o reorganización del esqueleto hidrocarbonado, suelen denominarse terpenoides. La biosíntesis de los terpenos en las plantas es a través de la vía del ácido mevalónico (Goodwin, 1971).

En este grupo se incluyen compuestos con actividad alelopática como diterpenos, lactonas sesquiterpénicas, quassionides y monoterpenoides.

Los monoterpenos son los principales constituyentes de los aceites esenciales, cuyo rasgo característico es su alta volatilidad y olores significativos (Haig, 2008). Su efecto como inhibidores de la germinación de semillas y el crecimiento de plantas se conoce desde hace más de 75 años y se han descrito como responsables de interacciones alelopáticas, especialmente en plantas aromáticas de zonas áridas y semiáridas (Angelini *et al.*, 2003). Fischer (1986) cita 14 monoterpenos fitotóxicos, incluyendo entre ellos borneol, pulegona, alcanfor, limoneno, 1-8 cineol. Algunos investigadores han verificado la acción alelopática de estos compuestos individualmente (Vokou *et al.*, 2003), mientras que otros defienden que su combinación, como ocurre de forma natural en los aceites esenciales, incrementa sus efectos fitotóxicos (Angelini *et al.*, 2003).

#### **2.4. Actividades biológicas de los aceites esenciales y aplicaciones en agricultura**

Los aceites esenciales se obtienen fundamentalmente de las partes no leñosas de la planta, en especial de las hojas, mediante arrastre por vapor de agua o hidrodestilación (Batish *et al.*, 2008). Son mezclas muy complejas, conteniendo alrededor de 50 compuestos, entre ellos monoterpenos, sesquiterpenos, aldehídos, cetonas y fenoles (Isman *et al.*, 2011). Los monoterpenos son las moléculas más abundantes, llegando a representar hasta el 90% del aceite (Thripathi *et al.*, 2009). Entre los compuestos mayoritarios destacan los monoterpenos oxigenados (ej. 1,8-cineol, linalol, alcanfor, carvacrol), monoterpenos hidrocarbonados (ej.  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, limoneno, *p*-cimeno) y ésteres monoterpénicos (ej. acetato de linalilo) (Guillen *et al.*, 1996; Pierozan *et al.*, 2009).

Los aceites esenciales de plantas y los aceites de semillas prensadas constituyen una importante parte de la cuota de mercado de los insecticidas basados en productos naturales. Entre los aceites esenciales, se pueden destacar los de romero, tomillo y clavo, muchos de los cuales también tienen efecto herbicida (Dayan *et al.* 2009).

**Aceite esencial de romero.** Como la mayoría de aceites esenciales es mezcla de numerosos compuestos volátiles, principalmente 1-8 cineol, borneol, alcanfor y altas cantidades de monoterpenoides. Muchos de estos compuestos tienen actividad insecticida (Waliwitiya *et al.*, 2005). Son recomendados para controlar áfidos, escarabajos, mosca blanca, araña roja, trips, orugas y larvas.

**Aceite esencial de tomillo.** Los principales constituyentes, junto con numerosos monoterpenoides adicionales, son el timol y el carvacrol (Kubeczka, 2002). Los productos basados en aceite esencial de tomillo están exentos de registro de la EPA (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos) y por lo tanto están disponibles para el control de insectos de amplio espectro en agricultura ecológica.

**Aceite esencial de clavo.** Está compuesto en un 92% por eugenol, un insecticida de rápida acción que actúa por contacto y que es efectivo contra gran variedad de artrópodos, plagas de hogar, y también se usa para controlar algunas plagas de plantas ornamentales como trips, áfidos y ácaros.

Existen muchos aceites esenciales de plantas que destacan también por poseer actividad antimicrobiana (Auria *et al.*, 2005; Bozin *et al.*, 2007; Pierozan *et al.*, 2009). En un estudio muy reciente se analizó el perfil químico y biológico de diferentes aceites esenciales de plantas aromáticas de Castilla-La Mancha (*Salvia officinalis* L., *Salvia lavandulifolia* Vahl., *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel., *Lavandula latifolia* Medik., *Lavandula angustifolia* Mill. y *Thymus vulgaris* L.). Se comprobó su actividad insecticida frente a *Leptinotarsa decemlineata* Say, *Spodoptera littoralis* Boisd., *Myzus persicae* Sulzer y *Rhopalosiphum padi* L., así como su actividad antifúngica, ya que los aceites esenciales estudiados inhibieron significativamente el crecimiento del micelio del hongo de las especies de *Fusarium* sp Link ex Grey. analizadas (Santana *et al.*, 2012). También se ha demostrado la actividad antifúngica de aceites esenciales de comino (*Cuminum cyminum* L.), albahaca (*Ocimum basilicum* L.) y geranio (*Geranium* sp. L.) frente a diferentes especies del género *Fusarium* (Hashem *et al.* 2010) y del aceite de *Lippia origanoides* H.B.K. sobre el desarrollo micelial y formación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. (Ospina *et al.*, 2011).

Uno de los aceites esenciales más estudiados es el de orégano, que posee propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias, antimicrobianas y antioxidantes (Rivero-Cruz *et al.*, 2011). Se investigó el efecto antimicrobiano y antiviral del aceite esencial y varios extractos de orégano (*O. acutidens*), determinándose la eficacia inhibitoria del aceite esencial contra 27 de las 35 bacterias analizadas y 12 de 18 hongos (Sökmen *et al.* 2004).

Debido a la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de muchas plantas, se han realizado diversos estudios relacionados con su posible uso como conservantes naturales para alimentos frescos (Uyttendaele *et al.*, 2004; Solis, 2011; Almela, 2012).

## 2.5. Potencial herbicida de aceites esenciales

Son numerosos los estudios realizados sobre la actividad herbicida de los aceites esenciales de diferentes plantas aromáticas. Se ha demostrado el efecto inhibitorio del aceite de menta (*Mentha* sp. L.) en el desarrollo de las raíces y la respiración mitocondrial de plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) en semillero (Mucciarelli *et al.* 2001), el de los aceites de albahaca, orégano y mejorana en la germinación de dos arvenses (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. y *Chenopodium album* L.),

(Vasilakoglou *et al.*, 2007), o el de los aceites de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), tomillo (*Thymus vulgaris* L.) y ajedrea (*Satureja montana* L.) para ver sus propiedades alelopáticas sobre arvenses anuales (*Echinochloa cruz-galli* (L.) P. Beauv., *Portulaca oleracea* L. y *Chenopodium album* L.) y horticolas (*Raphanus sativus* L., *Capsicum annum* L. y *Lactuca sativa* L.). (Angelini *et al.*, 2003)

En el trabajo realizado con plantas aromáticas de Castilla La Mancha se comprobó la actividad fitotóxica de sus aceites esenciales en *Lactuca sativa* L. y *Lolium perenne* L. dando en todos los casos buenos resultados, aunque algunos aceites mostraron más actividad que otros frente a *L. sativa* y otros más frente a *L. perenne* (Santana *et al.*, 2012).

Recientemente se han llevado a cabo nuevos trabajos para comprobar la actividad herbicida de otros aceites esenciales, como el realizado con aceites de diferentes especies de Eucaliptus spp. en el que se demostró su actividad fitotóxica en *Solanum elaeagnifolium* Cav. (Zhang *et al.*, 2012); el realizado con los de *Juniperus phoenicea* L, *Pistacia vera* L. y *Pistacia terebinthus* L. que tuvieron un fuerte efecto inhibitorio de la germinación de las arvenses probadas, siendo más efectivo a dosis iguales en dicotiledóneas que monocotiledóneas (Ismail *et al.*, 2012); o el de *Cistus ladanifer* L. que mostró un fuerte efecto fitotóxico en la germinación y crecimiento de las arvenses estudiadas (Verdeguer *et al.*, 2012)

Algunos aceites esenciales o compuestos que forman parte de ellos que se utilizan comúnmente en diferentes formulaciones herbicidas son los siguientes (Dayan *et al.*, 2009):

**Aceite de pino.** Compuesto por alcoholes terpénicos y ácidos grasos saponificados. Se vende como una emulsión acuosa al 10% para el control de arvenses aunque su aplicación no consigue el nivel de control obtenido con una sola aplicación de glifosato (Young, 2004).

**Aceite esencial de clavo.** Obtenido por destilación de hojas de *Eugenia caryophyllus* Spreng. Contiene principalmente eugenol junto con otros terpenoides. Se comercializa de diferentes formas. Aplicado a concentraciones de 1-5% controla muchas pequeñas arvenses (Tworkoski, 2002), pero la alta cantidad requerida para este control hace que sea un tratamiento muy caro.

**2-febetilpropionato.** Es un componente del aceite esencial de *Mentha piperita* L., el cual es rico en mentol y mentona (Bouverat-Bernier, 1992). Ha sido patentado como herbicida y puede encontrarse como componente de formulaciones de herbicidas naturales. Es seguro para el medio ambiente y la salud humana, ya que se utiliza en aromas alimentarios.

**Aceite esencial de hierba luisa.** El aceite esencial de *Cymbopogon citratus* Stapf. ha sido recientemente comercializado como herbicida orgánico, pero su potencial uso para el control de arvenses fue primeramente patentado en 1924. Su principal componente (80%) es el citral (Zamureenko *et al.*, 1981; Poonpaiboonpipat, 2013). Un producto comercial que contenga un 50% de aceite de hierba luisa debe diluirse al 7-

15% antes de su aplicación. Actúa como herbicida de contacto, y como el citral no se transloca, solo las partes alcanzadas por la solución se ven afectadas.

**Aceite esencial de citronela.** Este aceite, que es conocido por su uso como repelente de mosquitos, ha sido testado como herbicida en viveros. Se obtiene de diferentes fuentes, pero la más común es *Cymbopogon* spp. Sus principales componentes son citronela, geraniol y otros terpenos. Los test realizados en viveros mostraron que el aceite de citronela controla arvenses sin causar efectos adversos en árboles de hoja ancha latentes, sin embargo, las coníferas fueron muy sensibles a este tratamiento (Clay *et al.*, 2005).

Los aceites esenciales comercializados como herbicidas naturales son de contacto, ofreciendo buen pero transitorio control de arvenses. Su uso en agricultura parece prometedor, pero actúan muy rápidamente y su eficacia está limitada por el hecho de que se volatilizan con facilidad (Dayan *et al.*, 2009). Se están desarrollando formulaciones alternativas como la microencapsulación, para conseguir disminuir la dosis necesaria, aumentar la duración de su eficacia, simplificar el manejo de los materiales y disminuir la tasa de degradación en el medio ambiente (Scarfato *et al.*, 2007).

## 2.6. Estudios previos de las especies objeto de este trabajo

### ***Amaranthus hybridus* L.**

El género *Amaranthus* L. (familia Amaranthaceae) contiene unas 70 especies, de las cuales la mayoría son nativas de América y sólo 15 especies provienen de Europa, Asia, África y Australia (Robertson, 1981). Desde el punto de vista Etnobotánico, el género *Amaranthus* ha estado muy ligado al ser humano a lo largo de la historia, ya que ha sido aprovechado en forma silvestre y cultivado por distintos pueblos y civilizaciones (Sauer, 1950).

Las especies de *Amaranthus* se incluyen entre las arvenses más frecuentes y problemáticas en los cultivos (Webster, 2002). Poseen una alta diversidad genética y producen una abundante cantidad de semillas, que distribuyen eficientemente, características que favorecen la aparición de resistencias a herbicidas (Lovell *et al.*, 1996).

Es una planta monoica, anual, de 20-100 cm, erecta. Tiene las hojas ovadas o romboidales. Sus flores se agrupan en una inflorescencia terminal no muy densa, verdosa o rojiza, con el espicastro terminal más largo que los laterales. Las flores tienen tépalos lanceolados, con el ápice agudo, al menos algunos más cortos que el fruto, que es de tipo pixidio (Herbario de Navarra). Florece de mayo a octubre y fructifica de junio a diciembre. Al igual que *P. oleracea* tiene fotosíntesis tipo C4 (Maillet y López-García, 2000).

Es una arvense problemática en una gran cantidad de cultivos como trigo, arroz, algodón, soja, avena, café, girasol, cítricos, remolacha azucarera, patata, mango, papaya (Holm *et al.*, 1977), lechuga (Santos *et al.*, 2003) y pepino (Berry *et al.*, 2006).



*Amaranthus hybridus* L.

### ***Chenopodium album* L.**

El género *Chenopodium* L. (familia Amaranthaceae) está constituido por más de 120 especies. Son un grupo de plantas relativamente poco estudiado pero con una amplia distribución mundial (Fuentes *et al.*, 2009). En su mayoría son especies no cultivadas, aunque algunas han sido cultivadas en determinadas áreas geográficas, como *C. album* en Europa (Sederberg, 2008).

*C. album* es una planta anual, de entre 10-150 (250) cm, normalmente erecta. Su tallo es irregularmente ramificado, con estrías verdes y a menudo rojizo. Las hojas son pecioladas de hasta 8 cm, ovado-lanceolada. Tiene flores hermafroditas, agrupadas en una inflorescencia en panícula (Flora ibérica, 2013). Germina bajo un amplio rango de condiciones ambientales (Bassett y Crompton, 1978), produciendo gran número de semillas, que quedan almacenadas en el suelo. En un ensayo de campo, la producción de semillas por planta de *C. album* varió desde 30.000 a 176.000 (Harrison, 1990).

Es una planta subcosmopolita, común en áreas templadas y subtropicales, rara en los trópicos, y ausente en los extremos norte y sur. En España se encuentra en todas las provincias (Flora ibérica, 2013). Es una arvense de días cortos, colonizadora exitosa de nuevas áreas, que exhibe gran plasticidad en respuesta al ambiente (Bhowmik y Reddy, 1988).

Está considerada una de las arvenses más serias y extendidas, encontrándose en numerosos cultivos de todo el mundo (Holm *et al.*, 1977), Entre ellos patata, maíz, soja y remolacha azucarera (Perron y Légère, 2000; Thiel *et al.*, 2010). En el cultivo del algodón es una de las arvenses más importantes (Guevara, 2005; Ledda, 2005).



*Chenopodium album* L.

### ***Conyza canadensis* (L.) Cronq.**

El género *Conyza* Less. se incluye dentro de la familia Compositae, tribu Astereae. Se trata de un taxón cosmopolita, con un número de especies no muy bien definido que probablemente sobrepase el centenar. Su taxonomía es conflictiva, debido tanto al polimorfismo marcado de varios de sus integrantes como a la pobre definición de muchas de las especies que han recibido diferentes nombres en sus lugares de origen y en las regiones donde se han establecido como malezas (Amat, 1991).

*C. canadensis* es una planta anual de 20-80 cm y pelosa. Tiene hojas distribuidas por todo el tallo, linear-lanceoladas, con el nervio medio bien marcado y con cilios patentes en el margen. Sus capítulos son muy numerosos, con lígulas blanquecinas y flósculos amarillentos, las brácteas del involucreo son glabras o glabrescentes. Los capítulos se agrupan en panícula cilíndrica. Sus frutos son aquenios con vilano de 3-3,5 mm. (Herbario de Navarra, 2013).

Como muchas especies del mismo género y familia, estas plantas tienen la capacidad de formar gran cantidad de semillas, hasta 200.000 semillas por planta, y de dispersarlas por el viento gracias a los vilanos. En el caso de *C. canadensis* este proceso tarda uno o dos días desde que maduran los frutos. Las semillas pueden germinar en otoño o en primavera, pero en ocasiones, si las condiciones son favorables, también a mediados de verano. Si germinan en otoño, producen una roseta de hojas que sobrevive durante el invierno y la planta renueva su crecimiento en primavera, floreciendo en verano (Thébaud *et al.* 1996). Existen datos que confirman la supervivencia de un 91% de las plantas de *C. canadensis* que emergen en otoño hasta primavera en Norteamérica (Loux *et al.* 2006).

En todo el mundo, *C. canadensis* es una arvense importante en más de 40 cultivos (Holm *et al.*, 1997). Infesta huertos, viñedos, campos de maíz, soja y algodón, especialmente aquellos donde se emplean técnicas de no laboreo o laboreo de conservación, y pastos (Kapusta, 1979; Wiese *et al.*, 1995). Ha desarrollado resistencias a muchos herbicidas como la atrazina, el paraquat, el glifosato, etc. en muchos países, por lo que es considerada una de las 10 arvenses resistentes a herbicidas de mayor importancia económica (Weaver, 2001; Basu *et al.*, 2004; Heap, 2011).



*Conyza canadensis* (L.) Cronq.

### ***Portulaca oleracea* L.**

El género *Portulaca* L. (familia Portulacaceae) comprende unas 100 especies distribuidas por los trópicos y subtropicos, especialmente de África y Sudamérica, con algunos representantes en regiones templadas (Voznesenskaya *et al.*, 2010; Sánchez, 2013).

Se trata de una planta de ciclo anual, de 10-50 cm, glabra, más o menos postrada de tallos suculentos, lisos y carnosos (Holm *et al.*, 1977) que a menudo adquieren coloraciones rojizas. Las hojas son sésiles, obovadas y las flores sentadas, con 2 sépalos connados en la base y 4-6 pétalos amarillos. Fruto en pixidio con numerosas semillas negras (Páez *et al.*, 2007). Florece en verano y otoño.

Se propaga principalmente por semilla, pudiendo llegar a producir una sola planta hasta 10.000 semillas, aunque fragmentos de sus tallos pueden producir raíces y desarrollarse (Chauhan y Johnson, 2009).

Está ampliamente distribuida alrededor del mundo, especialmente en los trópicos (Omara-Alwala, 1991). Es una planta C4, lo que le confiere ventajas fisiológicas frente a otras especies, Voznesenskaya *et al.*, 2010), citada como arvense en alrededor de 80 países del mundo (Páez *et al.*, 2007). Está considerada una de las 8 plantas más comunes del mundo (Yazici *et al.*, 2007). Se encuentra en una amplia variedad de cultivos como cebolla, pimentón y tomate (Martínez y Alfonso, 2003), lechuga (Santos *et al.*, 2003), arroz, trigo, maíz, algodón, frutales, tabaco y muchos otros cultivos (Villaseñor y Espinosa, 2003).

Además de en estos cultivos, en un estudio realizado sobre las arvenses más importantes en cultivos ornamentales también se encuentra entre ellas *P. oleracea* (López, 2009).



*Portulaca oleracea* L.

### ***Setaria adhaerens* (Forssk.) Chiov.**

El género *Setaria* P.Beauv. pertenece dentro de la familia Poaceae, a la subfamilia Panicoideae. A nivel mundial, comprende aproximadamente 114 especies (Webster, 1993), distribuidas a través de las regiones tropicales, subtropicales y templadas del mundo.

*S. adhaerens* es una planta con tallos de hasta 60 cm, erectos y glabros. Hojas con vaina de margen glabro y limbo de hasta 20 cm, estriado y más o menos peloso. Panícula cilíndrica y densa, de 1-6 cm, formada por numerosas espiguillas. Espiguillas de 1,5-1,8 mm, elípticas, que se desprenden enteras en la madurez. Florece de julio a marzo (Flora vascular, 2013).

Es una planta termófila, muy extendida por el litoral mediterráneo (Sanz y Terrazas, 2009). Se encuentra en márgenes de caminos y campos de cultivo como la alfalfa y el maíz, constituyendo en ocasiones densas poblaciones (Rzedowski y Rzedowski, 2005).

Es una arvense de verano importante en cultivos de regadío de la Comunidad Valenciana junto con otras arvenses como *Portulaca oleracea*, *Cyperus rotundus*, *Amaranthus retroflexus*, *Amaranthus hybridus* y *Chenopodium album* (Carretero, 1989). Su tolerancia a la atrazina, la ha convertido en un problema importante en el cultivo del maíz en el noreste de España (Prado *et al.*, 1992).



*Setaria adhaerens* (Forssk.) Chiov.

### ***Solanum nigrum* L.**

El género *Solanum* L., perteneciente a la familia Solanaceae, contiene unas 1200 especies de distribución cosmopolita, entre las cuales hay hierbas, arbustos o árboles. Algunas constituyen alimentos muy importantes en el mundo como la patata o la berenjena, otras se emplean en jardinería y otras son arvenses, muchas de ellas muy invasivas. Se trata de especies tóxicas, debido a su contenido en alcaloides como la solanina. (Rzedowski, 2005).

*Solanum nigrum* es una hierba anual, a veces leñosa en la base, inerme, subglabra, pubescente o vilosa, con tallos de entre 30 y 80 cm. Hojas ovado-lanceoladas e inflorescencias pedunculadas en cimas racemiformes subumbeladas con (3)5-10 flores. (Flora Iberica, 2013)

Vive en zonas templadas de todo el mundo. Se encuentra en toda la Península Ibérica, aunque es rara en el noroeste. Es una especie ruderal, encontrándose en márgenes de cultivos y escombreras. Es sensible a la falta de luz (Fortuin y Omta, 1980) ya que produce el abortado de sus flores (Myers, 1986).

Es una arvense muy extendida, que posee diversos flujos de emergencia durante la estación de crecimiento de los cultivos de verano (Gonzalez *et al.*, 1992). Es muy

importante en los cultivos de tomate, patata, pimiento y algodón entre otros (Ogg *et al.*, 1981). La dormancia y permanencia de sus semillas en el suelo parece ser lo suficientemente larga como para permitir el establecimiento de esta arvense y competir con el cultivo (Keeley y Tullen, 1989).

Ha desarrollado resistencia a la atrazina y al paraquat en maíz en más de 10 países (Heap, 2013).



*Solanum nigrum* L.

### ***Sonchus oleraceus* L.**

Es una planta anual o bienal de la familia Compositae, de 15-80 cm, con látex. Hojas caulinares amplexicaules, dentadas o pinnatisectas, con pequeñas espinas en los márgenes; aurículas agudas. Capítulos con todas las flores liguladas, amarillas, con los estigmas verdosos. Las brácteas del involucre son glabras y en ocasiones presentan glándulas de color claro. Aquenios comprimidos, con 3 costillas en cada cara y vilano formado por pelos blancos. Florece durante todo el año. (Herbario virtual del mediterraneo occidental. universitat de les illes balears, 2013)

Se encuentra distribuida por toda la península en terrenos removidos, bordes de caminos y huertas. Se ha registrado en numerosos cultivos tanto anuales como perennes, en regadío (hortícolas, maíz, frutales) y en secano (viñedo, frutales), y también en viveros (Villaseñor y Espinosa, 1998). En general no se considera un problema serio, aunque en algunos países como en Australia es una arvense muy extendida y problemática en zonas de barbecho y en cultivos de cereales (John-Sweeting *et al.*, 2010), y en Estados Unidos se considera arvense importante en cultivos como el girasol, el tabaco y el cacahuete.

Es una especie autógama y sus aquenios con vilano pueden ser dispersados fácilmente por el viento a través de grandes áreas. Además, también se dispersan por el agua y por las aves (Holm *et al.* 1977, Hutchinson *et al.* 1984, Andersson, 1991). Sus semillas tienen poca latencia y germinan fácilmente (Widderick, 2002). Se han descrito resistencias de esta arvense a herbicidas, lo que se ve favorecido por la dispersión de sus semillas a grandes distancias y su rápida germinación, desarrollando rápidamente poblaciones resistentes debido a la presión de selección (John-Sweeting *et al.*, 2010).



*Sonchus oleraceus* L.

### ***Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. et Link.**

El género *Thymus* L. pertenece a la familia Lamiaceae y contiene unas 350 especies de hierbas perennes aromáticas (Qaralleh *et al.*, 2009). La Península Ibérica es considerada centro de diversificación del género *Thymus*, encontrándose aquí un número de especies solo superado por Turquía. Una característica muy interesante de los tomillos es la capacidad de hibridación entre un gran número de especies (Blanco, 2005).

*T. capitatus* es un subarbusto de hasta 60 cm, erecto y muy ramificado, con tallos de sección redondeada aunque los jóvenes son cuadrangulares, pelosos, con pelos cortos y firmes. Tiene hojas de 5-6 x 1,5 mm, planas o ligeramente curvadas en el margen, lineares. Sus flores son pequeñas, y se agrupan en inflorescencias capituliformes terminales y densas. Los frutos son núculas globosas de unos 0,7 mm. Florece de junio a septiembre (Morales, 1986).

Se encuentra en lugares pedregosos, roquedos o taludes en calizas, margas o suelos arcillosos, incluso en arenas, preferentemente calcícolas. Es una especie de distribución circunmediterránea, incluidas las grandes islas. En la Península Ibérica se encuentra en la región litoral de la mitad sur (Flora ibérica, 2013).

Se han realizado estudios de la composición del aceite esencial de *T. capitatus* de diferentes procedencias: Grecia (Papageorgiou, 1980; Papageorgiou y Argyriadou, 1981; Kokkini y Vokou, 1989; Kustrak *et al.*, 1990; Kaniyas y Loukis, 1992; Tateo *et al.*, 1996), Italia (Falchi-Delitala *et al.*, 1983; Arras y Grella, 1992; Tateo *et al.*, 1992; Ruberto *et al.*, 1992; Biondi *et al.*, 1993; Cosentino *et al.*, 1999; Arras y Usai, 2001), Israel (Fleisher *et al.*, 1984), Marruecos (Benouda *et al.*, 1988), Croacia (Kustrak *et al.*, 1990), Portugal (Miguel *et al.*, 2003), Albania (De Leo *et al.*, 2001; Miceli *et al.*, 2002) y Túnez (Mkaddem *et al.*, 2010). El aceite esencial de esta especie se caracteriza por sus altos niveles de carvacrol, con valores siempre comprendidos entre el 40 y el 80 % (Blanco, 2005), y pequeñas cantidades de timol, normalmente por debajo del 1% (Miceli *et al.*, 2006).



*Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. et Link.

En cuanto a la actividad biológica del aceite esencial de *T. capitatus*, se han realizado estudios en los que se demuestra su acción bactericida (Arras y Grella, 1992; Tateo *et al.* 1992; Biondi *et al.* 1993; Benouda *et al.* 1998; Arras y Usai, 2001; Faleiro *et al.* 2005), antioxidante (Miguel *et al.*, 2003; Faleiro *et al.* 2005; Ricci *et al.*, 2005; Mkaddem *et al.*, 2010), y fungicida (Grayer y Harborne, 1994; Kalemba y Kunicka, 2003; Ricci *et al.*, 2005; Palmeira de Oliveira *et al.*, 2012).

La actividad alelopática de *T. capitatus* ha sido objeto de diversas investigaciones. En Israel, se observó la supresión de plantas anuales, como *Plantago psyllium* y *Erucaria hispanica*, alrededor de formaciones de *T. capitatus*, verificándose estos efectos en laboratorio (Katz *et al.*, 1987). El aceite esencial de *T. capitatus* ha mostrado efectos fitotóxicos sobre la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de diversas especies (Katz *et al.*, 1987; Dudai *et al.*, 1999), además de ejercer una acción autoalelopática (Vokou y Margaris, 1986). En estudios recientes se ha evaluado in vitro el potencial herbicida del aceite esencial de *T. capitatus* en flotación y en estado vegetativo sobre *P. oleracea* y *C. canadensis*, obteniendo resultados semejantes y muy buenos en ambos casos, inhibiendo por completo la germinación de *C. canadensis* con todas las concentraciones aplicadas, y de *P. oleracea* con las dos concentraciones más altas (Verdeguer, 2011). Posteriormente se evaluó su potencial herbicida in vitro frente a *A. hybridus* y *P. oleracea*, inhibiendo la germinación y reduciendo el crecimiento de forma muy considerable, y en invernadero, en suelo procedente de cultivo de cítricos abandonado en el que el número de plantas fue mucho menor que en el ensayo control. (Mascarell, 2013).

### 3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es evaluar la actividad fitotóxica del aceite esencial de *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. et Link. sobre la germinación y crecimiento de arvenses comunes en los campos de cultivos mediterráneos, con el fin de determinar su posible uso como herbicida natural.

Para conseguir este objetivo principal se plantean los siguientes objetivos parciales:

Selección de especies arvenses consideradas problemáticas sobre las que se comprobará el potencial herbicida del aceite esencial.

Determinación de la composición química del aceite esencial de *T. capitatus*.

Realización de ensayos *in vitro* para determinar los efectos del aceite esencial de *T. capitatus* sobre la germinación y el crecimiento de arvenses.

Realización de ensayos de actividad herbicida del aceite esencial de *T. capitatus* en invernadero, comparando distintos métodos de aplicación.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Material vegetal

Con el fin de obtener el aceite esencial necesario para los ensayos objeto de este estudio se recolectó la parte aérea de plantas de *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. et Link localizadas en el término municipal de Carmona (Sevilla), en julio de 2012.

Se recolectaron en estado de fructificación las arvenses *Portulaca oleracea* L. (Sinarcas (Valencia), octubre de 2007), *Amaranthus hybridus* L. (Puzol (Valencia), noviembre de 2011), *Conyza canadensis* (L.) Cronq. (Sinarcas (Valencia), noviembre de 2011), *Setaria adhaerens* (Forssk.) Chiov. (Campus de la Universitat Politècnica de València (Valencia), noviembre 2011), *Solanum nigrum* L. (campos de Villena (Alicante), octubre 2012), y *Sonchus oleraceus* L. y *Chenopodium álbum* L. (campos de Santo Domingo de la Calzada (La Rioja), octubre de 2012) para conseguir las semillas sobre las que se estudió el potencial herbicida del aceite esencial de *T. capitatus*.

Las plantas recogidas se dejaron secar varios días en el laboratorio a temperatura ambiente, extrayéndose a continuación las semillas para la realización de ensayos. Una vez descartadas aquellas semillas que presentaban tamaño, color, forma o estado de maduración anómalos, se introdujeron las semillas seleccionadas en placas Petri de 9 cm de diámetro y se sellaron con Parafilm, conservándose a temperatura ambiente hasta su utilización.

### 4.2. Obtención y rendimiento del aceite esencial

Para la obtención del aceite esencial de *T. capitatus* se utilizó toda la parte aérea de la planta, excepto los tallos más gruesos.

El aceite esencial se obtuvo por destilación con un aparato tipo Clevenger. y matraces redondos de 2l. Una vez troceado y pesado el material fresco mediante balanza de precisión, se introdujo en matraces redondos de 2l y se añadieron 1000 ml de agua destilada. Mediante mantas calefactoras se aplica calor al los matraces donde está contenida la planta, produciéndose vapor de agua que arrastra los componentes volátiles. Estos componentes volátiles se condensan en el refrigerante y pasan al tubo colector graduado, donde se recoge el aceite esencial obtenido. Este proceso se mantuvo durante más de 3 horas, y se dio por finalizada la destilación cuando se observó que durante 30 minutos no aumentó la cantidad de aceite esencial.

Se destilaron siete muestras. El rendimiento, expresado en volumen de aceite obtenido en mililitros, por gramos de planta destilados (v/w) para cada muestra es el siguiente:

**Tabla 1.** Rendimiento en aceite esencial de cada muestra

Muestra	Rendimiento (v/w)
M1	2
M2	3
M3	2
M4	3
M5	2
M6	4
M7	3

El rendimiento medio obtenido es de 3. La conservación del aceite extraído se realizó en nevera a 4°C.



Obtención de aceite esencial mediante un destilador tipo Clevenger

#### 4.3. Determinación de la composición del aceite esencial

De cada muestra de aceite obtenida se preparó una dilución con hexano al 10% para proceder al análisis de su composición química. La composición cuantitativa se analizó por cromatografía de gases y la composición cualitativa por cromatografía de gases-espectrometría de masas.

- Composición cuantitativa. Cromatografía de gases.

La cromatografía de gases fue realizada utilizando un cromatógrafo modelo Clarus 500GC Perkin-Elmer, equipado con un detector de ionización de llama (FID), una columna capilar Hewlett-Packard HP-1 (metil silicona) de 30 m de longitud, 0.2 mm de diámetro interno y 0.33  $\mu\text{m}$  de espesor de película.

El programa de temperatura de la columna utilizado fue 60°C durante cinco minutos, con un gradiente de 3°C/min hasta llegar a 180°C, a continuación se empleó un gradiente de 20°C/min hasta llegar a 280°C, manteniendo esta temperatura durante diez minutos.

El gas portador, fue helio a un flujo de 1 ml/ min. El FID fue mantenido a una temperatura de 250°C y el inyector a 220°C.

Los índices de retención de Kovats, empleados para identificar los compuestos, fueron calculados usando una mezcla de hidrocarburos C<sub>8</sub>-C<sub>32</sub>, que se cromatografió

cuando se analizaron las muestras. Una vez obtenidos los tiempos de retención, expresados en minutos, de cada uno de los componentes del aceite esencial, se determinó el índice de Kovats a partir de la siguiente fórmula:

$$IK = 100 * (n^{\circ} C_{HC_{n-1}} + [(\log TR X - \log TR_{HC_{n-1}}) / (\log TR_{HC_{n+1}} - \log TR_{HC_{n-1}})])$$

Siendo:

$n^{\circ} C_{HC_{n-1}}$ : número de carbonos del hidrocarburo anterior al compuesto

TR X: tiempo de retención del compuesto

TR  $HC_{n-1}$ : tiempo de retención del hidrocarburo anterior al compuesto

TR  $HC_{n+1}$ : tiempo de retención del hidrocarburo posterior al compuesto

- Composición cualitativa. Cromatografía de gases-espectrometría de masas.

La cromatografía de gases-espectrometría de masas se realizó con un aparato Varian Saturn 2000 equipado con una columna capilar Varian C.S. VA-5MS de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25  $\mu$ m de espesor de película. El modo de inyección empleado fue en split con un ratio de 1:25.

Los espectros de masas fueron obtenidos dentro de un rango de masas ( $m/z$ ) de 28-400 u.m.a., con un voltaje de ionización de 70 eV.

Se usaron las mismas condiciones de trabajo que para el cromatógrafo de gases.

Junto con las muestras se cromatografió una mezcla de hidrocarburos  $C_8$ - $C_{32}$  para calcular posteriormente los índices de retención de Kovats, de la forma descrita en el apartado anterior.

Los compuestos fueron identificados por su espectro de masas (Adams, 2007), confirmando su identidad con los índices de Kovats y comparando sus espectros de masas y sus tiempos de retención con otros de muestras patrón o con datos disponibles en la librería NIST 98 y en la literatura.

#### 4.4. Ensayo de actividad fitotóxica del aceite esencial *in vitro*.

Se evaluó el efecto del aceite esencial de *T. capitatus* sobre la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de las arvenses *S. adhaerens*, *S. nigrum*, *S. oleraceus* y *C. album*. Para la realización de este ensayo se colocaron 20 semillas de cada una de las especies estudiadas en placas Petri de 9 cm de diámetro con papel de filtro y se añadieron 4 ml de agua destilada (control). Las dosis ensayadas se prepararon añadiendo el aceite esencial en volúmenes de 0,5, 1, 2 y 4  $\mu$ l, obteniéndose concentraciones de 0.125, 0.25, 0.5 y 1  $\mu$ l/ml respectivamente. Por cada tratamiento se realizaron 5 repeticiones (100 semillas de cada arvense ensayada). Las placas se sellaron con Parafilm y se introdujeron en una cámara de germinación (marca CLIMAS modelo APG-GROW) donde se incubaron durante 14 días, a  $30.0 \pm 0.1^{\circ}C$  durante 16 horas de luz, y  $20.0 \pm 0.1^{\circ}C$  durante 8 horas de oscuridad.

Para evaluar la actividad herbicida se llevaron a cabo conteos de las semillas germinadas en todas las placas a los 3, 5, 7, 10 y 14 días del comienzo del ensayo, y se obtuvieron imágenes digitales de todas las placas en las que hubieran semillas germinadas para posteriormente, mediante el programa Image Tool, medir su longitud

(coleoptilo y radícula), con el fin de poder valorar el efecto del aceite esencial sobre el crecimiento de las plántulas. Una vez realizado cada conteo se volvieron a sellar las placas con Parafilm, sin añadir agua ni aceite esencial, y se introdujeron de nuevo en la cámara de germinación.



Preparación del ensayo in vitro

#### 4.5. Ensayo de la actividad fitotóxica del aceite esencial en invernadero.

Este ensayo se realizó en los invernaderos de la Universitat Politècnica de València. Se probaron 3 métodos distintos de aplicación del aceite esencial: inyección del aceite directamente en el suelo, aceite emulsionado con Tween 20 (producto suministrado por Sigma-Aldrich) y aceite emulsionado con Fitoil (producto suministrado por Xedaitalia), empleando 3 dosis: 1, 2 y 4  $\mu\text{l}/\text{ml}$ , con el fin de comprobar que método es más adecuado para mantener la actividad herbicida del aceite esencial en condiciones de invernadero.

Para cada tratamiento se utilizaron 5 macetas estancas de 2l de capacidad y otras 5 como control, en las que se pusieron 3 cm de perlita en la base y sobre ella 6 cm de suelo procedente de cultivo de cítricos abandonado. Se sembraron 10 semillas de cada especie arvense estudiada (*P. oleracea*, *A. hybridus*, *C. canadensis*, *S. adhaerens*, *S. nigrum*, *S. oleraceus* y *C. album*) en cada maceta, cubriéndolas con una pequeña capa de suelo, y se regaron con 200 ml de agua. Al día siguiente se procedió a la aplicación de las tres concentraciones de aceite esencial mediante los tres métodos descritos a continuación:

- Inyectado directamente al suelo, en el centro de la maceta, mediante una pipeta.
- Emulsionado con Fitoil, añadiendo en cada maceta la dosis de aceite correspondiente para cada concentración (1, 2 y 4  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) emulsionada con 100  $\mu\text{l}$  de fitoil (siguiendo las recomendaciones del fabricante: 100 ml/hl) y 100 ml de agua.
- Emulsionado con Tween 20, añadiendo en cada maceta la dosis de aceite correspondiente, emulsionado con 9,1  $\mu\text{l}$  de Tween 20 (para obtener una concentración de 100 mg/l (Angelini et al., 2003)) y 100 ml de agua.

Una vez a la semana se regaron las macetas hasta llevar el suelo a la capacidad de campo, y se efectuó el conteo y la identificación de las arvenses desarrolladas en cada maceta. Al llegar a floración las arvenses se extrajeron, y se evaluó su peso

fresco y seco, previo secado en estufa a 60°C. Durante el ensayo se registraron los datos de temperatura y humedad relativa del invernadero mediante una sonda HOBO Pro v2.



Preparación del ensayo de invernadero e inyección del aceite esencial

#### 4.6. Tratamiento y análisis estadístico de datos.

Para el procesamiento de datos se empleó el paquete estadístico Statgraphics Centurion. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA), verificando previamente la homocedasticidad de los datos mediante los test de Cochran, Bartlett y Levene.

En algunos casos, para satisfacer los requerimientos de homocedasticidad, se procedió a la transformación de los datos. Los porcentajes de germinación en el ensayo *in vitro* se transformaron mediante la fórmula  $y = \arcsen \sqrt{x}$ , donde  $x$  es el porcentaje de germinación en tanto por uno. Algunos resultados del ensayo en invernadero también se transformaron por este mismo motivo, empleando en este caso la fórmula  $y = \log(x+1)$ .

El ANOVA se realizó utilizando el test de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD) para discriminar entre las medias, con un nivel de confianza del 95% ( $P \leq 0.05$ ). En las tablas de los resultados, las diferencias significativas entre los distintos tratamientos se han indicado con letras diferentes en la misma columna.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Composición del aceite esencial de *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. et Link

En el aceite esencial de *T. capitatus* se identificaron 23 compuestos, alcanzando el 99,08 % de su composición (tabla 2). La fracción más abundante fue la de los monoterpenos oxigenados, representando un 79,07% del total identificado. El mayor número de compuestos identificados fueron monoterpenos hidrocarbonados, que además constituyen la segunda fracción más abundante en la composición del aceite, con un 17,33%. Los compuestos mayoritarios fueron carvacrol (77,13%),  $\gamma$ -terpineno (5,45%) y  $p$ -Cimeno (4,57%).

Tabla 2. Composición del aceite esencial de *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. et Link.

Compuestos	IK	Área (%)
<b>Monoterpenos hidrocarbonados</b>		<b>17,33</b>
$\alpha$ -Tuyeno	931	2,10
$\alpha$ -Pinoeno	938	0,71
Canfeno	955	0,09
$\beta$ -Pinoeno	977	0,06
Mirceno	992	2,03
$\alpha$ -Felandreno	1009	0,27
$\delta$ -3-Careno	1012	0,08
$\alpha$ -Terpineno	1021	1,37
$p$ -Cimeno	1031	4,57
Limoneno	1034	0,23
$\beta$ -Felandreno	1036	0,24
<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	1052	0,05
$\gamma$ -terpineno	1065	5,45
Terpinoleno	1089	0,08
<b>Monoterpenos oxigenados</b>		<b>79,07</b>
Hidrato de <i>cis</i> -sabineno	1077	0,19
Linalol	1105	0,93
Borneol	1180	0,06
Terpinen-4-ol	1187	0,54
Timol	1308	0,22
Carvacrol	1320	77,13
<b>Sesquiterpenos hidrocarbonados</b>		<b>2,50</b>
Cariofileno	1422	2,50
<b>Otros</b>		<b>0,18</b>
1-Octen-3-ol	982	0,18
3-Octanol	997	t
<b>TOTAL IDENTIFICADO</b>		<b>99,08</b>

La presencia de grandes cantidades de carvacrol es característica de esta especie, porque se halla siempre presente en unos niveles altos, comprendidos entre el 44-86 %, siendo usual valores superiores al 70 % (Hedhili *et al.*, 2002; Miguel *et al.*, 2003; Blanco, 2005; Faleiro, 2005; Verdeguer, 2011; Mascarell, 2013). Otros componentes característicos del aceite esencial de esta especie son el *p*-cimeno, el  $\gamma$ -terpineno y el  $\beta$ -cariofileno (Miguel *et al.*, 2003; Blanco, 2005; Mkaddem, 2010; Verdeguer, 2011; Mascarell, 2013).

### 5.2. Actividad fitotóxica *in vitro* del aceite esencial de *T. capitatus*.

La actividad fitotóxica del aceite esencial de *T. capitatus* se evaluó *in vitro* sobre *Solanum nigrum*, *Chenopodium album*, *Sonchus oleraceus* y *Setaria adhaerens* (tabla 3). Sobre *C. album* y *S. oleraceus* se obtuvo un porcentaje de inhibición de la germinación del 100 % con las cuatro concentraciones ensayadas. Sobre *S. nigrum* y *S. adhaerens* se obtuvo el mismo resultado con las dos concentraciones más altas (0,5 y 1  $\mu$ l/ml). Con las concentraciones de 0,125 y 0,25  $\mu$ l/ml los resultados también fueron muy buenos, obteniéndose un porcentaje de inhibición de la germinación de 86,32 y 80% respectivamente en *S. adhaerens*, y del 75,76 y 73,74% en *S. nigrum*, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre las dos concentraciones.

**Tabla 3.** Germinación de semillas tratadas con las diferentes concentraciones de aceite esencial de *T. capitatus* ensayadas.

Concentración $\mu$ l/ml	Germinación (%) $\pm$ e.s.			
	<i>Solanum nigrum</i>	<i>Chenopodium album</i>	<i>Sonchus oleraceus</i>	<i>Setaria adhaerens</i>
0 (control)	99,00 $\pm$ 1,00 a	98,00 $\pm$ 2,00 a	83,00 $\pm$ 4,4 a	95,00 $\pm$ 1,60 a
0.125	26,00 $\pm$ 11,1 b	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b	19,00 $\pm$ 7,50 b
0.250	24,00 $\pm$ 19,4 bc	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b	13,00 $\pm$ 6,00 b
0.5	0,00 $\pm$ 0,00 c	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 c
1	0,00 $\pm$ 0,00 c	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 c

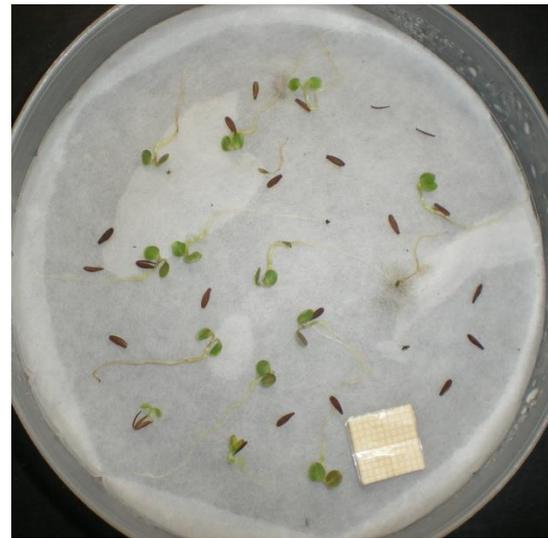
En cuanto al efecto sobre el crecimiento de las plántulas de las arvenses, en *C. album* y *S. oleraceus* no se pudo evaluar debido a que no germinó ninguna semilla tratada con las concentraciones de aceite esencial aplicadas. Esto mismo ocurrió en *S. nigrum* y *S. adhaerens* con las semillas tratadas con las dos concentraciones más altas (0,5 y 1  $\mu$ l/ml) (Tabla 4). La longitud de las plántulas de *S. nigrum* tratadas con las dos concentraciones menores (0,125 y 0,25  $\mu$ l/ml) se redujo en un 73,66 y 94,77% respectivamente respecto a la longitud de las plántulas control, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellas (Tabla 4 y Figura 1). En *S. adhaerens* esta reducción ha sido del 69,54 y 74,54 % (Tabla 4 y Figura 2).

**Tabla 4.** Efecto del aceite esencial de *T. capitatus* sobre el crecimiento de plántulas.

Concentración $\mu\text{l/ml}$	Crecimiento (mm) $\pm$ e.s.			
	<i>Solanum nigrum</i>	<i>Chenopodium album</i>	<i>Sonchus oleraceus</i>	<i>Setaria adhaerens</i>
0 (control)	47,07 $\pm$ 1,58 a	24,71 $\pm$ 1,19 a	17,23 $\pm$ 1,48 a	65,00 $\pm$ 2,22 a
0.125	12,40 $\pm$ 4,16 b	-	-	19,94 $\pm$ 6,15 b
0.250	2,46 $\pm$ 2,46 bc	-	-	16,23 $\pm$ 4,97 b
0.5	-	-	-	-
1	-	-	-	-



Control de *C. album* último día

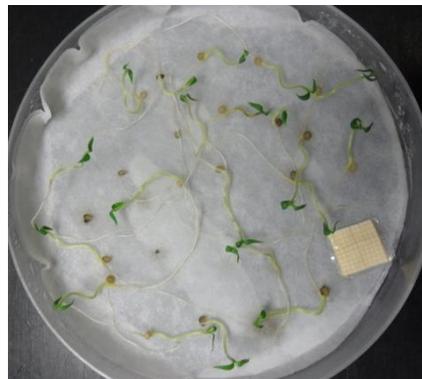
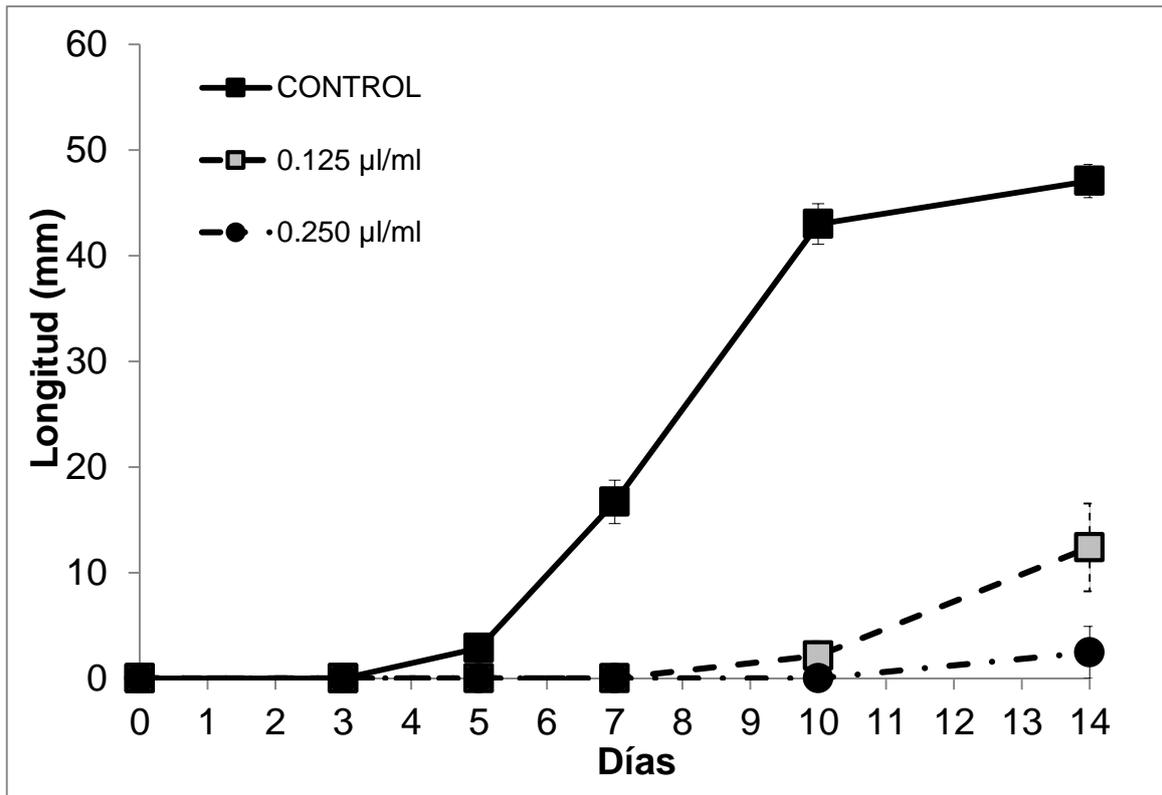


Control de *S. oleraceus* último día

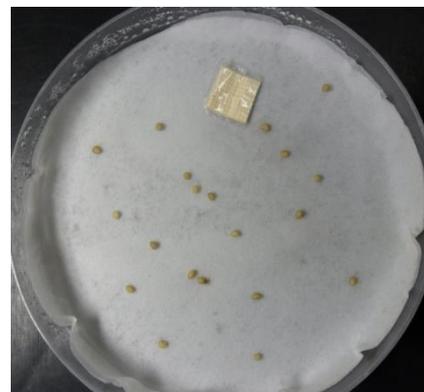
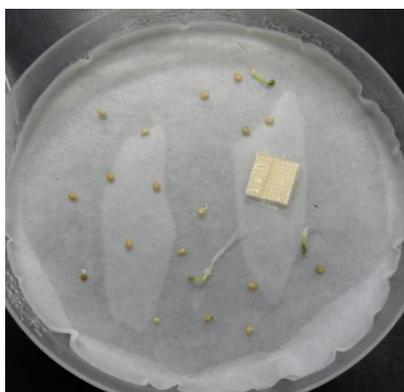


Placas con la dosis de aceite mínima (0,125  $\mu\text{l/ml}$ ) de *C. album* y *S. oleraceus* el último día de ensayo

Figura 1. Efecto del aceite esencial sobre el crecimiento de plántulas de *S. nigrum*

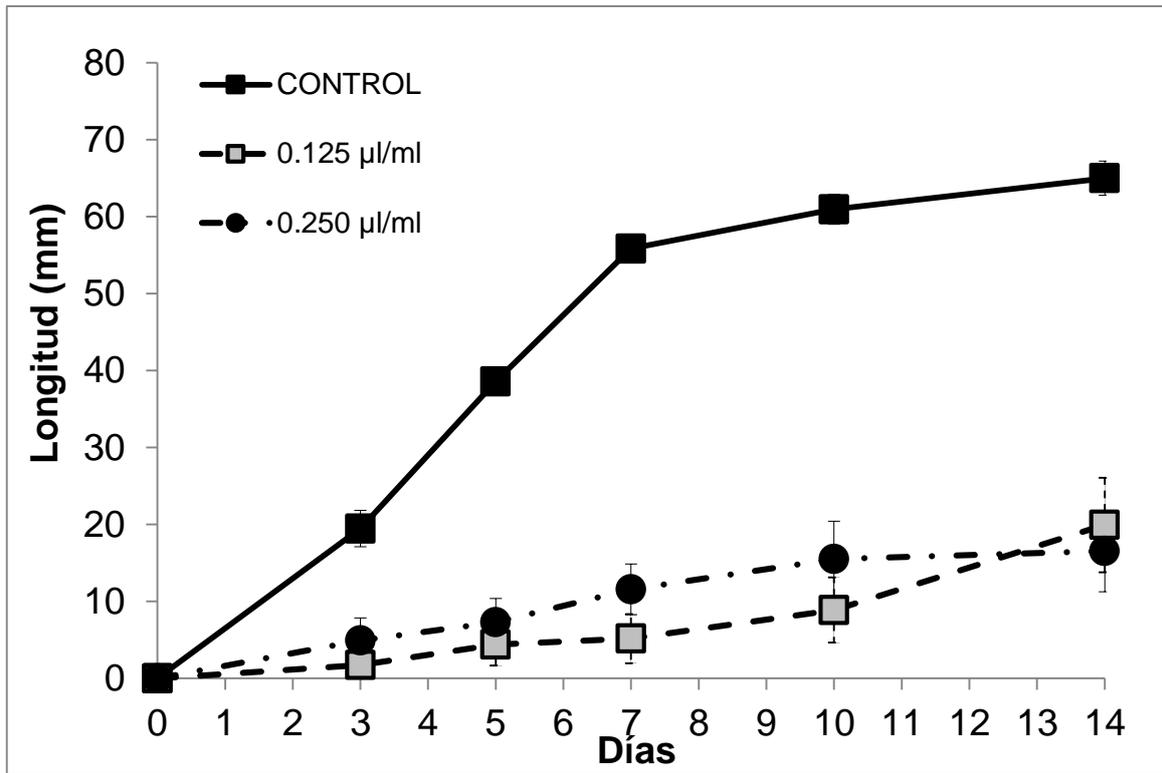


Control *S. nigrum* último día de ensayo



Placas 0,125 µl/ml y 0,250 µl/ml de *S. nigrum* el último día de ensayo

Figura 2. Efecto del aceite esencial sobre el crecimiento de plántulas de *S. adhaerens*



Control *S. adhaerens* el último día de ensayo



Placas 0,125 µl/ml y 0,250 µl/ml de *S. nigrum* el último día de ensayo

### 5.3. Actividad fitotóxica del aceite esencial en invernadero.

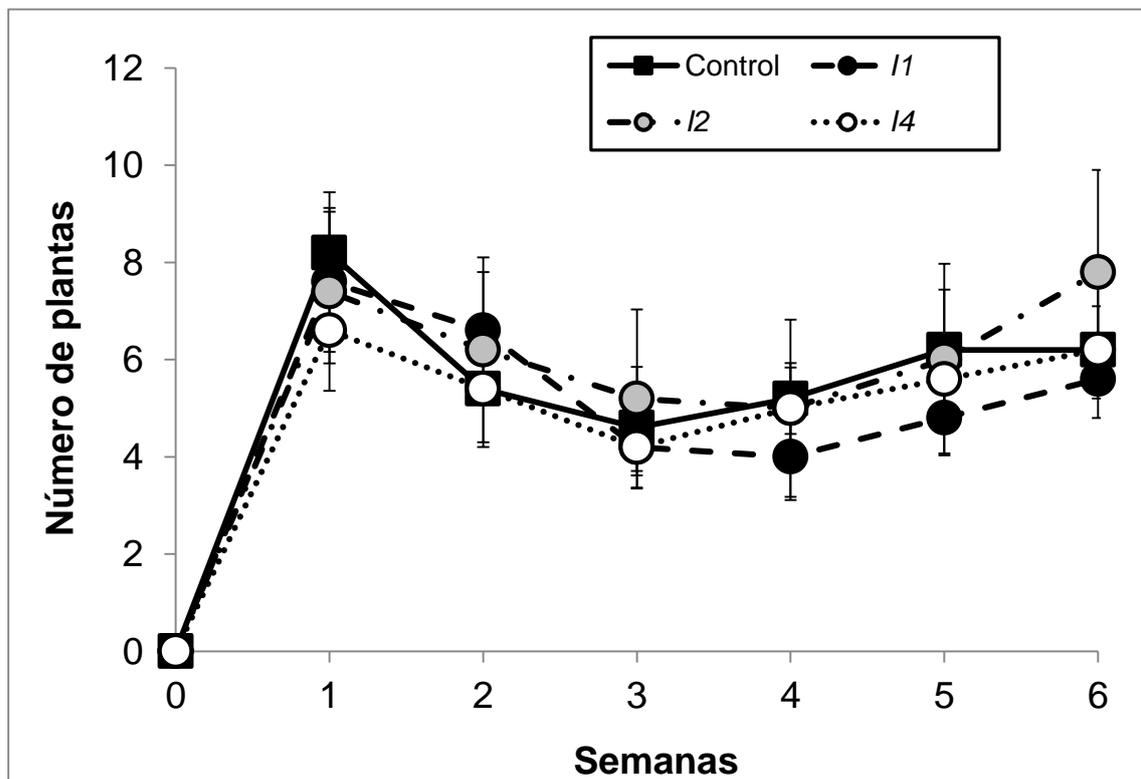
Se probaron 3 métodos distintos de aplicación del aceite esencial de *T. capitatus* en condiciones de invernadero: inyectado directamente al suelo, emulsionado con Twen 20 y emulsionado con Fitoil, con el fin de comprobar con cuál de ellos el aceite mostraba mayor actividad y persistencia.

Para la realización del ensayo se utilizó suelo recogido de un campo con cultivo de cítricos sin tratar con herbicidas, con su consiguiente carga de semillas, y además se añadieron diez semillas de especies arvenses sobre las que ya había sido comprobado el efecto del aceite esencial de *T. capitatus in vitro* (algunas estudiadas en el presente trabajo y otras en trabajos precedentes realizados por nuestro grupo de investigación de Recursos Fitoquímicos y Ecología Agroforestal del Instituto Agroforestal Mediterráneo): *Solanum nigrum*, *Chenopodium album*, *Sonchus oleraceus*, *Setaria adhaerens*, *Amaranthus hybridus*, *Portulaca oleracea* y *Conyza canadensis*

- Actividad fitotóxica del aceite esencial inyectado directamente en el suelo.

Durante las seis semanas que se mantuvo este ensayo no se obtuvieron buenos resultados con ninguna de las tres concentraciones aplicadas 1, 2 y 4  $\mu\text{l/ml}$ , ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas en ninguna de estas semanas en el número de arvenses registradas entre las macetas control y las macetas en las que se inyectaron las tres concentraciones (Figura 3).

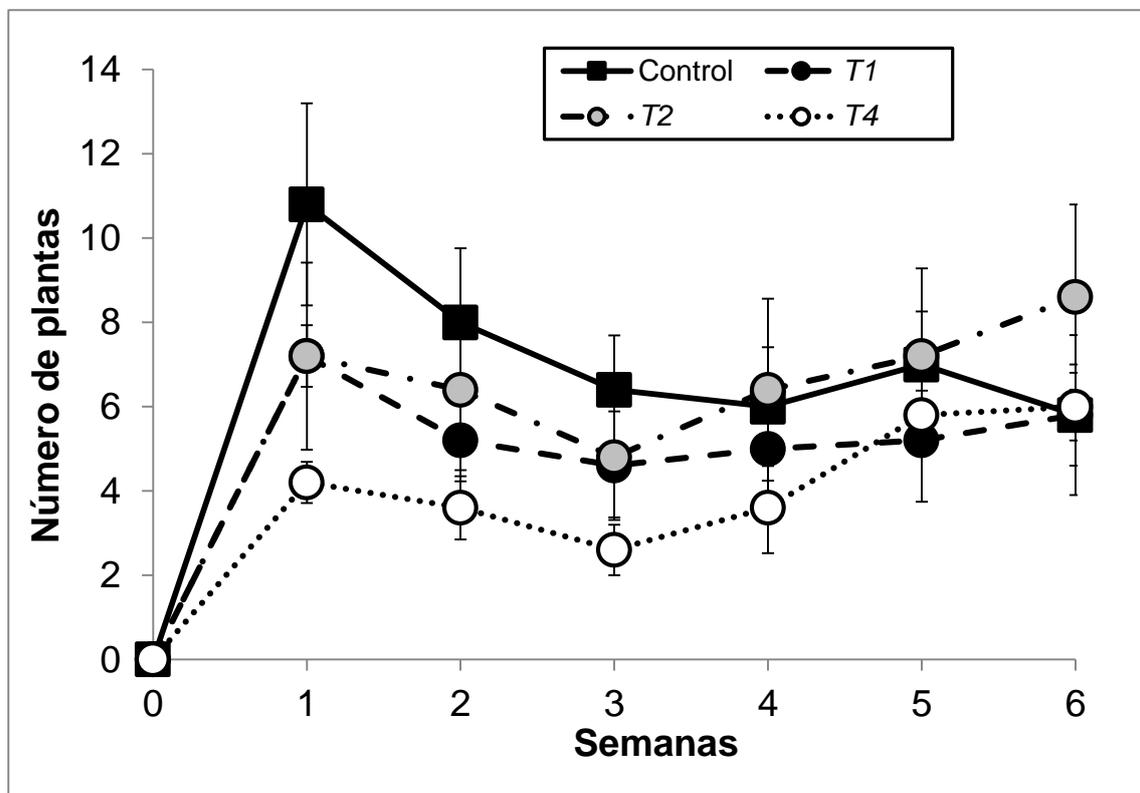
Figura 3. Efecto del aceite esencial inyectado en el suelo sobre en el número de plantas desarrolladas.



- Actividad fitotóxica del aceite esencial emulsionado con Tween 20

Al igual que el ensayo anterior, se mantuvo durante seis semanas. Tan solo en la primera semana tras la aplicación del aceite hubo diferencias estadísticamente significativas entre las macetas control y el resto de los tratamientos, alcanzándose una reducción del 61% en el número de plantas con la concentración mayor (4  $\mu\text{l/ml}$ ), no habiendo diferencias en los resultados entre las tres concentraciones. En el resto de semanas del ensayo, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el control y ninguno de los tratamientos, se observó que el número de plantas en las macetas tratadas con la concentración mayor (4  $\mu\text{l/ml}$ ) fue inferior al de las del control durante las cuatro primeras semanas, igualándose en las dos últimas (Figura 4).

Figura 4. Efecto del aceite esencial emulsionado con Tween 20 en el número de plantas



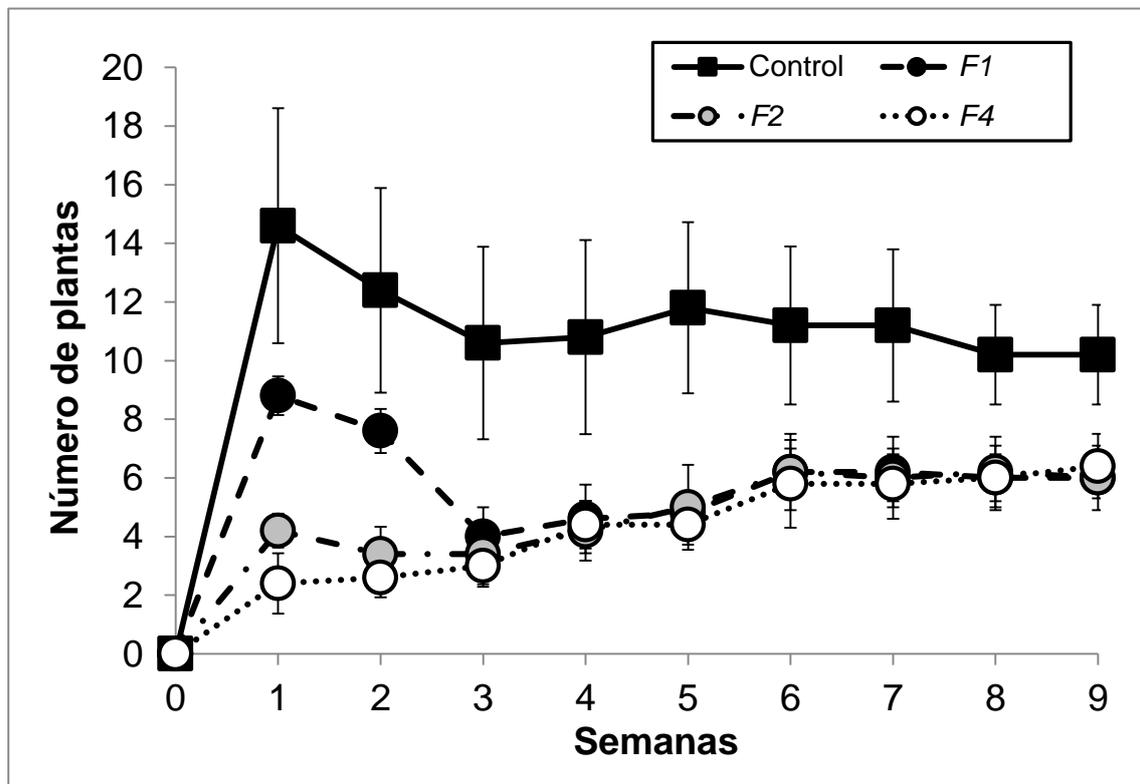
- Actividad fitotóxica del aceite esencial emulsionado con Fitoil.

Durante las 9 semanas que se mantuvo este ensayo el número de plantas crecidas en las macetas control fue superior al número de plantas crecidas en las macetas tratadas con las tres concentraciones de aceite esencial emulsionado con Fitoil, siendo las diferencias estadísticamente significativas hasta las dos últimas semanas. Los mayores efectos se observaron durante las dos primeras semanas, con un porcentaje de inhibición en el número de plantas tratadas con la mayor concentración (4  $\mu\text{l/ml}$ ) del 83,56% respecto del control (Figura 5).

En las dos primeras semanas del ensayo se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de plantas crecidas entre las macetas tratadas con las diferentes concentraciones de aceite emulsionado con Fitoil, sin embargo, a partir de la tercera semana el número de plantas crecidas en estas se igualaron, manteniéndose las diferencias solo con respecto a las macetas control (Figura 5).

Los porcentajes de inhibición en el número de plantas crecidas entre las macetas tratadas con las diferentes concentraciones de aceite emulsionado con Fitoil la última semana de ensayo fueron del 40% respecto a las macetas control.

**Figura 5.** Efecto del aceite esencial emulsionado con Fitoil en el número de plantas desarrolladas.



A la vista de estos resultados podemos decir que el método de aplicación que ha resultado más efectivo es el aceite esencial emulsionado con Fitoil, ya que la actividad fitotóxica se mantiene durante al menos siete semanas, mientras que el aceite emulsionado con Tween 20 solo mantiene la actividad durante dos semanas y el aceite inyectado no resultó efectivo en ningún momento del ensayo.

En los tratamientos con aceite emulsionado con Tween 20 y con Fitoil se observa que en las primeras semanas las concentraciones más altas son las más efectivas aunque en el caso del aceite emulsionado con Tween 20 no hay diferencias estadísticamente significativas, mientras que a partir de la tercera semana la actividad de las tres concentraciones aplicadas se iguala.

En un estudio reciente realizado en invernadero con aceite esencial de *T. capitatus* inyectado en un suelo procedente de campo de cultivo de cítricos, en el que

no se añadieron semillas de arvenses a parte de la propia carga de semillas del suelo, se obtuvo, con la concentración de 2  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , una disminución en el número de plantas de un 74,1 % respecto del control (Mascarell, 2013). Sin embargo, en el presente trabajo este mismo tratamiento no ha mostrado tan buenos resultados, pudiendo deberse a factores como las diferentes arvenses que se encontraran en cada uno de los suelos, ya que la actividad del aceite esencial depende de las especies sobre las que actúa y también a las condiciones ambientales del invernadero, ya que durante este ensayo la humedad relativa no se ha mantenido constante, posiblemente por un fallo en el sistema de refrigeración del invernadero, sufriendo un gran descenso la segunda semana (Figura 6) lo que pudo condicionar el desarrollo de las plántulas, principalmente las de las macetas control que son las primeras en emerger, causando su muerte.

#### 5.4. Efecto de la actividad fitotóxica del aceite esencial sobre la biomasa en el ensayo de invernadero.

En todos los tratamientos realizados en el invernadero, las plantas desarrolladas al llegar al estado de floración fueron extraídas y se registró su peso fresco y seco con el fin de comprobar si el aceite esencial aplicado afectaba a la biomasa de estas plantas.

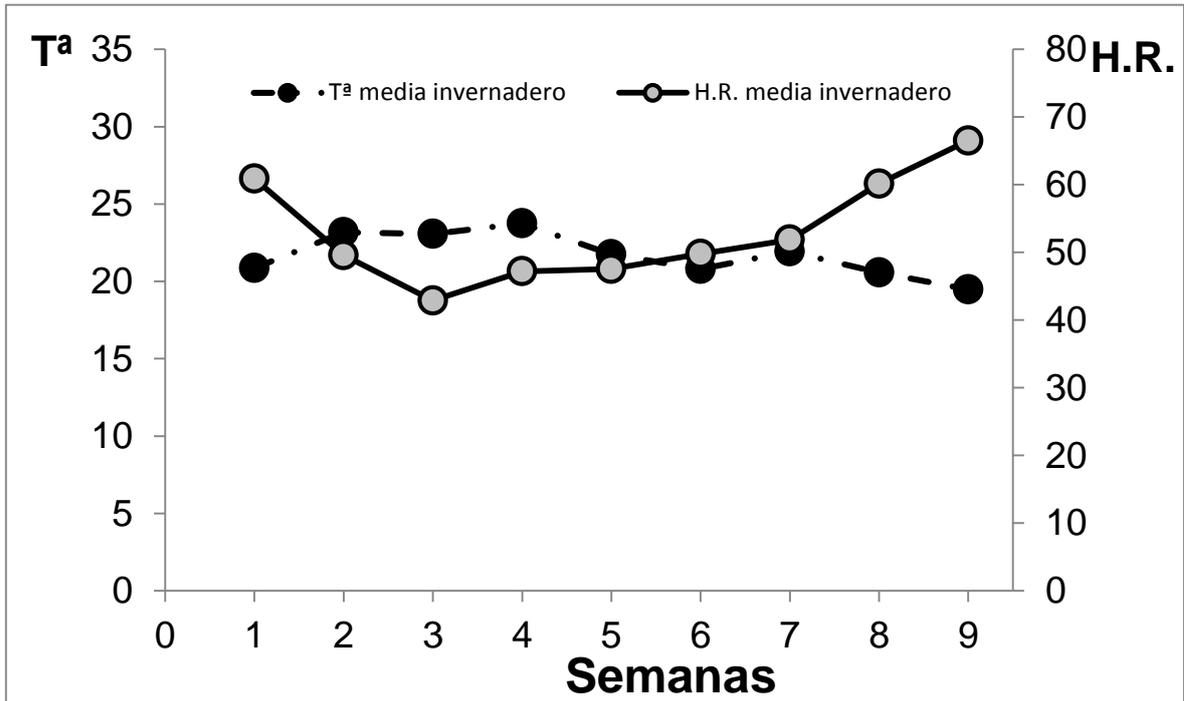
El análisis estadístico de los datos mostró que no existían diferencias estadísticamente significativas en el peso fresco y seco de las plantas tratadas con las diferentes concentraciones del aceite esencial en los distintos tratamientos ni entre estas y las control, por lo que la actividad fitotóxica del aceite no afectó a la biomasa obtenida en el ensayo de invernadero (Tabla 5).

**Tabla 5.** Peso fresco y seco de las plantas extraídas en estado de floración de los distintos tratamientos en el ensayo de invernadero.

Concentración $\mu\text{l}/\text{ml}$	Inyectado		Emulsionado con Tween 20		Emulsionado con Fitoil	
	PF	PS	PF	PS	PF	PS
Control	0,17 $\pm$ 0,05 a	0,05 $\pm$ 0,02 a	0,20 $\pm$ 0,08 a	0,09 $\pm$ 0,03 a	0,74 $\pm$ 0,38 a	0,14 $\pm$ 0,05 a
1	0,21 $\pm$ 0,10 a	0,08 $\pm$ 0,03 a	0,29 $\pm$ 0,13 a	0,10 $\pm$ 0,05 a	0,25 $\pm$ 0,11 a	0,10 $\pm$ 0,04 a
2	0,37 $\pm$ 0,23 a	0,16 $\pm$ 0,10 a	0,06 $\pm$ 0,06 a	0,02 $\pm$ 0,02 a	0,08 $\pm$ 0,06 a	0,02 $\pm$ 0,01 a
4	0,26 $\pm$ 0,13 a	0,06 $\pm$ 0,03 a	0,31 $\pm$ 0,14 a	0,10 $\pm$ 0,04 a	0,42 $\pm$ 0,12 a	0,17 $\pm$ 0,07 a

Durante la realización de este ensayo se registraron los datos de temperatura y humedad relativa del invernadero. La humedad relativa varió entre el 40 y el 70% y la temperatura entre los 20 y 25  $^{\circ}\text{C}$ .

Figura 6. Condiciones de temperatura y humedad relativa medias del invernadero durante el ensayo.



Ensayo de invernadero



Controles de los 3 métodos de aplicación



Aceite inyectado



Emulsionado con Tween 20



Emulsionado con Fitoil

## 6. CONCLUSIONES

Se identificó el 99,08 % de la composición del aceite esencial de *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. et Link., siendo los compuestos mayoritarios carvacrol (77,13 %),  $\gamma$ -terpineno (5,45 %) y *p*-Cimeno (4,57 %).

El aceite mostró una gran actividad fitotóxica *in vitro*, logrando un 100% de inhibición de la germinación en las 4 especies arvenses ensayadas.

En invernadero, el aceite esencial de *T. capitatus* no mostró actividad fitotóxica al ser inyectado al suelo, mientras que emulsionado con Tween 20 fue activo durante 2 semanas. El aceite emulsionado con Fitoil resultó efectivo durante las 9 semanas que se mantuvo el ensayo, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones aplicadas. No se observó en ningún caso efectos sobre la biomasa de las arvenses.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- ABENAVOLI, M.R., DE SANTIS, C., SIDARI, M., SORGONA, A., BDIANI, M., CACCO, G. 2001. Influence of coumarin on the net nitrate uptake in durum wheat (*Triticum durum* Desf. Cv. Simeto). *New Phytologist* 150, 619-627.
- ABENAVOLI, M.R., SORGONA, A., ALBANO, S., CACCO, G. 2004. Coumarin differentially affects the morphology of different root types of maize seedlings. *Journal of Chemical Ecology* 30, 1871-1883..
- ADAMS, R.P. 2007. Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, fourth ed. *Allured Publishing Corporation*, CarolStream, Illinois, USA.
- ALEXANDRATOS, N. 1999. World food and agriculture: outlook for the medium and longer term. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 96, 5908-5914.
- AL-KHATIB, K., LIBBEY, C., BOYDSTON, R. 1997. Weed suppression with *Brassica* green manure crops in green pea. *Weed Science* 45, 439-445.
- ALMELA, C. 2012. Incorporación de aceites esenciales en la conservación del caqui "rojo brillante" y melón "piel de sapo" mínimamente procesados. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de Valencia e Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Valencia. España.
- AMAT, A.G. 1991. Revisión y enfoque quimiosistemático de las especies argentinas del género *Conyza* Less., con especial referencia al grupo *C. albida*-*C. bonariensis*-*C. floribunda* (Asteraceae-Astereae). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de la Plata. Argentina.
- ANDERSSON, S. 1991. Geographical variation and genetic analysis of leaf shape in *Crepis tectorum* (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* 178, 247-8.
- ANGELINI, L.G., CARPANESE, G., CIONI, P.L., MORELLI, I., MACCHIA, M., FLAMINI, G. 2003. Essential oils from Mediterranean Lamiaceae as weed germination inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 6158-6164.
- ARRAS, G. y GRELLA, G. E., 1992. Wild thyme, *Thymus capitatus*, essential oil seasonal changes and antimycotic activity. *Journal of Horticultural Science*. 67 (2), 197-202.
- ARRAS, G. y USAI, M. 2001. Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest citrus pathogens: Chemical analysis of *Thymus capitatus* oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. *Journal of Food Protection* 64 (7), 1025-1029.
- AURIA, F.D., TECCA, M., STRIPPOLI, V., SALVATORE, G., BATTINELLI, L., MAZZANTI, G. 2005. Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. *Medical Mycology* 43, 391-396.

- BAIS, H.P., VEPACHEDU, R., GILROY, S., CALLAWAY, R.M., VIVANCO, J.M. 2003. Allelopathy and exotic plant invasion: From molecules and genes to species interactions. *Science* 301, 1377-1380.
- BARNES, J.P., PUTNAM, A.R., BURKE, B.A., AASEN, A.J. 1987. Isolation and characterization of allelochemicals in rye herbage. *Phytochemistry* 26, 1385-1390.
- BASSETT, I.J., CROMPTON, C.W., 1978. The biology of Canadian weeds. 32. *Chenopodium album* L. *Canadian Journal of Plant Science* 58, 1061-1072.
- BASU, C.H., MATTHEW, D., MUELLER, T.C., STEWART JR, C.N., 2004. Weed genomics: new tools to understand weed biology. *Trends in Plant Science* 9, 391-398.
- BATISH, D.R., SINGH, H.P., KAUR, S., KOHLI, R.K., YADAV, S.S. 2008. Caffeic acid affects early growth and morphogenetic response of hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus*). *Journal of Plant Physiology* 165, 297-305.
- BATISH, D.R., SINGH, H.P., KOHLI, R.K., KAUR, S., 2008. *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management* 256, 2166-2174.
- BENOUDA, A., HASSAR, M. y BENJILALI, B. 1988. Antiseptic properties of essential oils *in vitro*, tested against pathogenic hospital microorganisms. *Fitoterapia* 59 (2), 115-119.
- BERRY, A.D., STALL, W., RATHINASABAPATHI, B., MACDONALD, G.E., y CHARUDATTAN, R. 2006. Smooth Pigweed (*Amaranthus hybridus* L.) and Livid Amaranth (*Amaranthus lividus*) Interference with Cucumber (*Cucumis sativus*). *Weed Technology* 20(1), 227-231.
- BHOWMIK, P. C., REDDY, K. N. 1988. Interference of common lambsquarters (*Chenopodium album*) in transplanted tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Weed Technology* 2(4), 505-508.
- BIONDI, D., CIANCI, P., GERACI, C., RUBERTO, G., y PIATTELLI, M. 1993. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from sicilian aromatic plants. *Flavour and Fragrance Journal* 8, 331-337.
- BIRCH, A.N.E., BEGG, G.S. 2011. Agroecology research and crop protection: how Integrated Pest Management can help to deliver more sustainable farming systems and increase global food security. *Aspects of Applied Biology* 109, 19-23.
- BLANCO, J. 2005. Contribución al conocimiento de los recursos fitogenéticos de Extremadura: el caso de los tomillos. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura. España.
- BÓRTOLI, P., VERDENELLI, R., CONFORTO, C., VARGAS, S., MERILES, J. 2012. Efectos del herbicida glifosato sobre la estructura y el funcionamiento de comunidades microbianas de dos suelos de plantaciones de olivo. *Ecología Austral* 22, 33-42. Asociación Argentina de Ecología.
- BOUVERAT-BERNIER, J.P. 1992. Comparaison varietale de quatre menthes poivrees pour la production d'huile essentielle. *Herba Gallica* 2, 1-15.

- BOZIN, B., DUKIC, N.M., SAMOJLIK, I., JOVIN, E. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 7879-7885.
- BROWN, P.D., MORRA, M.J. 1996. Hydrolysis products of glucosinolates in *Brassica napus* tissues as inhibitors of seed germination. *Plant and Soil* 181, 307-316.
- BRUNETON J. 1991. Elementos de fitoquímica y de farmacognosia. Acribia, Zaragoza, España, 223-230.
- BURGOS, N.R., TALBERT, R.E. 2000. Differential activity of allelochemicals from *Secale cereale* in seedling bioassays. *Weed Science* 48, 302-310.
- CARRETERO, J. L. 1989. The cropland weeds of the Valencian community (Spain). In *Proceedings of the 4th EWRS symposium on weed problems in Mediterranean climates. Vol. 2. Problems of weed control in fruit, horticultural crops and rice*. Pp. 99-112.
- CASLEY-SMITH, J.R., CASLEY-SMITH, J.R. 1992. Modern treatment of lymphedema II. The benzopyrones. *Australian Journal of Dermatology* 33, 69-74.
- CASSMAN, K.G. 1999. Ecological intensification of cereal production systems: yield potential, soil quality, and precision agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 96, 5952-5959.
- CASTELLANO, D. 2002. Optimización de bioensayos alelopáticos. Aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. Tesis doctoral. Departamento de química orgánica. Facultad de ciencias. Universidad de Cádiz. España.
- CHAPIN, F., WALKER, L., FASTIE, C., SHARMAN, L. 1994. Mechanisms of primary succession following deglaciation at Glacier Bay, Alaska. *Ecological Monographs* 64, 149-175.
- CHAUHAN, B.S., JOHNSON, D.E., 2009. Seed germination ecology of *Portulaca oleracea* L.: an important weed of rice and upland crops. *Annals of Applied Biology* 155, 61-69.
- CHEVALLIER, A. 1996. The encyclopedia of medicinal plants: A practical reference guide to more than 500 key medicinal plants and their uses. DK Publ., New York.
- CHUNG, I.M., KIM, K.H., J.K., CHUN, S.C., KIM, C.S., KIM, J.T., KIM, S.H. 2002. Screening of allelochemicals on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) and identification of potentially allelopathic compounds from rice (*Oryza sativa*) variety hull extracts. *Crop Protection* 21, 913-920.
- CLAY, D.V., DIXON, F.L., WILLOUGHBY, I. 2005. Natural products as herbicides for tree establishment. *Forestry* 78, 1-9.
- COSENTINO, S., TUBEROSO, C. I. G., PISANO, B., SATTA, M., MASCIA, V., ARZEDI, E. y PALMAS, F. 1999. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 29 (2), 130-135.

- DAYAN, F., ROMAGNI, J., TELLEZ, M., ROMANDO, A., DUKE, S. 1999. Managing weeds with natural products. *Pesticide Outlook* 10, 185-188.
- DAYAN, F.E., CANTRELL, C.L., DUKE, S.O. 2009. Natural products in crop protection. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 17, 4022-4034.
- DE LEO, P., KONGJIKA, E., MICELI, A., NEGRO, C., TOMMASI, L., 2001. Comparison of essential oil in ecotypes from Albania and South Apulia: *Thymus capitatus*, *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis*. *Proceeding of the Fourth Seminar Italo-Albanian Cooperation for the Enhancement of Plant Biodiversity*, 22-23.
- DEHNE, H.W., SCHÖNBECK, F. 1994. Crop protection: past and present. Crop production and crop protection. En Oerke, E. C., Dehne, H. W., Schönbeck, F., Weber, A. (Eds). Elsevier, Amsterdam, pp. 45-71.
- DESCALZO, R.C., PUNJA, Z.K., LÉVESQUE, C.A., RAHE, J.E. 1996. Assessment of host specificity among different species of glyphosate synergistic Phytium. *Micological Research* 100, 1445-1453.
- DUDAI, N., POLJAKOFF-MAYBER, A., MAYER, A. M., PUTIEVSKY, E., LERNER, R. 1999. Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. *Journal of Chemical Ecology* 25, 1079-1089.
- DUKE, S., DAYAN, F., ROMAGNI, J., ROMANDO, A. 2000. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. *Weed Research* 40, 99-111.
- DUKE, S.O., POWLES, S.B. 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science* 64, 319-325.
- EINHELLIG, F.A. 1994. Allelopathy: Current status and future goals. In *Allelopathy*, Inderjit, D., Dakshin, K.M.M. and Einhellig, F.A. (Eds) 1-24. Washington, D.C.: American Chemistry Society.
- EINHELLING, F.A., LEATHER, G.R. 1988. Potentials for exploiting allelopathy to enhance crop production. *Journal of Chemical Ecology* 14, 1829-1844.
- EL-ROKIEK, K.G., RAFAT, R., EL-MASRY, N.K., AHMED, S.A. 2010. The allelopathic effect of mango leaves on the growth and propagative capacity of purple nutsedge (*Cyperus rotundus* L.). *Journal of American Science* 6, 151-159.
- FALCHI- DELITALA, L., SOLINAS, V. y GEESA, C. 1983. Seasonal quantitative and qualitative variations of essential oil and its phenols in *Thymus capitatus* Hoffm. and Link and *Thymus herba-barona* Liosel. *Fitoterapia*. 54 (2), 87-96.
- FALEIRO, L., MIGUEL, G., GOMES, S., COSTA, L., VENANCIO, F., TEIXEIRA, A., FIGUEIREDO, A. C., BARROSO, J. G., PEDRO, L. G. 2005. Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (21), 8162-8168.
- FISCHER, N., WEIDENHAMER, J., RIOPEL, J., QUIJANO, L., MENELAOU, M. 1990. Stimulation of witchweed germination by sesquiterpene lactones: a structure-activity study. *Phytochemistry* 29, 2479-2483.

- FISCHER, N.H. 1986. The function of mono and sesquiterpenes as plant germination and growth regulators. En: Putnam A.R. and Tang C.S. (Eds.), *The Science of Allelopathy*. Wiley-Interscience, New York, pp. 203–218.
- FITTER, A. 2003. Making allelopathy respectable. *Science* 301, 1337-1338.
- FLEISHER, A., FLEISHER, Z. y ABU RUKUN, S. 1984. Chemovarieties of *Coridothymus capitatus* L. Rchb. growing in Israel. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture* 35 (5), 495-499.
- FLORA IBERICA. 2013. <http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/000%20clavegeneral.pdf>
- FLORA VASCULAR. 2013. <http://www.floravascular.com>
- FORTUIN, J. M., OMTA, S.W.P. 1980 Growth analysis and shade experiment with *Solanum nigrum* L., the black nightshade, a leaf and fruit vegetable in West Java. *Netherlands Journals of Agricultural Science* 28, 199-210.
- FUENTES, F.F., MAUGHAN, P.J. y JELLEN, E.R. 2009. Diversidad genética y recursos genéticos para el mejoramiento de la quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Revista Geográfica de Valparaíso* 42, 20-33.
- GARCÍA, L., FERNÁNDEZ-QUINTANILLA, C. 1991. Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- GOBBI, A., BUDIA, F., SCHNEIDER, M., DEL ESTAL, P., PINEDA, S., VIÑUELA, E. 2000. Acción del Tebufenocida sobre *Spodoptera littoralis* (Boisduval), *Mythimna unipuncta* (Haworth) y *Spodoptera exigua* (Hübner). *Boletín de sanidad vegetal. Plagas* 26, 119-127.
- GONZALEZ PONCE, R., HERCE, A., SALAS, M. 1992. Emergencias y fenología de diversas malas hierbas infestantes del cultivo de maíz. In: Actas Congreso 1992 SEMh, Lérida. España. pp.147-152.
- GOODWIN, T.W. 1971. Aspects of terpenoid chemistry and biochemistry. Academic Press, Londres, United Kingdom.
- GRAY, R.J., HARBORNE, J.B., 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry* 37, 19-42.
- GROSS, M. 2011. New directions in crop protection. *Current Biology* 21, 641-643.
- GUEVARA, G. 2005. Encuesta sobre problemática de malezas en el cultivo de algodón en Chaco-Formosa. In: Proyecto Nacional Algodón. Informe de Avance N° 1. 2º Reunión Anual. Sáenz Peña, Chaco, Argentina: INTA EEA, pp. 101-104.
- GUILLEN, M.D., CABO, N., BURILLO, J. 1996. Characterisation of the essential oils of some cultivated aromatic plants of industrial interest. *Journal of the Scienc of Food and Agriculture* 70, 359-363.

HADACEK, F. 2002. Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Science* 21, 273-322.

HAIG, T. 2008. Allelochemicals in plants. En *Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry*. Springer New York, pp. 63-104.

HARAMOTO, E.R., GALLANDT, E.R. 2005. Brassica cover cropping: 1. Effects on weed and crop establishment. *Weed Science* 53, 695-701.

HARRISON, S.K., 1990. Interference and seed production by common lambsquarters (*Chenopodium album*) in soybeans (*Glycine max*). *Weed Science* 38, 113-118.

HEDHILI, L., ROMDHANE, M., ABDERRABBA, A., PLANCHE, H., CHERIF, I. 2002. Variability in essential oil composition of Tunisian *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. et Link. *Flavour and Fragrance Journal* 17, 26-28.

HASHEM, M., MOHARAM, A.M., ZAIED, A.A., SALEH, F.E.M. 2010. Efficacy of essential oils in the control of cumin root rot disease caused by *Fusarium* spp. *Crop Protection* 29(10), 1111-1117.

HEAP, I., 2013. THE INTERNATIONAL SURVEY OF HERBICIDE RESISTANT WEEDS. <http://www.weedscience.com>

HERBARIO DE NAVARRA. 2013. <http://www.unavarra.es/herbario/htm>

HERBARIO VIRTUAL DEL MEDITERRANEO OCCIDENTAL. UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS. 2013. <http://herbarivirtual.uib.es.html>

HOLM, L., DOLL, J., HOLM, E., PANCHO, J., HERBERGER, J. 1997. World weeds: natural histories and distribution. En John Wiley and Sons (Eds), Toronto, Ontario, pp. 226-235.

HOLM, L.G., PLUCKNETT, D.L., PANCHO, J.V. y HERBERGER, J.P. 1977. The world's worst weeds - distribution and biology. The University Press of Hawaii, Honolulu. pp. 436-9.

HOULT, J.R.S., PAYA, M. 1996. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. *General Pharmacology* 27, 713-722.

<http://fai.unne.edu.ar/biologia/plantas/alelopatia.htm>.

HUTCHINSON, I., COLOSI, J. y LEWIN, R.A. 1984. The biology of Canadian weeds. 63. *Sonchus asper* (L.) Hill and *S. oleraceus* L. *Canadian Journal of Plant Science* 64, 731-44.

INDERJIT, K., DUKE, S.O. 2003. Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta* 217, 529-539.

INDERJIT, K., STREIBIG, J.C., OLOFSDOTTER, M. 2002. Joint action of phenolic acid mixtures and its significance in allelopathy research. *Physiologia Plantarum* 114 (3), 422-428.

- ISMAIL, A., LAMIA, H., MOHSEN, H., BASSEM, J. 2012. Herbicidal potential of essential oils from three mediterranean trees on different weeds. *Current Bioactive Compounds*. 8(1), 3-12.
- ISMAN, M.B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellants in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology* 51, 45-66.
- ISMAN, M.B., MIRESMALLI, S., MACHIAL, C. 2011. Commercial opportunities for pesticide based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. *Phytochemistry Reviews* 10, 197-204.
- JOHAL, G.S., RAHE, J.E. 1984. Effect of soilborne plant-pathogenic fungi on the herbicidal action of glyphosate on bean seedlings. *Phytopathology* 74, 950-955.
- JOHN-SWEETING, R. S., PRESTON, C., BAKER, J., WALKER, S., y WIDDERICK, M. 2010. Genetic diversity among ALS-inhibiting herbicide resistant and susceptible populations of *Sonchus oleraceus* L.(sowthistle) in Australia. *Seventeenth Australasian Weeds Conference*, 281-284.
- KALEMBA, D., KUNICKA, A., 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry* 10, 813-829.
- KANIAS, G. D. y LOUKIS A. 1992. Statical analysis of essential oil percentage composition of *Coridothymus capitatus* Reichb. F. and *Satureja thymbra* L. *Journal Essential Oil Research* 4, 577-584.
- KAPUSTA, G. 1979. Seedbed tillage and herbicide influence on soybean (*Glycine max*) weed control and yield. *Weed Science* 27, 520-526.
- KATZ, D.A., SNEH, B., FRIEDMAN, J., 1987. The allelopathic potential of *Coridothymus capitatus* L. (Labiatae). Preliminary studies on the roles of the shrub in the inhibition of annuals germination and/or to promote allelopathically active actinomycetes. *Plant and Soil* 98, 53-66.
- KEELEY, P. E., TULLEN, R. J. 1989. Growth and competition of Black nightshade (*Solanum nigrum*) and Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) con algodón (*Gossypium hirsutum*). *Weed Science* 37(3), 326-334.
- KELTON, J., PRICE, A. J., MOSJIDIS, J. 2012. Allelopathic weed suppression through the use of cover crops. En Price, A. J. (Eds). *Weed Control*. Rijeka, Croatia: Intech Press, 115-130.
- KHANH, T.D., CHUNG, M.I., XUAN, T.D., TAWATA, S. 2005. The exploitation of crop allelopathy in sustainable agricultural productions. *Journal of Agronomy and Crop Science* 191, 172-184.
- KOKKINI, S., VOKOU D. 1989. Carvacrol-rich plant in Greece. *Flavour and Fragrance Journal* 4, 1-7.
- KUBECZKA, K-H. 2002. Essential oils analysis by capillary gas chromatography and carbon-13 NMR spectroscopy. En John Wiley & Sons (Eds). West Sussex, England, 2nd ed.

- KUSTRAK, D., MARTINIS, Z., KUFTINEC, J. y BLAZEVIC, N. 1990. Composition of essential oils of some *Thymus* and *Thymbra* species. *Flavour and Fragrance Journal* 5, 227-231.
- LABORDA, R. 2008. Apuntes de Protección de cultivos. Universidad Politécnica de Valencia.
- LEDDA, A. 2005. Control químico de malezas en el cultivo de algodón. In: Proyecto Nacional Algodón. Informe de Avance N° 1. 2º Reunión Anual. Sáenz Peña, Chaco, Argentina: INTA EEA, 124-126.
- LEE, D.L., PRISBYLLA, M.P., CROMARTIE, T.H., DAGARTIN, D.P., HOWARD, S.W., PROVAN, W.M., ELLIS, M.K., FRASER, T., MUTTER, L.C. 1997. The discovery and structural requirements of inhibitors of *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Weed Science* 45, 601-609.
- LÉVESQUE, C.A., RAHE, J.E., EAVES, D.M. 1993. Fungal colonization of glyphosate-treated seedlings using a new root plating technique. *Mycological Research* 97, 299-306.
- LEVITT, G. 1991. Discovery of the sulfonylurea herbicides, en: Baker, D.R., Fenyes, J.G., Moberg, W.K., Cross, B. (Eds.), *Synthesis and chemistry of agrochemicals II*, ACS Symposium Series 443. American Chemical Society, Washington, D.C, pp. 16-31.
- LI, Z., WANG, Q., RUAN, X., PAN, C., JIANG, D. 2010. Phenolics and plant allelopathy. *Molecules* 15, 8933-8952.
- LIEBMAN, M., OHNO, T. 1997. Crop rotation and legume residue effects on weed emergence and growth: application for weed management, en: Hatfield, J.L., Buhler, D. O., Stewart, B.A. (Eds.), *Integrated weed and soil management*. Ann Arbor Press, Michigan, USA, pp. 181-221.
- LÓPEZ MARTÍNEZ, N. 2009. Malezas asociadas a plantas ornamentales. *Fitosanidad*, 13(4), 233-236.
- LOUX, M., STACHLER, J., JOHNSON, B., NICE, G., DAVIS, V., y NORDBY, D. 2006. Biology and management of horseweed. The Glyphosate, *Weeds and Crop Series* 9, 11. <http://www.ces.purdue.edu/extmedia/GWC/GWC-9-W.pdf>
- LOVELL, S.T., WAX, L.M., HORAK, M.J., PETERSON, D.E., 1996. Imidazolinone and sulfonylurea resistance in a biotype of common waterhemp (*Amaranthus rudis*). *Weed Science* 44, 789-794.
- LOVETT, J., RYUNTYU, M. 1992. Allelopathy: broadening the context, en: Rizvi, S.J.H., Rizvi, V. (Eds.), *Allelopathy, basic and applied aspects*. Chapman & Hall, London, United Kingdom, pp. 11-19.
- MACÍAS, F.A. 1995. Allelopathy in the search for natural herbicide models. *ACS Symposium Series* 582, 310-329.
- MACÍAS, F.A. 2002. New approaches in allelopathy, challenge for the new millennium. Third World Congress Allelopathy Abstracts, 38.

- MACÍAS, F.A., OLIVEROS-BASTIDAS, A., MARIN, D., CASTELLANO, D., SIMONET, A.M., MOLINILLO, J.M.G. 2005. Degradation studies on benzoxazinoids. Soil degradation dynamics of (2*R*)-2-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-4-hydroxy-(2*H*)-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (DIBOA-Glc) and its degradation products, phytotoxic allelochemicals from Gramineae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 554-561.
- MACÍAS, F.A., MOLINILLO, J.M.G., VARELA, R.M., GALINDO, J.C.G., 2007. Allelopathy- a natural alternative for weed control. *Pest Management Science* 63, 327-348.
- MADDI, V., RAGHU, K.S., RAO, M.N.A. 1992. Synthesis and anti-inflammatory activity of 3- (benzylideneamino)coumarins in rodents. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 81, 964-966.
- MAHLEIN, A. K., OERKE, E. C., STEINER, U., DEHNE, H. W. 2012. Recent advances in sensing plant diseases for precision crop protection. *European Journal of Plant Pathology* 133, 197-209.
- MAILLET, J., LOPEZ-GARCÍA, C., 2000. What criteria are relevant for predicting the invasive capacity of a new agricultural weed? The case of invasive American species in France. *Weed Research* 40, 11-26.
- MALIK, M.S., NORSWORTHY, J.K., CULPEPPER, A.S., RILEY, M.B., BRIDGES, W. 2008. Use of wild radish (*Raphanus raphanistrum*) and rye cover crops for weed suppression in sweet corn. *Weed Science* 56, 588-595.
- MALLIK, A.U. 2000. Challenges and opportunities in allelopathy research: a brief overview. *Journal of Chemical Ecology* 26 (9), 2007-2009.
- MARTINEZ, M., y ALFONSO, P. 2003. Especies de malezas más importantes en siembras hortícolas del valle de Quíbor, estado Lara, Venezuela. *Bioagro* 15 (2), 91-96.
- MASCARELL, L. 2013. Activitat herbicida de l'oli essencial i l'extracte aquós de *Thymus capitatus* (L.) Hoffmans. Et Link. Trabajo Fin de Carrera. Universitat Politècnica de València.
- MERILES, J.M., GIL VARGAS, S., HARO, R.J., MARCH, G.J., GUZMÁN, C.A. 2006. Glyphosate and previous crop residue effect on deleterious and beneficial soil-borne fungi from a peanut-corn-soybean rotations. *Journal of Phytopathology*. 154, 309-316.
- MICELI, A., NEGRO, C., TOMMASI, L., 2006. Essential oil variability in *Thymbra capitata* (L.) Cav. growing wild in Southern Apulia (Italy). *Biochemical Systematics and Ecology* 34, 528-535.
- MICELI, A., TOMMASI, L., NEGRO, C., DE LEO, P., 2002. Composizione e variabilità dell'olio essenziale di *T. capitatus*. Proceedings of LXV Congress of SIFV, Riva del Garda (TN), Italia. 20-23.
- MIGUEL, M. G., FIGUEIREDO, A. C., COSTA, M. M., MARTINS, D., BARROSO, J. G. y PEDRO, L. 2003. Effect of essential volatile oil isolated from *Thymbra capitata* (L.) Cac. On olive and sunflower oils. *Grasa y Aceites* 54, 219-225.

- MITHEN, R. 2001. Glucosinolates and the degradation products. En J. Callow (Eds). *Advances in Botanical Research*. New York: Academic Press. pp 214-262.
- MKADDEM, M. G., ROMDHANE, M., IBRAHIM, H., ENNAJAR, M., LEBRIHI, A., MATHIEU, F. y BOUJAJILA, J., 2010. Essential Oil of *Thymus capitatus* Hoff. et Link. from Matmata, Tunisia: Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis and Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Journal of Medicinal Food* 13(6), 1500-1504.
- MORALES, R. 1986. Taxonomía de los géneros *Thymus* (excluida la sección *Serpyllum*) y *Thymbra* en la Península Ibérica. *Ruizia* (Monografías del Real Jardín Botánico) 3, 1-324.
- MUCCIARELLI, M., CAMUSSO, W., BERTEA, C. M., MAFFEI, M. 2001. Effect of (+)-pulegone and other oil components of *Mentha x Piperita* on cucumber respiration. *Phytochemistry* 57(1), 91-98.
- MYERS, R. 1986. Effects of shade on the biology of eastern black nightshade (*Solanum ptycanthum*). Tesis Doctoral Universidad de Illinois, Urbana.
- NEWMAN, E.I. 1982. The possible relevance of allelopathy to agriculture. *Pesticide Science* 13, 575-582.
- NORSWORTHY, J.K., MALIK, M.S., JHA, P., RILEY, M.B. 2007. Suppression of *Digitaria sanguinalis* and *Amaranthus palmeri* using autumn-sown glucosinolate-producing cover crops in organically grown bell pepper. *Weed Research* 47, 425-432.
- NORSWORTHY, J.K., MEEHAN, J.T. 2005. Herbicidal activity of eight isothiocyanates on Texas panicum (*Panicum texanum*), large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*), and sicklepod (*Senna obtusifolia*). *Weed Science* 53, 515-520.
- OERKE, E.C. 2006. Centenary Review. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science* 144, 31-43.
- OGG, A. G. JR., ROGERS, B. S., SCHILLING, E.E. 1981. Characterization of Black Nighthshade (*Solanum nigrum*) and related species in the United States. *Weed Science* 29 (1), 27-32.
- OLIVEROS-BASTIDAS, A. 2008. El fenómeno alelopático. El concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. *Revista Química Viva* 1, 2-34.
- OLOFSDOTTER, M. 2001. Rice-a step toward use of allelopathy. *Agronomy Journal* 93, 3-8.
- OMARA-ALWALA, T.R., MEBRAHTU T., PRIOR, D.E. y EZEKWE, M.O.. 1991. Omega-three fatty acids in Purslane (*Portulaca oleracea*) tissues. *Journal of the American Oil Chemist' Society* 68(3), 198-199.
- OSPINA, D.I., ÁLVAREZ, V., TORRES, H.G., SÁNCHEZ, M.S., BONILLA, C.R. 2011. Evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria de aceites esenciales de *Lippia origanoides* H.B.K. sobre el desarrollo micelial y la formación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. *Acta agronómica* 60, 306-311.

- PÁEZ, A., PÁEZ, P. M., GONZÁLEZ, M. E., VERA, A., RINGELBERG, D., y TSCHAPLINSKI, T. J. 2007. Crecimiento, carbohidratos solubles y ácidos grasos de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.) sometida a tres niveles de radiación. *Revista de la Facultad de Agronomía* 24(4), 642-660.
- PALMEIRA DE OLIVEIRA, A., GASPAS, C., PALMEIRA DE OLIVEIRA, R., SILVA DIAS, A., SALGUEIRO, L., CAVALEIRO, C., PINA-VAZ, C., MARTINEZ DE OLIVEIRA, J., QUEIROZ, J. A. y RODRIGUES, A. G. 2012. The anti-*Candida* activity of *Thymbra capitata* essential oil: Effect upon pre-formed biofilm. *Journal of Ethnopharmacology* 140 (2), 379-383.
- PAPAGEORGIU, V. P. y ARGYRIADOU N. 1981. Trace constituents in the essential oil of *Thymus capitatus*. *Phytochemistry* 20 (9), 2295-2297.
- PATTERSON, D.T. 1981. Effects of allelopathic chemicals on growth and physiological response of soybean (*Glycine max*). *Weed Science* 29, 53-58.
- PERRON, F., LÉGÈRE, A., 2000. Effects of crop management practices on *Echinochloa crus-galli* and *Chenopodium album* seed production in a maize/soybean rotation. *Weed Research* 40, 535-547.
- PETERSEN, J., BELZ, R., WALKER, F., HURLE, K. 2001. Weed suppression by release of isothiocyanates from turnip-rape mulch. *Agronomy Journal* 93, 37-43.
- PIEROZAN, M.K., PAULETI, G., ROTA, L., DOS SANTOS, A.C., LERIN, L.A., DI LUCCIO, M., MOSSI, A.J., ATTI-SERAFINI, L., CANSIAN, R.L., VLADIMIR OLIVEIRA, J. 2009. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *Salvia* L. species. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 29, 764-770.
- POONPAIBOONPIPAT, T., PANGNAKOM, U., SUVUNNAMEK, U., TEERARAK, M., CHAROENYING, P., LAOSINWATTANA, C. 2013. Phytotoxic effects of essential oil from *Cymbopogon citratus* and its physiological mechanisms on banyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). *Industrial Crops and Products* 41, 403-407.
- POSTEL, S. 1999. Pillar of sand: can the irrigation miracle last? Norton, New York.
- PRADO, RD, ROMERA, E., MENÉNDEZ, J., Y TENA, M. (1992). Mecanismo diferencial de la resistencia a la atrazina en *Setaria adhaerens* y *Setaria glauca*. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Universiteit Gent* 57 (3), 1067-1074.
- PRICE, A.J., CHARRON, C.S., SAMS, C.E. 2005. Allyl isothiocyanate and carbon dioxide produced during degradation of *Brassica juncea* tissue in different soil conditions. *HortScience*. 40, 1734-1739.
- PUTNAM, A.R. 1983. Allelopathic chemicals: nature's herbicides in action. *Chemical and Engineering News* 61, 34-45.
- PUTNAM, A.R. 1985. Allelopathic research in agriculture: past highlights and potential. En: Thompson A. C. (Eds) *The Chemistry of Allelopathy*. American Chemical Society, Washington, D.C, pp 1-8

- PUTNAM, A.R. 1988. Allelopathy: problems and opportunities in weed management. En: Altieri, M.A., Liebman, M. (Eds.), *Weed management in agroecosystems: ecological approaches*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, pp. 77-88.
- PUTNAM, A.R., WESTON, L.A. 1986. Adverse impacts of allelopathy in agricultural systems. En: Putnam, A. R., Tang, C. S. (Eds). *The science of allelopathy*. Wiley and Sons, New York, pp. 43-56.
- QARALLEH, H.N., ABBOUD, M.M., KHLEIFAT, K.M., TARAWNEH, K.A., ALTHUNIBAT, O.Y., 2009. Antibacterial activity in vitro of *Thymus capitatus* from Jordan. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 22, 247-251.
- RAZAVI, S.M. 2011. Plant coumarins as allelopathic agents. *International Journal of Biological Chemistry* 5, 86-90.
- RAZAVI, S.M., IMANZADEH, G.H., DAVARI, M. 2010. Coumarins from *Zosima absinthifolia* seeds, with allelopathic effects. *Eurasian Journal of Biosciences* 4, 17-22.
- RICCI, D., FRATERNALE, D., GIAMPERI, L., BUCCHINI, A., EPIFANO, F., BURINI, G., CURINI, M., 2005. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 98, 195-200.
- RICE, E.L. 1984. *Allelopathy*. 2 ed. Academic Press, London, United Kingdom.
- RIVERO-CRUZ, I., DUARTE, G., NAVARRETE, A., BYE, R., LINARES, E., MATA, R. 2011. Chemical composition and antimicrobial and spasmolytic properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* essential oils. *Journal of Food Science* 76, 309-317.
- RIZVI, S.J.H., HAQUE, H., SINGH, V.K., RIZVI, V. 1992. A discipline called allelopathy, en: Rizvi, S.J.H., Rizvi, V. (Eds.), *Allelopathy: Basic and applied aspects*. Chapman & Hall, London, United Kingdom, pp. 1-10.
- ROBERTSON, K.R. 1981. The General of Amarantaceae in the south eastern United States. *Journal of The Arnold Arboretum* 62 (3), 267-314.
- RUBERTO, G., BIONDI, D. y PIATTELLI, M. 1992. The essential oil of Sicilian *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. Et Link. *Journal of Essential Oil Research* 4, 417-418.
- RZEDOWSKI, G. C. DE, RZEDOWSKI, J. Y COLABORADORES, 2005. *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2a. ed., 1a reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), 1406 pp.
- SAMPIETRO, D.A. 2002. Alelopatía: concepto, características, metodología de estudio e importancia. Cátedra de Fitoquímica. Instituto de Estudios Vegetales Dr. Antonio R. Sampietro Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán Ayacucho.
- SANCHEZ, J.M. 2013. Aportación al conocimiento del género *Portulaca* L. (Portulacaceae) en España. <http://www.arbolesornamentales.es/Portulaca.pdf>.

- SANTANA, O., CABRERA, R., GIMÉNEZ, C., GONZÁLEZ-COLOMA, A., SÁNCHEZ-VIOQUE, R., DE LOS MOZOS-PASCUAL, M., RODRÍGUEZ-CONDE, M. F., LASERNA-RUIZ, I., USANO-ALEMANY, J., HERRAIZ, D. 2012. Perfil químico y biológico de aceites esenciales de plantas aromáticas de interés agro-industrial en Castilla-La Mancha (España). *Grasas y aceites* 63 (2), 214-222.
- SANTOS, B.M., DUSKY, J.A., STALL, W.M. 2003. Influencia de la fertilización fosforada sobre la interferencia de *Amaranthus hybridus* y *Portulaca oleracea* en lechuga producida en suelos orgánicos. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 67, 12-16.
- SANZ, G.M. y TERRAZAS, J.L.L. 2009. Novedades para la flora de la Sierra de Gúdar (Teruel), III. *Flora Montiberica* 44, 59-65.
- SAUER, J.D. 1950. The grain amaranths: a survey of their history and classification. *Ann. Missouri Botanical Garden* 37, 561-632.
- SAUERS, R.F., LEVITT, G. 1984. Sulfonylueras: new high potency herbicides, en: Magee, P.S., Khon, G.K., Mean, J.J. (Eds.), *Pesticide synthesis through rational approaches, ACS Symposium Series 255*, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 21-28.
- SCARFATO, P., AVALLONE, E., LANNELLI, P., DE FEO, V., ACIERNO, D., 2007. Synthesis and characterization of polyurea microcapsules containing essential oils with antigerminative activity. *Journal of Applied Polymer Science* 105, 3568-3577.
- SECOR, J. 1994. Inhibition of barnyardgrass 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by sulcotrione. *Plant Physiology* 106, 1429-1433.
- SEDERBERG, M. 2008. Physical mapping of ribosomal RNA genes in new world members of the genus *Chenopodium* using fluorescence *in situ* hybridization. M.S. Thesis, Brigham Young University.
- SINGH, H. P., BATISH, D.R., KOHLI, R.K. 2001. Allelopathy in agroecosystems: An overview. *Allelopathy in agroecosystems*. Haworth Press, New York. pp 1-41.
- SINGH, H.P., BATISH, D., KOHLI, R. 2003. Allelopathic Interactions and Allelochemicals: new possibilities for sustainable weed management. *Critical Reviews Plant Science* 22, 239-311.
- SÖKMEN, M.; SERKEDJIEVA, J.; DAFERERA, D.; GULLUCE, M.; POLISSIOU, M.; TEPE, B.; AKPULAT, A.; SAHIN, F., SOKMEN, A. 2004. *In vitro* antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 3309-3312.
- SOLÍS, P.N. 2011. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare* L.) y tomillo (*Thymus vulgaris* L. como potenciales bioconservadores en carne de pollo. Tesis de Grado. Escuela de bioquímica y farmacia. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador.

STONAR, R., MILLER-WIDEMAN, M. 1995. Herbicides and plant growth regulators, En: Godfrey, C. (Eds). *Agrochemicals from Natural Product*. Marcel Dekkert: New York, cap.6, pp.285-310.

TATEO, F., MARIOTTI, M. y BONONI, M. 1996. Essential oil composition and enantiomeric distribution of some monoterpenoid components of *Coridothymus capitatus* (L.) Reichenb. Fil. Grown in island of Kos (Greece). *La Rivista di Scienza dell' Alimentazione* 25, 103-107.

TATEO, F., SALVATORE, G. y NICOLETTI, M. 1992. Qualitative-sanitary and marketing aspects of essential oils. Part I: Diisopropylcresols in adulterated samples of thyme. *Industrie Alimentari*. XXXI, 28-35.

THÉBAUD, C., FINZI, A.C., AFFRE, L., DEBUSSCHE, M. y ESCARRE, J. 1996. Assessing why two introduced *Coryza* differ in their ability to invade mediterranean old fields. *Ecology* 77(3), 791-804.

THIEL, H., KLUTH, C., VARRELMANN, M., 2010. A new molecular method for the rapid detection of a metamitron-resistant target site in *Chenopodium album*. *Pest Management Science* 66, 1011-1017.

THRIPATHI, A.K., UPADHYAY, S., BHUIYAN, M., BHATTACHARYA, P.R. 2009. A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. *Journal of Pharmacogy and Phytotherapy* 15, 52-53.

TILMAN, D., CASSMAN, K.G., MATSON, P.A., NAYLOR, R. Y POLASKY, S. 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418, 671-677.  
TILMAN, D., FARGIONE, J., WOLFF, B., D'ANTONIO, C., DOBSON, A., HOWARTH, R., SWACKHAMER, D. 2001. Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science* 292 (5515), 281-284.

TWORKOSKI, T. 2002. Herbicide effects of essential oils. *Weed Science* 50, 425-431.

UYTTENDAELE, M., NEYTS, K., VANDERSWALMEN, H., NOTEBAERT, E., EBEVERE, J. 2004. Control of *Aeromonas* on minimally processed vegetables by decontamination with lactic acid, chlorinated water, or thyme essential oil solution. *International Journal of Food Microbiology* 90, 263-271.

VASILAKOGLU I., DHIMA K., WOGIATZI E., ELEFTHEROHORINOS I, LITHOURGIDIS A. 2007. Herbicidal potential of essential oils of oregano or marjoram (*Organum spp.*) and basil (*Ocimum basilicum*) on *Echinochloa crus galli* (L.) P. Beauv. and *Chenopodium album* L. weeds. *Allelopathy Journal* 20 (2), 297-306.

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

VERDEGUER, M., BLÁZQUEZ, M.A., BOIRA, H. 2012. Chemical composition and herbicidal activity of the essential oil from a *Cistus ladanifer* L. population from Spain. *Natural Product Research* 26, 1602-1609.

VILLASEÑOR, J. L. y ESPINOSA, F.J. 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

- VOKOU, D., DOUVLI, P., BLIONIS, G.J. HALLEY, J.M. 2003. Effects of monoterpenoids, acting alone or in pairs, on seed germination and subsequent seedling growth. *Journal of Chemical Ecology* 29, 2281–2301.
- VOKOY, D., MARGARIS, N. S. 1986. Autoallelopathy of *Thymus capitatus*. *Ecology Plant* 7, 157-163.
- VOZNESENSKAYA, E.V., KOTEYEVA, N.K., EDWARDS, G.E., OCAMPO, G., 2010. Revealing diversity in structural and biochemical forms of C4 photosynthesis and a C3-C4 intermediate in genus *Portulaca* L. (Portulacaceae). *Journal of Experimental Botany* 61, 3647-3662.
- VYVYAN, J.R. 2002. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron* 58, 1631-1646.
- WALIWITIYA, R., ISMAN, M. B., VERNON, R. S., RISEMAN, A. J. 2005. Insecticidal activity of selected monoterpenoids and rosemary oil to *Agriotes obscurus* (Coleoptera: Elateridae). *Journal of Economic Entomology* 5, 1560-1565.
- WARDLE, D.A., PARKINSON, D. 1990. Effects of three herbicides on soil microbial activity and biomass. *Plant Soil* 122, 21-28.
- WEAVER, S.E., 2001. The biology of Canadian weeds. 115. *Conyza canadensis*. *Canadian Journal of Plant Science* 81, 867-875.
- WEBSTER, R.D. 1993. Nomenclatura of *Setaria* (Poacea: Paniceae). *SIDA, contributions to botany* 15, 447-489.
- WEBSTER, T.M., 2002. Weed survey-southern states, vegetable, fruit, and nut crops subsection. *Proceedings Southern Weed Science Society* 55, 245-247.
- WELDON, C. W, SLAUSON, W. L 1986. The intensity of competition versus its importance: an overlooked distinction and some implications. *The Quarterly Review of Biology* 61, 23-44.
- WESTON, L. 2005. History and Current Trends in the Use of Allelopathy for Weed Management. *HortTechnology*, 15, 529-534.
- WESTON, L.A. 1996. Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems: Allelopathy in cropping systems. *Agronomy Journal* 88, 860-866.
- WHO (World Health Organization) in collaboration with UNEP (United Nations Environment Programme). 1990. Public health impact of pesticides used in agriculture. Geneva, World Health Organization.
- WIDDERICK, M.J. (2002). Ecology and management of the weed common sowthistle (*Sonchus oleraceus* L.) PhD thesis, University of New England, Armidale, NSW, Australia.
- WIESE, A.F., SALISBURY, C.D., BEAN, B.W., 1995. Downy brome (*Bromus tectorum*), jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*) and horseweed (*Conyza canadensis*) control in fallow. *Weed Technology* 9, 249-254.

- WINK, M. 1999. Introduction: Biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology. En: Wink, M. (Ed). Annual Plant Reviews, Vol. 3. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- WOLF, R.B., SPENCER, G.F., KWOLEK, W.F. 1984. Inhibition of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) germination and growth by benzyl isothiocyanate, a natural toxicant. *Weed Science* 32, 612-615.
- WORSHAM, A.D. 1989. Current and potential techniques using allelopathy as an aid in weed management, en: Chou, G.H., Waller, G.R. (Eds.), Phytochemical ecology: allelochemicals, mycotoxins and insect pheromones and allomones. Institute of Botany. Academia Sinica Monograph Series n°9, Taipei, Taiwan, ROC, pp. 275-291.
- YAMAMOTO, Y. 2008. Movement of allelopathic compound coumarin from plant residue of Sweet vernalgrass (*Anthoxanthum odoratum* L.) to soil. *Japanese Society of Grassland Science* 55, 36-40.
- YAZICI, I., TÜRKAN, I., SEKMEN, A.H., DEMIRAL, T. 2007. Salinity tolerance of purslane (*Portulaca oleracea* L.) is achieved by enhanced antioxidative system, lower level of lipid peroxidation and proline accumulation. *Environmental and Experimental Botany* 61, 49-57.
- YOUNG, S.L. 2004. Natural product herbicides for control of annual vegetation along roadsides. *Weed Technology* 18, 580-587.
- YU, J.Q., YE, S.F., ZHAN, M.F., HU, W.H. 2003. Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals, on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. *Biochemical Systematics and Ecology* 31, 129-139.
- ZAMUREENKO, V.A., KLUYEV, N.A., GRANDBERG, I.I., DMITRIEV, L.B. 1981. Composition of the essential oil of lemon grass (*Cymbopogon citratus* DC.). *Izvestiya Timiryazevskoi Sel'skokhozyaistvennoi Akademii* 2, 167-169.
- ZARAGOZA, C. 2012. En defensa de la sanidad vegetal. *Agricultura, revista agropecuaria* 952, 414-415.
- ZHANG, J., AN, M., WU, H., LIU, L.L., STANTON, R. 2012. Chemical composition of essential oils of four *Eucalyptus* species and their phytotoxicity on silverleaf nightshade (*Solanum elaeagnifolium* Cav.) in Australia. *Plant Growth Regulation* 68(2), 231-237.