

## Resumen

Las preocupaciones ambientales y de salud causadas por los sistemas tradicionales de protección de cultivos han estimulado el interés en estrategias alternativas para el manejo de las malas hierbas. En todo el mundo se están haciendo esfuerzos para reducir la gran dependencia de los herbicidas sintéticos que se utilizan como principal método para el control de las plantas arvenses. Los herbicidas naturales basados en sustancias alelopáticas, como los aceites esenciales (AEs) extraídos de plantas, se han sugerido como una de las posibles alternativas para lograr un manejo sostenible de las arvenses. Por un lado, los AEs han mostrado capacidad para inhibir la germinación y el crecimiento de semillas de malas hierbas, por otro lado, hay una falta de estudios sobre los efectos de tales sustancias sobre los microorganismos del suelo.

Por lo tanto, en esta tesis se ha investigado la actividad fitotóxica y herbicida de los AEs extraídos de plantas mediterráneas para determinar su potencial como herbicidas naturales en un contexto de manejo sostenible de las malas hierbas. Además, se han ensayado los efectos de los aceites esenciales, así como de otros extractos de plantas como hidrolatos, extractos acuosos y hojas frescas obtenidas de plantas mediterráneas, sobre los microorganismos del suelo.

Las especies donadoras de AEs fueron seleccionadas en base a conocimientos previos del grupo de investigación, y de acuerdo con la bibliografía existente sobre la actividad herbicida de metabolitos secundarios de estas especies o de especies que están taxonómicamente estrechamente relacionadas: *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *Eucalyptus occidentalis* Endl., *Eucalyptus globulus* Labill., *Eucalyptus torquata* Luehm., *Eucalyptus lesouffii* Maiden, *Thymbra capitata* (L.) Cav., *Mentha × piperita* L. y *Santolina chamaecyparissus* L. Como malas hierbas objetivo se seleccionaron dos monocotiledóneas, *Avena fatua* L. y *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. y dos dicotiledóneas, *Portulaca oleracea* L. y *Amaranthus retroflexus* L., todas ellas importantes malas hierbas en cultivos Mediterráneos.

La composición de los AEs se analizó mediante Cromatografía de gases (CG) y Cromatografía de gases-Espectrometría de masas (CG-EM). Los ensayos in vitro se realizaron en cámaras de germinación, para evaluar los efectos fitotóxicos de los AEs sobre la germinación de las malas hierbas y el crecimiento de las plántulas. Los ensayos in vivo se realizaron en condiciones de

invernadero, los AEs se aplicaron emulsionados con Fitoil mediante riego. Los efectos sobre las malas hierbas se evaluaron midiendo las siguientes variables: longitud de la raíz, de la parte aérea y total de las plantas, peso fresco y seco, eficacia del aceite esencial en cada planta, y nivel de daño causado. El estudio de los efectos fitotóxicos de los AEs sobre los microorganismos del suelo se realizó en un experimento de laboratorio en macetas donde los suelos se trataron con los AEs y extractos de hojas y luego se incubaron a temperatura ambiente (20-23 ° C). Los efectos sobre los microorganismos del suelo se midieron determinando las principales propiedades bioquímicas como el carbono y nitrógeno de la biomasa microbiana, la respiración microbiana y la abundancia relativa de los principales grupos microbianos.

Los resultados obtenidos de los ensayos in vitro revelaron que todos los AEs mostraron efectividad contra las malas hierbas ensayadas, controlando completamente su germinación o reduciéndola e inhibiendo significativamente el crecimiento de las plántulas. Entre ellos, *T. capitata* fue el más eficaz. A las dosis más bajas, bloqueó completamente la germinación de semillas de *A. retroflexus*, *P. oleracea*, *A. fatua* y *E. crus-galli*.

Los ensayos en invernadero demostraron la actividad herbicida de *T. capitata*, *M. piperita* y *S. chamaecyparissus*, aumentando su fitotoxicidad con la dosis. *T. capitata* fue el AE más eficaz contra todas las malas hierbas a la dosis máxima y *P. oleracea* fue la especie más resistente. Los microorganismos del suelo, después de un período transitorio de agitación inducido por la adición de los AEs, generalmente recuperaron su función y biomasa iniciales. Solo el AE de *T. capitata* a la dosis más alta no permitió que los microorganismos del suelo recuperaran completamente su funcionalidad inicial.

Los resultados de la aplicación de extractos de hojas al suelo proporcionaron evidencia de que las hojas de eucalipto y sus extractos (AE, hidrolatos y extractos acuosos), afectaron a la comunidad microbiana del suelo de diferente modo, y sus efectos fueron dependientes de la especie de *Eucalyptus* considerada.

Hasta el momento, los resultados obtenidos permiten sugerir la aplicación de los Aes como bioherbicidas en entornos controlados, como en horticultura y en condiciones de invernadero. Se debe identificar la dosis óptima de aplicación para controlar las malas hierbas y simultáneamente, no afectar negativamente a los microorganismos del suelo. No obstante, se necesita más investigación de campo para determinar el potencial herbicidal de los AEs en condiciones de campo, y se debe desarrollar una formulación más apropiada para su aplicación,

de modo que se mejore su persistencia y penetrabilidad, y así se incremente su potencial para controlar las malas hierbas.



Results obtained from the *in vitro* bioassays revealed that all used EOs displayed effectiveness against assayed weeds, controlling completely their germination process or reducing it and significantly inhibiting their seedling growth. Among them, *T. capitata* was the most effective. At lower doses, it blocked completely the seed germination of *A. retroflexus*, *P. oleracea*, *A. fatua* and *E. crus-galli*. Greenhouse trials demonstrated herbicidal activity of *T. capitata*, *M. piperita* and *S. chamaecyparissus*, increasing their phytotoxicity with the dose. *T. capitata* was the most effective against all weeds at the maximum dose and *P. oleracea* was the most resistant weed. Soil microorganisms, after a transient upheaval period, induced by the addition of EOs, generally recovered their initial function and biomass. Only *T. capitata* EO at the highest dose did not allow soil microorganisms to completely recover their initial functionality.

Results of leaf extracts application on soil provided evidence that *Eucalyptus* leaves and their extracts (EOs, hydrolates and aqueous extracts), affected soil microbial community in different ways, and those effects were dependent on the *Eucalyptus* species.

So far, the results obtained make feasible to suggest EOs application as bio-herbicides in controlled environments, such as horticulture and in greenhouse conditions. However, the optimum dose of application must be determined, to control weeds and simultaneously, not negatively affect soil microorganisms. Nonetheless, further field research is necessary to completely understand the potential of EOs in field conditions, and it is required to develop an appropriate formulation to improve the persistence and penetrability of EOs and so increase their capacity to control weeds.