

Evaluación de la potencialidad bioherbicida de orégano, romero y tomillo sobre la germinación de *Rumex obtusifolius* L. y *Spergula arvensis* L.

Lucía Torres^{1,2,✉}, Elvira A. Díaz Vizcaíno^{1,3}, Antonio Rigueiro²

¹Departamento de Botánica, Escuela Politécnica Superior, Universidade de Santiago de Compostela, 27002-Lugo

²Departamento de Producción Vegetal y Proyectos de Ingeniería, Escuela Politécnica Superior, Universidade de Santiago de Compostela, 27002-Lugo

³Instituto de Biodiversidad Agraria y Desarrollo Rural, Universidade de Santiago de Compostela, 27002-Lugo

✉ lucia.torres@usc.es

Resumen: Se han evaluado cuatro aceites y tres hidrolatos quimiotipados comerciales de orégano, romero y tomillo, con el objetivo de detectar si presentan actividad fitotóxica sobre la germinación de las semillas de *Rumex obtusifolius* L. y *Spergula arvensis* L., y si por lo tanto se podría incorporar su utilización a los tratamientos de control de malas hierbas, contribuyendo así a una agricultura sostenible. Se han realizado bioensayos sobre semillas de ambas especies, en concentraciones decrecientes de cada producto (primera fase) y, posteriormente, en agua (segunda fase). La mayoría de los aceites e hidrolatos inhiben fuertemente la germinación de las semillas en concentración elevada; manteniendo dicha inhibición solamente en una de ellas en las concentraciones más bajas analizadas. Tras la exposición al aceite/hidrolato, se aprecia una recuperación muy baja o nula de la germinación de las semillas.

Palabras clave: fitotoxicidad, semillas, *Origanum vulgare* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus vulgaris* L., *Thymus zygis* Loeff. ex L.

1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos fitotóxicos de las plantas son productos naturales que pueden ser una alternativa frente a los herbicidas y agroquímicos convencionales, cuyos efectos negativos relativos a resistencia de malas hierbas, degradación del suelo y ambientales, así como sobre los seres vivos son cada vez más evidentes, contribuyendo a la sostenibilidad de los sistemas de producción agrícola (Dayan et al., 2009).

El efecto fitotóxico de los aceites esenciales, cuyos compuestos pueden encontrarse en bajas concentraciones también en los hidrolatos, se ha encontrado en numerosas especies, produciendo un retraso o una inhibición de la germinación y del desarrollo inicial (longitud y biomasa) de las plántulas (Verdeguer et al., 2011; Blázquez and Carbó, 2015; Santos et al., 2015), como consecuencia de su efecto fisiológico que puede afectar tanto al proceso fotosintético, como a la actividad respiratoria de las plántulas, así como al metabolismo energético (Singh et al., 2004; Setia et al., 2007).

Estudios realizados con cuatro aceites (datos no publicados) y tres hidrolatos quimiotipados comerciales de orégano, tomillo y romero (Torres et al., 2014, 2016), han demostrado potencialidad fitotóxica sobre las semillas de *Parietaria judaica* L., por lo que se han evaluado nuevamente, con el objetivo de detectar si alguno de ellos presenta actividad fitotóxica sobre la germinación de las semillas de las plantas de *Rumex obtusifolius* L. y *Spergula arvensis* L., y si se podría incorporar por tanto su utilización a los tratamientos de control de malas hierbas, contribuyendo así a una agricultura sostenible.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Se recogieron frutos de *Rumex obtusifolius* y *Spergula arvensis* a finales del pasado verano en la finca de prácticas del *campus* universitario de Lugo, que se han almacenado en condiciones ambientales en el exterior, hasta la realización de los tratamientos. Los cuatro aceites y tres hidrolatos comerciales de orégano, romero y tomillo se han adquirido en diferentes empresas y su composición se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Productos comerciales (aceites esenciales –AE- e hidrolatos –H-) utilizados en los bioensayos de fitotoxicidad, indicando empresa suministradora y caracterizando las especies quimiotipadas (*Rosmarinus officinalis* L., *Thymus vulgaris* L. y *Thymus zygis* Loeff. ex L.)

Producto	Casa Comercial	Quimiotipo
AE <i>Origanum vulgare</i> L. (AEOV-)	Esencias Martínez Lozano, S.A.	–
AE <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (AERO-C)	Marnys-Martínez Nieto, S.A.	1,8 Cineol
AE <i>Thymus vulgaris</i> L. (AETV-L)	Marnys-Martínez Nieto, S.A.	Linalol
AE <i>Thymus zygis</i> Loeff. ex L. (AETZ-T)	Esencias Martínez Lozano, S.A.	Timol
H <i>Origanum vulgare</i> L. (HOV-)	Oshadhi España	–
H <i>Thymus vulgaris</i> L. (HTV-T)	Esencias Martínez Lozano, S.A.	Timol
H <i>Thymus zygis</i> Loeff. ex L. (HTZ-T)	Artesanía Ágave	Timol

Para evaluar el efecto de los cuatro aceites y tres hidrolatos sobre la germinación de las semillas de *Rumex obtusifolius* (en este caso frutos monoespermos) y *Spergula arvensis*, se ha diseñado un bioensayo dosis-respuesta, en condiciones controladas (fotoperiodo de 18 horas luz, a 22°C, y 6 horas oscuridad, a 18°C), que según estudios preliminares resultaron muy adecuadas para su germinación (datos no publicados).

En cada tratamiento se ha ensayado inicialmente una dosificación máxima, de 4 µl en el caso de los aceites, y la del producto sin dilución (100%) en los hidrolatos, y posteriormente, cuando se observó la eficacia del mismo (por inhibición de la germinación), tres dosificaciones decrecientes (2, 1, 0.5 µl para un volumen de 2 ml, en el caso de los aceites, y 50, 25 12.5% en los hidrolatos), de manera similar a las utilizadas en estudios con aceites (Verdeguer et al., 2009, 2011) y con hidrolatos (Valiño, 2013); así como un control, únicamente en agua destilada (2 ml para dicho volumen).

Cada ensayo se ha realizado en dos fases: una fase de producto (Fase I), las semillas estuvieron en presencia del producto en cada dosificación; y una siguiente fase de agua (Fase II), las semillas aparentemente viables al final de la fase anterior (solo cuando su proporción fue superior al 10%), fueron transferidas a nuevas placas y estuvieron únicamente en presencia de agua, en dosificación constante, simulando un hipotético lavado del producto, analizando así su posible recuperación, de manera similar a los estudios del efecto de la salinidad o el estrés hídrico sobre la germinación de las semillas (Guja et al., 2010); procedimiento que ha sido aplicado en estudios similares a éste en *Parietaria judaica* L. (Torres et al., 2014, 2016).

En cada tratamiento se han preparado cuatro réplicas de 25 semillas de las especies estudiadas, colocadas en placas Petri de 9 cm de diámetro sobre doble capa de papel de filtro, hume-

decido con la correspondiente dosificación, y cerradas con parafilm para evitar variaciones de la misma. El seguimiento diario de la germinación se ha realizado durante cuatro semanas, tiempo suficiente para que se estabilizara la dinámica de germinación.

Los porcentajes finales medios de germinación, se han comparado mediante el ANOVA o pruebas T, según resultase procedente, y el test DMS (Mínima Diferencia Significativa) *a posteriori* ($p < 0,05$), previa transformación «arco seno \sqrt{p} » (donde p: valor de germinación en tanto por uno), para garantizar su normalidad y verificación de la homogeneidad de su varianza mediante la prueba de Levene; realizado con el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 20 para WINDOWS, con licencia de la USC.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La mayoría de los aceites e hidrolatos inhibieron fuertemente la germinación de las semillas de las dos especies estudiadas a la dosificación más elevada ensayada, que se redujo desde un nivel muy elevado en el control hasta niveles muy bajos (Tabla 2). Dicha reducción se apreció significativamente con todos los productos en *Spergula arvensis*, mientras que en *Rumex obtusifolius* no resultó evidente con el aceite de romero, con el que la germinación se mantuvo muy elevada, ni con el aceite de tomillo linalol y el hidrolato de orégano, con los que se mantuvo en un nivel elevado que difirió significativamente del control.

A medida que disminuyó la dosificación también lo hizo la actividad fitotóxica de reducción de la germinación, de forma más apreciable en *Rumex obtusifolius* a partir de la segunda dosificación, con la que sin embargo se mantuvo un nivel muy bajo en *Spergula arvensis*; de modo que la germinación se mantuvo, en su menor dosificación, en niveles muy elevados, similares al control, con casi todos los productos. Esta tendencia de pérdida de eficacia en función de la dosificación, en mayor o menor medida, no se observa en *Spergula arvensis* en tomillo linalol, donde cabría esperar dicha tendencia ensayando dosificaciones aún menores, habitualmente no utilizadas en estudios de fitotoxicidad. Entre todos los productos destacan el aceite de tomillo timol y el de orégano, que mantuvieron su eficacia, con niveles muy bajos y bajos de germinación respectivamente en la menor dosificación; en la que en el resto de los productos se observó una reducción de la eficacia.

Los niveles de inhibición de la germinación producidos en las diferentes dosificaciones de los aceites e hidrolatos se mantuvieron en la segunda fase, cuando las semillas fueron lavadas y transferidas a agua, puesto que la recuperación de la capacidad germinativa resultó muy baja, o incluso nula; de modo que la germinación acumulada en esta fase prácticamente no difirió de la detectada en la primera, manteniéndose las diferencias significativas apreciadas previamente.

Es de señalar que durante el tiempo de realización de los ensayos (un mes en cada fase), se ha alcanzado un nivel de germinación muy elevado de las dos especies estudiadas, tanto en alguna de las dosificaciones analizadas de los diferentes productos como en el control, lo que evidencia la idoneidad de dichas especies para los bioensayos de fitotoxicidad.

La actividad fitotóxica de los aceites de diferentes especies de tomillo también ha sido encontrada por Ali et al. (2014), Kashkooli and Saharkhiz (2014) y Onaran et al. (2014) en *Medicago sativa* L., *Lepidium sativum* L. y *Triticum aestivum* L., entre otras, la del romero es bien conocida (Chen et al., 2013), y la de los hidrolatos lo es menos (Valiño, 2013); cuyos resultados, como en otros estudios, establecen que la actividad fitotóxica depende de la composición en aceites esenciales de cada producto, de la dosis aplicada y de la especie de mala hierba estudiada.

Tabla 2. Germinación media acumulada (G) de *Rumex obtusifolius* y *Spergula arvensis* en cada una de las fases (Fase I: fase de producto; Fase I+II: fase de producto+agua), para los cuatro aceites y tres hidrolatos estudiados en dosificaciones decrecientes. AEOV-: aceite esencial de *Origanum vulgare*; AERO-C: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* cineol; AETV-L: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol; AETZ-T: aceite esencial de *Thymus zygis* timol; HOV-: hidrolato de *Origanum vulgare*; HTV-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol; HTZ-T: hidrolato de *Thymus zygis* timol

Producto	Dosis	<i>Rumex obtusifolius</i>		<i>Spergula arvensis</i>	
		Fase I (P) G(%)	Fase I+II (P+A) G(%)	Fase I (P) G(%)	Fase I+II (P+A) G(%)
C	2.00 ml	94±2.00 ^a	-	89±2.52 ^a	-
AEOV-	4.00 µl	0±0.00 ^b	0±0.00 ^b	0±0.00 ^b	0±0.00 ^b
	2.00 µl	0±0.00 ^b	0±0.00 ^b	0±0.00 ^b	0±0.00 ^b
	1.00 µl	66±6.83 ^c	66.00±6.83 ^c	0±0.00 ^b	0±0.00 ^b
	0.50 µl	-	-	11±5.74 ^c	11±5.74 ^c
AERO-C	4.00 µl	94±2.58 ^a	94±2.58 ^a	8±1.63 ^b	16±3.65 ^b
	2.00 µl	-	-	43±5.74 ^c	49±6.61 ^c
	1.00 µl	-	-	-	-
	0.50 µl	-	-	-	-
AETV-L	4.00 µl	47±6.19 ^b	47±6.19 ^b	0±0.00 ^b	0±0.00 ^b
	2.00 µl	92±1.63 ^a	92±1.63 ^a	20±7.30 ^c	22±8.41 ^c
	1.00 µl	-	-	15±3.42 ^c	24±3.65 ^c
	0.50 µl	-	-	14±3.46 ^c	20±3.65 ^c
AETZ-T	4.00 µl	0±0.00 ^b	0±0.00 ^b	0±0.00 ^b	0±0.00 ^b
	2.00 µl	31±1.91 ^c	31±1.91 ^c	0±0.00 ^b	0±0.00 ^b
	1.00 µl	99±1.00 ^a	99±1.00 ^a	14±3.46 ^c	14±3.46 ^c
	0.50 µl	-	-	52±7.38 ^d	52±7.38 ^d
HOV-	2.00 ml	46±8.87 ^b	46±8.87 ^b	0±0.00 ^b	0±0.00 ^b
	1.00 ml	96±0.00 ^a	96±0.00 ^a	1±1.00 ^b	1±1.00 ^b
	0.50 ml	96±2.83 ^a	96±2.83 ^a	95±2.52 ^a	95±2.52 ^a
	0.25 ml	-	-	93±3.42 ^a	93±3.42 ^a
HTV-T	2.00 ml	1±2.00 ^b	4±1.63 ^b	0±0.00 ^b	0±0.00 ^b
	1.00 ml	46±7.39 ^c	46±7.39 ^c	0±0.00 ^b	0±0.00 ^b
	0.50 ml	99±1.00 ^a	99±1.00 ^a	43±6.61 ^c	43±6.61 ^c
	0.25 ml	-	-	91±1.00 ^a	91±1.00 ^a
HTZ-T	2.00 ml	0±0.00 ^b	0±0.00 ^b	0±0.00 ^b	0±0.00 ^b
	1.00 ml	68±5.89 ^c	68±5.89 ^c	0±0.00 ^b	0±0.00 ^b
	0.50 ml	94±2.58 ^a	94±2.58 ^a	92±2.83 ^a	92±2.83 ^a
	0.25 ml	-	-	87±3.79 ^a	87±3.79 ^a

Estos resultados confirman nuestra hipótesis inicial, ya que todos los aceites e hidrolatos estudiados han presentado actividad fitotóxica, en la mayor dosificación analizada, sobre la germinación de las semillas de *Spergula arvensis*, evidenciando así su potencialidad como bioherbicidas en agricultura ecológica, entre ellos solamente quedarían excluidos los aceites esenciales de tomillo, linalol y romero, en el caso de *Rumex obtusifolius*; destacando entre ellos aquellos en los que la germinación se produce en niveles bajos o muy bajos en las dos primeras dosificaciones estudiadas, que no se incrementan mucho más en la siguiente.

4. REFERENCIAS

- Ali IB, Bahri R, Chaouachi M, Boussaid M and Harzallah-Skhiri F (2014). Phenolic content, antioxidant and allelopathic activities of various extracts of *Thymus numidicus* Poir. organs. *Industrial Crops and Products*, 62, 188-195.
- Blázquez MA & Carbó E (2015). Control of *Portulaca oleracea* by boldo and lemon essential oils in different soils. *Industrial Crops and Products*, 515-521.
- Chen F, Peng SL, Chen BM, Ni GY and Liao HX (2013). Allelopathic potential and volatile compounds of *Rosmarinus officinalis* L. against weeds. *Allelopathy Journal*, 32, 57-66.
- Dayan FE, Cantrell CL and Duke SO (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17, 4022-4034.
- Guja LK, Merritt DJ and Dixon KW (2010). Buoyancy, salt tolerance and germination of coastal seeds: implications for oceanic hydrochorous dispersal. *Functional Plant Biology*, 37, 1175-1186.
- Kashkooli AB & Saharkhiz MJ (2014). Essential Oil Compositions and Natural Herbicide Activity of Four Denaei Thyme (*Thymus daenensis* Celak) Ecotypes. *Journal of essential oil bearing plants*, 17, 859-874.
- Onaran A, Yilar M, Belguzar S, Bayan Y and Aksit H. (2014). Antifungal and Bioherbicidal Properties of Essential Oils of *Thymus fallax* Fish & Mey., *Origanum vulgare* L. and *Mentha dumetorum* Schult. *Asian Journal of Chemistry*, 26, 5159-5164.
- Santos CA, Cardodo MD, Moreira ML, Silva AC and de Andrade J (2015). Chemical characterisation and allelopathic potential of essential oils from leaves and rhizomes of White ginger. *Ciencia Agronomica*, 46, 555-562.
- Setia N, Batish DR, Singh HP and Kohli RK (2007). Phytotoxicity of volatile oil from *Eucalyptus citriodora* against some weedy species. *Journal of Environmental Biology*, 28, 63-66.
- Sing HP, Batish DR, Kaur S, Vaid S and Kohli RK (2004). Weed suppressing ability of some monoterpenes. *Journal of Plant diseases and protection*, 19, 821-828.
- Torres L, Díaz-Vizcaíno EA and Rigueiro A (2014). Effect of blue gum, silver wattle and common gum cistus extracts on seed germination and seedlings development of *Parietaria judaica* L. *Organic Agriculture. International Symposium*. Pedrol N, Puig CG and Souza-Alonso P, p. 36. Tórculo Comunicación Gráfica S.A., Santiago de Compostela.
- Torres L, Díaz-Vizcaíno EA and Rigueiro A (2016). Efecto de hidrolatos de romero y tomillo sobre la germinación y el desarrollo de plántulas de *Parietaria judaica* L. *XII Congreso SEAE*. Sociedad Española de Agricultura Ecológica/Sociedad Española de Agroecología (SEAE), pp. 200-207. IMAG-Impressions S.L., Valencia.
- Valiño E (2013). *Estudio del potencial bioherbicida del hidrolato de Cistus ladanifer*. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Vigo.
- Verdeguer M, Blázquez A and Boira H (2009). Phytotoxic effects of *Lantana cámara*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Eriosephalus africanus* essential oils in weeds of Mediterranean summer crops. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37, 362-369.
- Verdeguer M, Blázquez A and Boira H (2011). Chemical composition and herbicidal activity of the essential oil from a *Cistus ladanifer* L. population from Spain. *Natural Product Research*, 26, 1602-1609.

Evaluation of bioherbicide potential of oregano, rosemary and thyme on germination of *Rumex obtusifolius* L. and *Spergula arvensis* L.

Summary: Four commercial essential oils and three hydrolates and their chemotypes of oregano, rosemary and thyme have been studied with the objective of exploring their phytotoxic activity on seeds germination of *Rumex obtusifolius* L. and *Spergula arvensis* L., and considering whether they could be used incorporated in control treatments of these weeds, thus contributing to a sustainable agriculture. Bioassays have been carried out on seeds of both species, applying initially decreasing concentrations of each product (first phase), and subsequently water (second phase). Most of the oils and hydrolates inhibit strongly the germination of the seeds at high concentration, maintaining this inhibition only in *Spergula* at the lowest concentrations. After exposure to oil/hydrolate germination recovery is very low or null for all the oils and hydrolates analysed.

Keywords: phytotoxicity, seeds, *Origanum vulgare* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus vulgaris* L., *Thymus zygis* Loeff. ex L.