

TESIS DE DOCTORADO

**FLORA VASCULAR DE LA  
MURALLA DE LUGO:**

**Control del crecimiento y germinación  
de la dominante *Parietaria judaica* L.**

Lucía Torres García

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN AGRARIA Y FORESTAL

LUGO

2018





## DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

FLORA VASCULAR DE LA MURALLA DE LUGO: Control del crecimiento y germinación de la dominante *Parietaria judaica* L.

Dña. Lucía Torres García

*Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:*

- 1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) *Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

*En Lugo, 15 de octubre de 2018*

Fdo.: Lucía Torres García





## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/TUTOR DE LA TESIS

FLORA VASCULAR DE LA MURALLA DE LUGO: Control del  
crecimiento y germinación de la dominante *Parietaria judaica* L.

Dña. Elvira Antonia Díaz Vizcaíno  
D. Antonio Rigueiro Rodríguez

INFORMAN:

*Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dña. **Lucía Torres García**, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directores de ésta no se incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

*En Lugo, 15 de octubre de 2018*

Fdo.: Elvira A. Díaz Vizcaíno

Fdo.: Antonio Rigueiro Rodríguez





*A mis padres, Carmen y Salvador*

*A J. Reyes*



## Agradecimientos

La elaboración de una tesis, además de un profundo proceso de aprendizaje, supone una modulación de vida que resulte compatible con ese largo camino; a su vez, te nutre de conocimiento personificado, por lo tanto para mí los agradecimientos suponen un ejercicio emocional ineluctable.

Necesariamente a mis directores de tesis, Elvira Díaz y Antonio Rigueiro, a los que les debo este crecimiento, tanto profesional como personal, por su paciencia, su efectiva transmisión de conocimientos y su apoyo para desarrollar mi trabajo; mención especial merece su preocupación continua en el campo personal, que inevitablemente se entrelaza, y su constante atención por los detalles en la elaboración de este trabajo. Sin vuestro impulso, no lo hubiera logrado.

A los profesores y compañeros de Departamento con los que he compartido trabajo Y VIDA: Teresa Cornide (siempre ahí, siempre insuflando ánimo), Ignacio García (siempre deslizas una anécdota para reflexionar), Manuel Souto (gracias por tu paciencia en los momentos menos exultantes, que son finalmente necesarios para descubrir tan buenas cualidades personales, por tu inmensa aportación en campos para mí desconocidos); a los que ya no comparten con nosotros este espacio de trabajo, de cada uno me queda una historia, Guillermo, Gonzalo, Dolo (se te extraña, qué vacío se ha quedado tu lugar...).

A los que habéis colaborado profesionalmente en este trabajo, a Cecilia y David, por su buena disposición en la realización de las actividades de invernadero y campo (con alegría aún cuando las condiciones fueron adversas); a Manuel Sánchez, por su colaboración en los bioensayos de fitotoxicidad, por tan buenos momentos en tan poco tiempo.

A M<sup>a</sup> del Pilar López, por su continua atención, interés, disposición y profesionalidad, por haber velado siempre por la estabilidad de nuestros ensayos, por revestir de una capa de piel hipersensible nuestros trabajos experimentales, es un placer toparse con profesionales como tú.

A Ignacio López de Rego, arquitecto conservador de la muralla, por facilitarnos el levantamiento topográfico del monumento para poder desarrollar nuestros estudios y por realizar su seguimiento y animarnos. A la empresa Restauraciones y Construcciones S. A. (RECONSA), y especialmente a Manuel Figueroa, que financió parte de los trabajos en el

marco de contratos con la Universidad de Santiago de Compostela y por su continua disposición para facilitarnos las tareas técnicas a desarrollar en el monumento. A la Consellería de la Xunta de Galicia con las competencias de Cultura que han valorado siempre positivamente nuestras investigaciones.

A Julio Seijas, por aturdirme con resonancias magnéticas (hidrógenos), cromatógrafos y espectómetros, al que agradezco su implicación para intentar cuidar los pequeños detalles metodológicos. A Luis Gómez, por darle vida a nuestras plántulas a través de sus dibujos y saber plasmar con sutileza los detalles, atendiendo con paciencia nuestras sugerencias. Al IBADER por facilitarnos la utilización del equipo de microscopía electrónica.

A mis amigos, por saber entender mis ausencias reiteradas, puntuales al principio, constantes al final, por no olvidar sus recordatorios de ánimo diarios. Bea, gracias por sostenerme, eres un auténtico descubrimiento.

A mis padres por el férreo soporte que han supuesto en mi vida, por apoyarme siempre en las decisiones tomadas; en especial a mi madre por haber sido un apoyo constante para los demás incluso cuando las circunstancias no resultaron tan favorables. A mi padre por enseñarme a amar desde pequeña las disciplinas *a priori* más intimidatorias, por hacerme ver que así hay que enfrentarse a la vida, por dibujar ese camino con tanta sencillez.

A J. Reyes, inexcusablemente mi artista favorito, bajista de profesión, escultidor de sonrisas por afición, por haber aprendido a entenderme en esta (no siempre fácil) etapa, preocuparse por mi trabajo en este proceso de aprendizaje y saber comprender mis ausencias aun habiendo estado presente.

## Índice

<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>33</b>
<b>2 CONTROL DE LA FLORA DE LA MURALLA ROMANA DE LUGO ...</b>	<b>39</b>
<b>2.1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>39</b>
<b>2.2 OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
<b>2.3 MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
2.3.1 Evaluación de la cobertura de la vegetación .....	46
2.3.2 Tratamientos fitosanitarios de control de la vegetación.....	47
2.3.2.1 Realización y seguimiento de la aplicación del tratamiento general.....	47
2.3.2.2 Realización de los ensayos particulares.....	51
2.3.2.2.1 Tratamientos físicos (solarización).....	51
2.3.2.2.2 Tratamientos químicos (nuevos productos herbicidas) .....	52
2.3.2.3 Realización de la limpieza (exterior e interior) .....	54
2.3.3 Análisis estadístico y representación gráfica .....	56
2.3.3.1 Elaboración de datos.....	56
2.3.3.2 Análisis y representaciones .....	56
<b>2.4 RESULTADOS .....</b>	<b>58</b>
2.4.1 Tratamiento general.....	58
2.4.1.1 Paramento exterior de la muralla de Lugo.....	58
2.4.1.1.1 Dos aplicaciones anuales .....	58
2.4.1.1.2 Dos aplicaciones anuales: orientación .....	63
2.4.1.1.3 Una aplicación anual.....	69
2.4.1.2 Paramento interior de la muralla de Lugo .....	71
2.4.2 Ensayos particulares .....	76
<b>2.5 DISCUSIÓN .....</b>	<b>82</b>
<b>2.6 CONCLUSIONES .....</b>	<b>86</b>
<b>3 CONTROL DE LA GERMINACIÓN Y DEL CRECIMIENTO INICIAL</b>	
<b>DE <i>Parietaria judaica</i> L.....</b>	<b>91</b>
<b>3.1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>91</b>
<b>3.2 OBJETIVOS.....</b>	<b>96</b>
<b>3.3 MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>97</b>

3.3.1 Especie estudiada.....	97
3.3.2 Metodología.....	98
3.3.2.1 Fenología de la germinación de las semillas y de la emergencia de plántulas .	98
3.3.2.2 Bioensayos de fitotoxicidad <i>in vitro</i> .....	102
3.3.2.2.1 Productos estudiados .....	102
3.3.2.2.2 Realización de los bioensayos .....	103
3.3.3 Análisis estadístico y representación gráfica .....	109
3.3.3.1 Elaboración de datos .....	109
3.3.3.2 Análisis y representaciones .....	111
<b>3.4 RESULTADOS.....</b>	<b>113</b>
3.4.1 Fenología de la germinación de las semillas .....	113
3.4.2 Fenología de la emergencia de plántulas .....	116
3.4.3 Bioensayos de fitotoxicidad <i>in vitro</i> .....	117
3.4.3.1 Efecto sobre la germinación de las semillas .....	117
3.4.3.2 Efecto sobre el crecimiento inicial.....	132
<b>3.5 DISCUSIÓN.....</b>	<b>145</b>
<b>3.6 CONCLUSIONES.....</b>	<b>156</b>
<b>4 CONTROL <i>IN SITU</i> DE LA GERMINACIÓN Y DEL CRECIMIENTO INICIAL DE <i>Parietaria judaica</i> L.....</b>	<b>161</b>
<b>4.1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>161</b>
<b>4.2 OBJETIVOS.....</b>	<b>164</b>
<b>4.3 MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>165</b>
4.3.1 Especies estudiadas.....	165
4.3.2 Ensayos en condiciones ambientales naturales.....	167
4.3.3 Ensayos de germinación y emergencia <i>in situ</i> .....	174
4.3.4 Análisis estadístico y representación gráfica .....	181
4.3.4.1 Elaboración de datos .....	181
4.3.4.2 Análisis y representaciones .....	182
<b>4.4 RESULTADOS.....</b>	<b>184</b>
4.4.1 Germinación en condiciones ambientales naturales .....	184
4.4.2 Germinación y emergencia <i>in situ</i> .....	188
<b>4.5 DISCUSIÓN.....</b>	<b>193</b>
<b>4.6 CONCLUSIONES.....</b>	<b>197</b>

<b>5 CONTROL DE LA GERMINACIÓN Y DEL CRECIMIENTO INICIAL DE <i>Epilobium hirsutum</i> L., <i>Rumex obtusifolius</i> L. Y <i>Spergula arvensis</i> L.</b>	<b>201</b>
<b>5.1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>201</b>
<b>5.2 OBJETIVOS</b>	<b>203</b>
<b>5.3 MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>204</b>
5.3.1 Especies estudiadas	204
5.3.2 Metodología	207
5.3.2.1 Fenología de la germinación de las semillas	207
5.3.2.2 Bioensayos de fitotoxicidad <i>in vitro</i>	209
5.3.2.3 Bioensayos de fitotoxicidad en invernadero	212
5.3.3 Análisis estadístico y representación gráfica	215
5.3.3.1 Elaboración de datos	215
5.3.3.2 Análisis y representaciones	217
<b>5.4 RESULTADOS</b>	<b>220</b>
5.4.1 Fenología de la germinación de las semillas	220
5.4.2 Bioensayos de fitotoxicidad <i>in vitro</i>	224
5.4.2.1 Efecto sobre la germinación de las semillas	224
5.4.2.2 Efecto sobre el crecimiento inicial	236
5.4.2.3 Viabilidad de las semillas	242
5.4.3 Bioensayos de fitotoxicidad en invernadero	248
<b>5.5 DISCUSIÓN</b>	<b>253</b>
<b>5.6 CONCLUSIONES</b>	<b>261</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>263</b>

## Índice de Figuras

- Figura 2.1** Aplicación del tratamiento fitosanitario general en la zona exterior de la muralla, en jornada nocturna, con carretilla y lanceta (a y c) y con mochila de batería (b), desde abajo (abril de 2014)..... 49
- Figura 2.2** Temperatura máxima media (T máx), temperatura mínima media (T mín) (°C) y precipitación (P) ( $l\ m^{-2}$ ) mensuales registradas a lo largo de los meses de estudio en la muralla (junio 2012-octubre 2014). Datos registrados en la estación meteorológica Campus Lugo (Lugo) (Meteogalicia, 2015). ..... 51
- Figura 2.3** Realización de los ensayos particulares: perspectiva de los tratamientos físicos, empleando plástico translúcido (solarización I) y plástico negro (solarización II) (a) y aplicación del producto fitocida, con mochila de batería, en uno de los lienzos seleccionados para tratamiento químico (b). ..... 53
- Figura 2.4** Brazo telescópico con cesta elevadora (a, b y c) empleados en los trabajos de limpieza de la vegetación en la zona exterior de la muralla; estructura de anclaje (d), material auxiliar (e) y realización de trabajos verticales en su paramento interior (f) (diciembre 2014). ..... 55
- Figura 2.5** Cobertura media (%) de la vegetación y error estándar para la cobertura de *Parietaria*, en el balcón (a), parte alta del lienzo (b), parte media del lienzo (c) y banqueta (d), en los años 2012, 2013 y 2014, en el paramento exterior de la muralla. (Colores más suaves dentro de la misma gama indican afectación de la vegetación (A)). ..... 61
- Figura 2.6** Cobertura media (%) de la vegetación y error estándar para la cobertura de *Parietaria*, en el balcón (a), parte alta del lienzo (b), parte media del lienzo (c) y banqueta (d), en los años 2012, 2013 y 2014, en el paramento exterior de la muralla con orientación norte. (Colores más suaves dentro de la misma gama indican afectación de la vegetación (A)). ..... 65
- Figura 2.7** Cobertura media (%) de la vegetación y error estándar para la cobertura de *Parietaria*, en el balcón (a), parte alta del lienzo (b), parte media del lienzo (c) y banqueta (d), en los años 2012, 2013 y 2014, en el paramento exterior de la muralla con orientación sur. (Colores más suaves dentro de la misma gama indican afectación de la vegetación (A)). ..... 67
- Figura 2.8** Evolución de la cobertura media (%) de la vegetación y error estándar para la cobertura de *Parietaria*, en el balcón (a), parte alta del lienzo (b), parte media del lienzo (c) y banqueta (d), entre el otoño de 2012 y el otoño de 2013, en el paramento exterior de la muralla. (Colores más suaves dentro de la misma gama indican afectación de la vegetación (A)). ..... 70
- Figura 2.9** Evolución de la cobertura media (%) de la vegetación y error estándar para la cobertura de *Parietaria*, en el balcón (a), parte alta del lienzo (b), parte media del lienzo (c) y banqueta (d), entre la primavera de 2013 y la primavera de 2014, en el paramento exterior de la muralla. (Colores más suaves dentro de la misma gama indican afectación de la vegetación (A)). ..... 71

<b>Figura 2.10</b> Cobertura media (%) de la vegetación y error estándar para la cobertura de <i>Parietaria</i> , en el balcón (a), parte alta del lienzo (b), parte media del lienzo (c) y banqueta (d), en los años 2012, 2013 y 2014, en el paramento interior de la muralla. Otras: Brasicáceas, Compuestas y Gramíneas. (Colores más suaves dentro de la misma gama indican afectación de la vegetación (A)).	73
<b>Figura 2.11</b> Cobertura media (%) de la vegetación y error estándar para la cobertura de <i>Parietaria</i> , en el lienzo de los ensayos particulares: tratamientos físicos (solarización I y solarización II) (a y b) y tratamientos químicos (Ajax-Finale y Kid) (c y d), para los meses de agosto (antes de la aplicación) y octubre-noviembre (tras la aplicación) en el año 2012, y marzo en el año 2013, en el paramento exterior de la muralla. (Colores más suaves dentro de la misma gama indican afectación de la vegetación, V: verde, A: afectada, S: seca).	77
<b>Figura 2.12</b> Cobertura media (%) de la vegetación y error estándar para la cobertura de <i>Parietaria</i> , en el balcón (a), parte alta del lienzo (b), parte media del lienzo (c) y banqueta (d), para los meses de mayo, julio y septiembre (tras la aplicación del tratamiento químico Ajax-Finale) en el año 2013, en el paramento exterior de la muralla.	79
<b>Figura 2.13</b> Cobertura media (%) de la vegetación y error estándar para la cobertura de <i>Parietaria</i> , en el balcón (a), parte alta del lienzo (b), parte media del lienzo (c) y banqueta (d) (tras la aplicación del tratamiento químico Kid) en los años 2013 y 2014, en el paramento exterior de la muralla. Otras: Brasicáceas. (Colores más suaves dentro de la misma gama indican afectación de la vegetación, V: verde, A: afectada, S: seca).	80
<b>Figura 3.1</b> Plantas de <i>Parietaria judaica</i> en la muralla de Lugo (a y b), variabilidad de la morfología de sus flores (hermafroditas, masculinas y femeninas) con perianto acrescente (c) y frutos monospermos (aquenios) (d).	98
<b>Figura 3.2</b> Temperatura máxima y mínima diaria (°C) registradas durante los ensayos de fenología de la emergencia de plántulas de <i>Parietaria judaica</i> (tres meses) en condiciones naturales, procedentes de semillas sin y con perianto, desde su producción, para los meses de octubre (a), noviembre (b) (lote de 2015) y diciembre (c) (lote de 2014). Datos registrados en la estación meteorológica Campus Lugo (Lugo) (Meteogalicia, 2016).	101
<b>Figura 3.3</b> Germinación media acumulada (%) a lo largo del tiempo (cuatro semanas), de semillas de <i>Parietaria judaica</i> (sin perianto, SP, y con perianto, CP, en condiciones de fotoperiodo, F, y oscuridad, O) recién producidas (a) y con un mes de almacenamiento (b) (lote de 2015), seis meses (c) y un año (d) (lote de 2014), año y medio (e) y dos años (f) (lote de 2013).	114
<b>Figura 3.4</b> Variabilidad de la germinación (%) a lo largo de dos años de almacenamiento, de semillas de <i>Parietaria judaica</i> (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo) pertenecientes a dos lotes de producción (lote de 2013 -dos años de almacenamiento-, lote de 2014 -un año de almacenamiento-).	115

**Figura 3.5** Emergencia media acumulada (%) a lo largo del tiempo (tres meses) de las plántulas de *Parietaria judaica* en condiciones naturales (semillas sin perianto, SP, y con perianto, CP), recién producidas (1 mes) y transcurridos dos meses (lote de 2015), y tres meses (lote de 2014). ..... 116

**Figura 3.6** Germinación media acumulada (%) para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas) de semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo), en el control (0%) y con los extractos acuosos en la concentración inicial sin dilución (100%). EAAd: extracto acuoso de *Acacia dealbata* (a), EAcl: extracto acuoso de *Cistus ladanifer* (b), EAeg: extracto acuoso de *Eucalyptus globulus* (c). ..... 118

**Figura 3.7** Germinación media acumulada (%) para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas) de semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo), en el control ( $0 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) y con los aceites esenciales en concentraciones decrecientes (2, 1, 0.5 y  $0.25 \mu\text{l ml}^{-1}$ ). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (c), AETv-L<sub>2</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>2</sub> (d), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (e). ..... 120

**Figura 3.8** Germinación media acumulada (%) para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas) de semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo), en el control ( $0 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) y con los aceites esenciales en concentraciones crecientes (2, 10, 20 y  $200 \mu\text{l ml}^{-1}$ ). AEAd: aceite esencial de *Acacia dealbata* (a), AEcl: aceite esencial de *Cistus ladanifer* (b), AEEg: aceite esencial de *Eucalyptus globulus* (c), AELa: aceite esencial de *Lavandula angustifolia* (d), AELh: aceite esencial de *Lavandula hybrida* (e), AERo-A: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* alcanfor (f), AERo-C: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* cineol (g), AESl: aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* (h), AETv: aceite esencial de *Thymus vulgaris* (i). 122

**Figura 3.8** (Cont.) Germinación media acumulada (%) para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas) de semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo), en el control ( $0 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) y con los aceites esenciales en concentraciones crecientes (2, 10, 20 y  $200 \mu\text{l ml}^{-1}$ ). AEAd: aceite esencial de *Acacia dealbata* (a), AEcl: aceite esencial de *Cistus ladanifer* (b), AEEg: aceite esencial de *Eucalyptus globulus* (c), AELa: aceite esencial de *Lavandula angustifolia* (d), AELh: aceite esencial de *Lavandula hybrida* (e), AERo-A: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* alcanfor (f), AERo-C: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* cineol (g), AESl: aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* (h), AETv: aceite esencial de *Thymus vulgaris* (i). 123

**Figura 3.9** Germinación media acumulada (%) para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas) de semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo), en el control (0%) y con los hidrolatos en concentraciones decrecientes (100, 50, 25 y 12.5%). HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* (a), HRo: hidrolato de *Rosmarinus officinalis* (b), HTv-L: hidrolato de *Thymus vulgaris* linalol (c), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (d), HTz: hidrolato de *Thymus zygis* (e). ..... 126

**Figura 3.10** Germinación media acumulada (%) para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas) de semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo), en el control (0%) y con los productos con propiedades fitocidas (lejía (a) y vinagre (b)) en concentraciones decrecientes (100, 50, 25 y 12.5%). ..... 128

**Figura 3.11** Germinación media acumulada (%) para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas) de semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo), en el control (0%) y con fitocidas de síntesis química (Ayax-Finale –A-F- (a), Kid –KID- (b) y Roundup Ultra Plus - RUP- (c)) en concentraciones decrecientes (100, 50, 25 y 12.5%). ..... 130

**Figura 3.12** Efecto fitotóxico inhibitor sobre la germinación (%) de las semillas de *Parietaria judaica* de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* (AEOv), *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (AETv-L<sub>1</sub>) y *Thymus zygis* (AETz) (a) y los correspondientes hidrolatos de *Origanum vulgare* (HOv), *Thymus vulgaris* timol (HTv-T) y *Thymus zygis* (HTz) (b), en concentraciones crecientes, evaluado transcurridas cuatro semanas. Los datos fueron analizados mediante una curva sigmoideal dosis-respuesta (pendiente variable), representando el error estándar de la media. R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación, IC<sub>50</sub>: Concentración Inhibitoria Máxima Media... 132

**Figura 3.13** Distribución de los tipos de plántulas (%) de *Parietaria judaica* a los 5 y 15 días para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control (0 µl ml<sup>-1</sup>) y con los aceites esenciales en concentraciones crecientes (0.25, 0.5, 1 y 2 µl ml<sup>-1</sup>). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (c), AETv-L<sub>2</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>2</sub> (d), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (e). ..... 133

**Figura 3.13 (Cont.)** Distribución de los tipos de plántulas (%) de *Parietaria judaica* a los 5 y 15 días para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control (0 µl ml<sup>-1</sup>) y con los aceites esenciales en concentraciones crecientes (0.25, 0.5, 1 y 2 µl ml<sup>-1</sup>). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (c), AETv-L<sub>2</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>2</sub> (d), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (e). ..... 134

**Figura 3.14** Distribución de los tipos de plántulas (%) de *Parietaria judaica* a los 5 y 15 días para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control ( $0 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) y con los aceites esenciales en concentraciones crecientes (2, 10, 20 y  $200 \mu\text{l ml}^{-1}$ ). AEAd: aceite esencial de *Acacia dealbata* (a), AECl: aceite esencial de *Cistus ladanifer* (b), AEEg: aceite esencial de *Eucalyptus globulus* (c), AELa: aceite esencial de *Lavandula angustifolia* (d), AELh: aceite esencial de *Lavandula hybrida* (e), AERo-A: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* alcanfor (f), AERo-C: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* cineol (g), AESl: aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* (h), AETv: aceite esencial de *Thymus vulgaris* (i)..... 136

**Figura 3.14** (Cont.) Distribución de los tipos de plántulas (%) de *Parietaria judaica* a los 5 y 15 días para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control ( $0 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) y con los aceites esenciales en concentraciones crecientes (2, 10, 20 y  $200 \mu\text{l ml}^{-1}$ ). AEAd: aceite esencial de *Acacia dealbata* (a), AECl: aceite esencial de *Cistus ladanifer* (b), AEEg: aceite esencial de *Eucalyptus globulus* (c), AELa: aceite esencial de *Lavandula angustifolia* (d), AELh: aceite esencial de *Lavandula hybrida* (e), AERo-A: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* alcanfor (f), AERo-C: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* cineol (g), AESl: aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* (h), AETv: aceite esencial de *Thymus vulgaris* (i)..... 137

**Figura 3.14** (Cont.) Distribución de los tipos de plántulas (%) de *Parietaria judaica* a los 5 y 15 días para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control ( $0 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) y con los aceites esenciales en concentraciones crecientes (2, 10, 20 y  $200 \mu\text{l ml}^{-1}$ ). AEAd: aceite esencial de *Acacia dealbata* (a), AECl: aceite esencial de *Cistus ladanifer* (b), AEEg: aceite esencial de *Eucalyptus globulus* (c), AELa: aceite esencial de *Lavandula angustifolia* (d), AELh: aceite esencial de *Lavandula hybrida* (e), AERo-A: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* alcanfor (f), AERo-C: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* cineol (g), AESl: aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* (h), AETv: aceite esencial de *Thymus vulgaris* (i)..... 138

**Figura 3.15** Distribución de los tipos de plántulas (%) de *Parietaria judaica* a los 5 y 15 días para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control (0%) y con los hidrolatos en concentraciones crecientes (12.5, 25, 50 y 100%). HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* (a), HRo: hidrolato de *Rosmarinus officinalis* (b), HTv-L: hidrolato de *Thymus vulgaris* linalol (c), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (d), HTz: hidrolato de *Thymus zygis* (e)..... 140

**Figura 3.15** (Cont.) Distribución de los tipos de plántulas (%) de *Parietaria judaica* a los 5 y 15 días para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control (0%) y con los hidrolatos en concentraciones crecientes (12.5, 25, 50 y 100%). HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* (a), HRo: hidrolato de *Rosmarinus officinalis* (b), HTv-L: hidrolato de *Thymus vulgaris* linalol (c), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (d), HTz: hidrolato de *Thymus zygis* (e).... 141

<b>Figura 3.16</b> Distribución de los tipos de plántulas (%) de <i>Parietaria judaica</i> a los 5 y 15 días para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control (0%) y con productos con propiedades fitocidas (lejía (a) y vinagre (b)) en concentraciones crecientes (12.5, 25, 50 y 100%).	143
<b>Figura 3.17</b> Distribución de los tipos de plántulas (%) de <i>Parietaria judaica</i> a los 5 y 15 días para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control (0%) y con fitocidas de síntesis química (Ajax-Finale –A-F- (a), Kid -KID- (b) y Roundup Ultra Plus -RUP- (c)) en concentraciones crecientes (12.5, 25, 50 y 100%).	144
<b>Figura 4.1</b> Plantas de <i>Parietaria judaica</i> (a y b) y <i>Cymbalaria muralis</i> (c y d) en el paramento exterior de la muralla de Lugo.	166
<b>Figura 4.2</b> Temperatura máxima (T máx), temperatura mínima (T mín) (°C) y precipitación (P) (l m <sup>-2</sup> ) diaria registradas durante los ensayos de germinación de las semillas de <i>Parietaria judaica</i> (con perianto, en condiciones naturales) durante la Fase I-Producto (uno o dos meses) y la Fase II-Producto+Agua (un mes más), con los aceites esenciales o fitocidas de síntesis, en intervalos temporales desde su producción (otoño) hasta la primavera siguiente, para los meses de de diciembre (a), enero (b), febrero (c), marzo (d) y abril (e) (2015-2016). Datos registrados en la estación meteorológica Campus Lugo (Lugo) (Meteogalicia, 2016).	169
<b>Figura 4.2</b> (Cont.) Temperatura máxima (T máx), temperatura mínima (T mín) (°C) y precipitación (P) (l m <sup>-2</sup> ) diaria registradas durante los ensayos de germinación de las semillas de <i>Parietaria judaica</i> (con perianto, en condiciones naturales) durante la Fase I-Producto (uno o dos meses) y la Fase II-Producto+Agua (un mes más), con los aceites esenciales o fitocidas de síntesis, en intervalos temporales desde su producción (otoño) hasta la primavera siguiente, para los meses de de diciembre (a), enero (b), febrero (c), marzo (d) y abril (e) (2015-2016). Datos registrados en la estación meteorológica Campus Lugo (Lugo) (Meteogalicia, 2016).	170
<b>Figura 4.3</b> Temperatura máxima (T máx) y temperatura mínima (T mín) diaria (°C) registradas durante los ensayos de germinación de las semillas de <i>Parietaria judaica</i> (con perianto, en condiciones naturales) (dos meses), con los aceites esenciales e hidrolato, en intervalos temporales desde su producción, para los meses de diciembre (a), enero (b) y febrero (c) (2015-2016). Datos registrados en la estación meteorológica Campus Lugo (Lugo) (Meteogalicia, 2016).	173
<b>Figura 4.4</b> Temperatura máxima (T máx), temperatura mínima (T mín) (°C) y precipitación (P) (l m <sup>-2</sup> ) diaria registradas durante los ensayos de germinación <i>in situ</i> de las semillas de <i>Parietaria judaica</i> (con perianto, en condiciones naturales) durante la Fase I-Producto (uno o dos meses) y la Fase II-Producto+Agua (un mes más), con los aceites esenciales e hidrolato, en intervalos temporales desde su producción, para los meses de diciembre (a), enero (b) y febrero (c) (2015-2016). Datos registrados en la estación meteorológica Campus Lugo (Lugo) (Meteogalicia, 2016).	175

<b>Figura 4.5</b> Temperatura máxima (T máx), temperatura mínima (T mín) (°C) y precipitación (P) (l m <sup>-2</sup> ) diaria registradas durante los meses previos y posteriores a la aplicación de los tratamientos con aceites esenciales en la muralla, de seguimiento de su eficacia (septiembre 2017-marzo 2018). Datos registrados en la estación meteorológica Campus Lugo (Lugo) (Meteogalicia, 2018).	177
<b>Figura 4.6</b> Muestreos periódicos en la muralla para 0 (a), 15 (b), 30 (c), 45 (d) y 60 (e) días en una parcela (3) tratada (primera aplicación) con aceite de <i>Origanum vulgare</i> en el bloque 1 (lienzo 04-05).	179
<b>Figura 4.7</b> Muestreos periódicos en la muralla para 0 (a), 15 (b), 30 (c), 45 (d) y 60 (e) días en una parcela (6) tratada (segunda aplicación) con aceite de <i>Thymus vulgaris</i> en el bloque 5 (lienzo 04-05).	180
<b>Figura 4.8</b> Germinación (%) en la Fase I-Producto (F I, uno o dos meses) y en la Fase II-Producto+Agua (F II, un mes más) de las semillas de <i>Parietaria judaica</i> (con perianto, en condiciones naturales), en el control (Co) y con los diferentes productos (P) (aceites esenciales o fitocidas de síntesis química), desde su producción (otoño) hasta la primavera siguiente (3, 4, 5, 6 y 7 meses). AERo: aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> (a), AETv-L <sub>1</sub> : aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> linalol <sub>1</sub> (b), A-F: Ajax-Finale (c), KID: Kid (d), RUP: Roundup Ultra Plus (e).	185
<b>Figura 4.8</b> (Cont.) Germinación (%) en la Fase I-Producto (F I, uno o dos meses) y en la Fase II-Producto+Agua (F II, un mes más) de las semillas de <i>Parietaria judaica</i> (con perianto, en condiciones naturales), en el control (Co) y con los diferentes productos (P) (aceites esenciales o fitocidas de síntesis química), desde su producción (otoño) hasta la primavera siguiente (3, 4, 5, 6 y 7 meses). AERo: aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> (a), AETv-L <sub>1</sub> : aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> linalol <sub>1</sub> (b), A-F: Ajax-Finale (c), KID: Kid (d), RUP: Roundup Ultra Plus (e).	186
<b>Figura 4.9</b> Germinación (%) evaluada transcurridos uno y dos meses, de semillas de <i>Parietaria judaica</i> (con perianto, en condiciones naturales), en el control (Co) y con los aceites esenciales e hidrolato (P), en intervalos temporales desde su producción en otoño (3, 4, y 5 meses). AEOv: aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> (a), AERo: aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> (b), AETv-L <sub>1</sub> : aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> linalol <sub>1</sub> (c), AETz: aceite esencial de <i>Thymus zygis</i> (d), HTv-T: hidrolato de <i>Thymus vulgaris</i> timol (e).	187
<b>Figura 4.10</b> Germinación (%) en la Fase I-Producto (F I, uno o dos meses) y en la Fase II-Producto+Agua (F II, un mes más) de las semillas de <i>Parietaria judaica</i> (con perianto, en condiciones naturales), en el control y con los aceites esenciales e hidrolato (P), en intervalos temporales desde su producción en otoño (3, 4, y 5 meses). AEOv: aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> (a), AERo: aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> (b), AETv-L <sub>1</sub> : aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> linalol <sub>1</sub> (c), AETz: aceite esencial de <i>Thymus zygis</i> (d), HTv-T: hidrolato de <i>Thymus vulgaris</i> timol (e).	189

<b>Figura 4.10</b> (Cont.) Germinación (%) en la Fase I-Producto (F I, uno o dos meses) y en la Fase II-Producto+Agua (F II, un mes más) de las semillas de <i>Parietaria judaica</i> (con perianto, en condiciones naturales), en el control y con los aceites esenciales e hidrolato (P), en intervalos temporales desde su producción en otoño (3, 4, y 5 meses). AEOv: aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> (a), AERo: aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> (b), AETv-L <sub>1</sub> : aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> linalol <sub>1</sub> (c), AETz: aceite esencial de <i>Thymus zygis</i> (d), HTv-T: hidrolato de <i>Thymus vulgaris</i> timol (e). .....	190
<b>Figura 4.11</b> Densidad media de plántulas (n°/muestra) de <i>Parietaria judaica</i> y <i>Cymbalaria muralis</i> durante el periodo de seguimiento (60 días), en el control y con los aceites esenciales de <i>Origanum vulgare</i> (AEOv), <i>Thymus vulgaris</i> linalol <sub>1</sub> (AETv-L <sub>1</sub> ) y <i>Thymus zygis</i> (AETz), para la primera aplicación (zona alta (a) y media (b) de la muralla) y la segunda aplicación (zona alta (c) y media (d) del monumento). .....	192
<b>Figura 5.1</b> Planta de <i>Epilobium hirsutum</i> con flores, frutos y semillas en el momento de su dispersión (a) y semillas separadas (b). .....	204
<b>Figura 5.2</b> Planta de <i>Rumex obtusifolius</i> con flores (a), frutos (b), fruto maduro con valvas membranosas (c) y frutos monospermos (aquenios trígonos) separados, con presencia de fruto vacío (inferior izquierda) (d). .....	206
<b>Figura 5.3</b> Planta de <i>Spergula arvensis</i> con flores y frutos (a) y semillas separadas (b). .....	207
<b>Figura 5.4</b> Bioensayos de fitotoxicidad en invernadero con los tratamientos de aceites esenciales de <i>Origanum vulgare</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Thymus vulgaris</i> linalol <sub>1</sub> y <i>Thymus zygis</i> , e hidrolatos de <i>Origanum vulgare</i> , <i>Thymus vulgaris</i> timol y <i>Thymus zygis</i> , para <i>Epilobium hirsutum</i> (a y b), <i>Rumex obtusifolius</i> (c y d) y <i>Spergula arvensis</i> (e y f). Para cada especie se establecieron cuatro bloques constituidos por ocho tratamientos por alveolo (siete productos y un control), ordenados según el resultado de un sorteo aleatorio, donde se aprecian las plántulas de cada especie cuando se ha producido su emergencia. ....	213
<b>Figura 5.5</b> Germinación media acumulada (%) de <i>Epilobium hirsutum</i> (a y b), <i>Rumex obtusifolius</i> (c y d) y <i>Spergula arvensis</i> (e y f) a lo largo del tiempo (cuatro semanas); semillas de 2016 en el primer año tras su formación (recién producidas, 3, 6 y 9 meses de almacenamiento), en condiciones de fotoperiodo (F): favorables para su germinación (16-8 h, 22-16°C) y menos favorables similares a las de otoño-primavera (12 h, 15-10°C), y oscuridad (O).....	222
<b>Figura 5.6</b> Germinación media acumulada (%) de semillas de 2016 de <i>Epilobium hirsutum</i> para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control (0) y con concentraciones decrecientes de los aceites esenciales (2, 1, 0.5 y 0.25 $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) e hidrolatos (100, 50, 25 y 12.5%). AEOv: aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> (a), AERo: aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> (b), AETv-L <sub>1</sub> : aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> linalol <sub>1</sub> (c), AETz: aceite esencial de <i>Thymus zygis</i> (d), HOv: hidrolato de <i>Origanum vulgare</i> (e), HTv-T: hidrolato de <i>Thymus vulgaris</i> timol (f), HTz: hidrolato de <i>Thymus zygis</i> (g).....	226

**Figura 5.7** Germinación media acumulada (%) de semillas de 2016 de *Rumex obtusifolius* para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control (0) y con concentraciones decrecientes de los aceites esenciales (2, 1, 0.5 y 0.25  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) e hidrolatos (100, 50, 25 y 12.5%). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (c), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (d), HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* (e), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (f), HTz: hidrolato de *Thymus zygis* (g). ..... 229

**Figura 5.8** Germinación media acumulada (%) de semillas de 2016 de *Spergula arvensis* para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control (0) y con concentraciones decrecientes de los aceites esenciales (2, 1, 0.5 y 0.25  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) e hidrolatos (100, 50, 25 y 12.5%). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (c), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (d), HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* (e), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (f), HTz: hidrolato de *Thymus zygis* (g). ..... 232

**Figura 5.9** Efecto fitotóxico inhibitor sobre la germinación (%) de las semillas de *Epilobium hirsutum* (a y b), *Rumex obtusifolius* (c y d) y *Spergula arvensis* (e y f), de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* (AEOv), *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (AETv-L<sub>1</sub>) y *Thymus zygis* (AETz) y los correspondientes hidrolatos de *Origanum vulgare* (HOv), *Thymus vulgaris* timol (HTv-T) y *Thymus zygis* (HTz), en concentraciones crecientes, evaluado transcurridas cuatro semanas. Los datos fueron analizados mediante una curva sigmoideal dosis-respuesta (pendiente variable), representando el error estándar de la media. R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación, IC<sub>50</sub>: Concentración Inhibitoria Máxima Media. .... 235

**Figura 5.10** Distribución de los tipos de plántulas (%) de *Epilobium hirsutum* a los 5 y 15 días para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas), en el control (0) y con concentraciones crecientes de los aceites esenciales (0.25, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) e hidrolatos (12.5, 25, 50 y 100%). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (c), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (d), HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* (e), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (f), HTz: hidrolato de *Thymus zygis* (g). ..... 237

**Figura 5.11** Distribución de los tipos de plántulas (%) de *Rumex obtusifolius* a los 5 y 15 días para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas), en el control (0) y con concentraciones crecientes de los aceites esenciales (0.25, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) e hidrolatos (12.5, 25, 50 y 100%). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (c), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (d), HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* (e), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (f), HTz: hidrolato de *Thymus zygis* (g). ..... 239

**Figura 5.12** Distribución de los tipos de plántulas (%) de *Spergula arvensis* a los 5 y 15 días para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas), en el control (0) y con concentraciones crecientes de los aceites esenciales (0.25, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) e hidrolatos (12.5, 25, 50 y 100%). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (c), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (d), HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* (e), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (f), HTz: hidrolato de *Thymus zygis* (g). .....241

**Figura 5.13** Estado final de las semillas (%), viables y no viables, de *Epilobium hirsutum* transcurrida la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, cuatro semanas más), en el control (0) y con concentraciones crecientes de los aceites esenciales (0.25, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) e hidrolatos (12.5, 25, 50 y 100%). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (c), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (d), HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* (e), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (f), HTz: hidrolato de *Thymus zygis* (g). .....243

**Figura 5.14** Estado final de las semillas (%), viables, no viables y vacías, de *Rumex obtusifolius* transcurrida la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, cuatro semanas más), en el control (0) y con concentraciones crecientes de los aceites esenciales (0.25, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) e hidrolatos (12.5, 25, 50 y 100%). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (c), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (d), HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* (e), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (f), HTz: hidrolato de *Thymus zygis* (g). .....245

**Figura 5.15** Estado final de las semillas (%), viables y no viables, de *Spergula arvensis* transcurrida la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, cuatro semanas más), en el control (0) y con concentraciones crecientes de los aceites esenciales (0.25, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) e hidrolatos (12.5, 25, 50 y 100%). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (c), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (d), HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* (e), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (f), HTz: hidrolato de *Thymus zygis* (g). .....247

**Figura 5.16** Emergencia media acumulada (%) de plántulas de *Epilobium hirsutum* en invernadero, para un lavado a medio plazo (35 días) (a y b) o prematuro (7 días) (c y d) y las cuatro semanas posteriores, en el control (Co) y con el tratamiento de los aceites esenciales e hidrolatos. AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare*, AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub>, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis*, HOv: hidrolato de *Origanum vulgare*, HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis*. .....249

**Figura 5.17** Emergencia media acumulada (%) de plántulas de *Rumex obtusifolius* en invernadero, procedentes de siembra en superficie, para un lavado a medio plazo (35 días) (a y b) o prematuro (7 días) (c y d) y las cuatro semanas posteriores, o de semillas enterradas inicialmente, para un lavado a medio plazo (cinco semanas) (e y f) y las cuatro semanas posteriores; en el control (Co) y con el tratamiento de los aceites esenciales e hidrolatos. AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare*, AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub>, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis*, HOv: hidrolato de *Origanum vulgare*, HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis*. ..... 250

**Figura 5.18** Emergencia media acumulada (%) de plántulas de *Spergula arvensis* en invernadero, para un lavado a medio plazo (35 días) (a y b) o prematuro (7 días) (c y d) y las cuatro semanas posteriores, en el control (Co) y con el tratamiento de los aceites esenciales e hidrolatos. AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare*, AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub>, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis*, HOv: hidrolato de *Origanum vulgare*, HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis*. ..... 251



## Índice de Tablas

<b>Tabla 2.1</b> Cobertura media de la vegetación (%) en el balcón, parte alta del lienzo, parte media del lienzo y banquetta, evaluada en la campaña de aplicación del tratamiento fitosanitario correspondiente a invierno/primavera en dos anualidades consecutivas (2016/2017), previa al tratamiento (ATf) y transcurrido el primer mes desde su aplicación (PTf). C: cobertura (verde), CS: cobertura seca, CA: cobertura afectada, CV: cobertura verde, CVp: cobertura verde nuevas plántulas. ....	63
<b>Tabla 3.1</b> Composición de los 14 aceites esenciales determinada por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC/MS) o con detector de ionización de llama (GC/FID), o bien resonancia magnética nuclear de protón (NMR) de los aceites en cloroformo deuterado. AEAd: aceite esencial de <i>Acacia dealbata</i> Link, AECl: aceite esencial de <i>Cistus ladanifer</i> L., AEEg: aceite esencial de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill., AELa: aceite esencial de <i>Lavandula angustifolia</i> Mill., AELh: aceite esencial de <i>Lavandula hybrida</i> É. Rev. ex Briq., AEOv: aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> L., AERo: aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L., AERo-A: aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. alcanfor, AERo-C: aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. cineol, AESl: aceite esencial de <i>Salvia lavandulifolia</i> Vahl, AETv: aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> L., AETv-L <sub>1</sub> : aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> L. linalol <sub>1</sub> , AETv-L <sub>2</sub> : aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> L. linalol <sub>2</sub> , AETz: aceite esencial de <i>Thymus zygis</i> Loefl. ex L. ....	104
<b>Tabla 3.2</b> Principales compuestos de los aceites esenciales presentes en los 5 hidrolatos estudiados. HOv: hidrolato de <i>Origanum vulgare</i> L., HRo: hidrolato de <i>Rosmarinus officinalis</i> L., HTv-L: hidrolato de <i>Thymus vulgaris</i> L. linalol, HTv-T: hidrolato de <i>Thymus vulgaris</i> L. timol, HTz: hidrolato de <i>Thymus zygis</i> Loefl. ex L. ....	106
<b>Tabla 3.3</b> Clasificación tipológica de plántulas de <i>Parietaria judaica</i> según el grado de daño fitotóxico observado. ....	108
<b>Tabla 3.4</b> Tiempo medio (días) de germinación de las semillas de <i>Parietaria judaica</i> (sin/con perianto, en condiciones de fotoperiodo/oscuridad) recién producidas (0 meses) y con un mes de almacenamiento (1 mes) (lote de 2015), seis meses (6 meses) y un año (12 meses) (lote de 2014), año y medio (18 meses) y dos años (24 meses) (lote de 2013). F-SP: fotoperiodo semillas sin perianto, F-CP: fotoperiodo semillas con perianto, O-SP: oscuridad semillas sin perianto, O-CP: oscuridad semillas con perianto. ....	115
<b>Tabla 3.5</b> Tiempo medio (días) de emergencia de plántulas de <i>Parietaria judaica</i> (en condiciones naturales), procedentes de semillas (sin perianto, SP, y con perianto, CP) recién producidas (1 mes) y transcurridos dos meses (lote de 2015), y tres meses (lote de 2014)...	117

**Tabla 3.6** Tiempo medio (días) de germinación para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) de las semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo), en el control (0%) y con los extractos acuosos ensayados en la concentración (C) inicial sin dilución (100%). EAA: extracto acuoso de *Acacia dealbata*, EACI: extracto acuoso de *Cistus ladanifer*, EAEg: extracto acuoso de *Eucalyptus globulus*..... 118

**Tabla 3.7** Tiempo medio (días) de germinación para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) de las semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo), en el control (0  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) y con los aceites esenciales ensayados en concentraciones (C) decrecientes (2, 1, 0.5 y 0.25  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare*, AERO: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub>, AETv-L<sub>2</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>2</sub>, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis*. ..... 121

**Tabla 3.8** Tiempo medio (días) de germinación para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) de las semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo), en el control (0  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) y con los aceites esenciales ensayados en concentraciones (C) crecientes (2, 10, 20 y 200  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ). AEAd: aceite esencial de *Acacia dealbata*, AECl: aceite esencial de *Cistus ladanifer*, AEEg: aceite esencial de *Eucalyptus globulus*, AELa: aceite esencial de *Lavandula angustifolia*, AELh: aceite esencial de *Lavandula hybrida*, AERO-A: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* alcanfor, AERO-C: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* cineol, AESl: aceite esencial de *Salvia lavandulifolia*, AETv: aceite esencial de *Thymus vulgaris*. ..... 124

**Tabla 3.9** Tiempo medio (días) de germinación para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) de las semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo), en el control (0%) y con los hidrolatos ensayados en concentraciones (C) decrecientes (100, 50, 25 y 12.5%). HOv: hidrolato de *Origanum vulgare*, HRO: hidrolato de *Rosmarinus officinalis*, HTv-L: hidrolato de *Thymus vulgaris* linalol, HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis*. ..... 127

**Tabla 3.10** Tiempo medio (días) de germinación para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) de las semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo), en el control (0%) y con los productos con propiedades fitocidas (lejía y vinagre) ensayados en concentraciones (C) decrecientes (100, 50, 25 y 12.5%). ..... 128

**Tabla 3.11** Tiempo medio (días) de germinación para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) de las semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo), en el control (0%) y con los fitocidas de síntesis química (Ajax-Finale -A-F-, Kid -KID- y Roundup Ultra Plus -RUP-) ensayados en concentraciones (C) decrecientes (100, 50, 25 y 12.5%). ..... 131

**Tabla 3.18** Síntesis cualitativa del efecto fitotóxico inhibidor de los aceites esenciales ensayados en concentraciones decrecientes (2, 1, 0.5 y 0.25  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) y crecientes (2, 10, 20 y 200  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) sobre la germinación (G) de semillas de *Parietaria judaica*, evaluada al final de la Fase I-Inhibición (FI-cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (FII-cuatro semanas) de modo independiente, y la proporción de plántulas viables (P) en ambas fases. Co: control, AEAd: aceite esencial de *Acacia dealbata* Link, AECl: aceite esencial de *Cistus ladanifer* L., AEEg: aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill., AELa: aceite esencial de *Lavandula angustifolia* Mill., AELh: aceite esencial de *Lavandula hybrida* É. Rev. ex Briq., AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* L., AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L., AERo-A: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* alcanfor L., AERo-C: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* cineol L., AESl: aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* Vahl, AETv: aceite esencial de *Thymus vulgaris* L., AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. linalol (1), AETv-L<sub>2</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. linalol (2), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* Loefl. ex L. .... 154

**Tabla 3.19** Síntesis cualitativa del efecto fitotóxico inhibidor de los hidrolatos ensayados en concentraciones decrecientes (100, 50, 25 y 12.5%) sobre la germinación (G) de semillas de *Parietaria judaica*, evaluada al final de la Fase I-Inhibición (FI-cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (FII-cuatro semanas) de modo independiente, y la proporción de plántulas viables (P) en ambas fases. Co: control, HOv: hidrolato de *Origanum vulgare*, HRo: hidrolato de *Rosmarinus officinalis*, HTv-L: hidrolato de *Thymus vulgaris* linalol, HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis*. .... 155

**Tabla 5.1** Composición de los 4 aceites esenciales determinada por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC/MS) o con detector de ionización de llama (GC/FID), o bien resonancia magnética nuclear de protón (NMR) de los aceites en cloroformo deuterado. AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* L., AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L., AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. linalol<sub>1</sub>, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* Loefl. ex L. .... 210

**Tabla 5.2** Principales compuestos de los aceites esenciales presentes en los 3 hidrolatos estudiados. HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* L., HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* L. timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis* Loefl. ex L. .... 211

**Tabla 5.3** Tiempo medio (días) de germinación de las semillas (2016) de *Epilobium hirsutum*, *Rumex obtusifolius* y *Spergula arvensis* en el primer año tras su formación (recién producidas, 3, 6 y 9 meses de almacenamiento); en condiciones de fotoperiodo, favorables para su germinación (16-8 h, 22-16°C) y menos favorables similares a las de otoño-primavera (12 h, 15-10°C), y oscuridad. F(15-10°C): fotoperiodo (12 h, 15-10°C), F(22-16°C): fotoperiodo (16-8 h, 22-16°C), O(15-10°C): oscuridad (12 h, 15-10°C), O(22-16°C): oscuridad (16-8 h, 22-16°C). .... 223

**Tabla 5.4** Tiempo medio (días) de germinación de las semillas de 2016 de *Epilobium hirsutum* para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas), en el control (0) y con concentraciones (C) decrecientes de los aceites esenciales (2, 1, 0.5 y 0.25  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) e hidrolatos (100, 50, 25 y 12.5%). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare*, AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub>, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis*, HOv: hidrolato de *Origanum vulgare*, HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis*..... 227

**Tabla 5.5** Tiempo medio (días) de germinación de las semillas de 2016 de *Rumex obtusifolius* para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas), en el control (0) y con concentraciones (C) decrecientes de los aceites esenciales (2, 1, 0.5 y 0.25  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) e hidrolatos (100, 50, 25 y 12.5%). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare*, AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub>, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis*, HOv: hidrolato de *Origanum vulgare*, HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis*. ..... 230

**Tabla 5.6** Tiempo medio (días) de germinación de las semillas de 2016 de *Spergula arvensis* para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas), en el control (0) y con concentraciones (C) decrecientes de los aceites esenciales (2, 1, 0.5 y 0.25  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) e hidrolatos (100, 50, 25 y 12.5%). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare*, AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub>, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis*, HOv: hidrolato de *Origanum vulgare*, HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis*. ..... 233

**Tabla 5.7** Tiempo medio (días) de emergencia de las plántulas de *Epilobium hirsutum*, *Rumex obtusifolius* y *Spergula arvensis* (cinco semanas previas al lavado), procedentes de semillas sembradas en invernadero en condiciones favorables para su germinación, en el control (Co) y con el tratamiento de los aceites esenciales e hidrolatos. AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare*, AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub>, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis*, HOv: hidrolato de *Origanum vulgare*, HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis*..... 252

**Tabla 5.8** Síntesis cualitativa del efecto fitotóxico inhibitor de los aceites esenciales e hidrolatos ensayados en concentraciones decrecientes (2, 1, 0.5 y 0.25  $\mu\text{l ml}^{-1}$  y 100, 50, 25 y 12.5%, respectivamente) sobre la germinación (G) de semillas de *Epilobium hirsutum*, evaluada al final de la Fase I-Inhibición (FI-cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (FII-cuatro semanas) de modo independiente, y la proporción de plántulas viables (P) en ambas fases. Co: control, AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare*, AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub>, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis*, HOv: hidrolato de *Origanum vulgare*, HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis*. ..... 258

**Tabla 5.9** Síntesis cualitativa del efecto fitotóxico inhibitor de los aceites esenciales e hidrolatos ensayados en concentraciones decrecientes (2, 1, 0.5 y 0.25  $\mu\text{l ml}^{-1}$  y 100, 50, 25 y 12.5%, respectivamente) sobre la germinación (G) de semillas de *Rumex obtusifolius*, evaluada al final de la Fase I-Inhibición (FI-cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (FII-cuatro semanas) de modo independiente, y la proporción de plántulas viables (P) en ambas fases. Co: control, AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare*, AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub>, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis*, HOv: hidrolato de *Origanum vulgare*, HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis*.....259

**Tabla 5.10** Síntesis cualitativa del efecto fitotóxico inhibitor de los aceites esenciales e hidrolatos ensayados en concentraciones decrecientes (2, 1, 0.5 y 0.25  $\mu\text{l ml}^{-1}$  y 100, 50, 25 y 12.5%, respectivamente) sobre la germinación (G) de semillas de *Spergula arvensis*, evaluada al final de la Fase I-Inhibición (FI-cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (FII-cuatro semanas) de modo independiente, y la proporción de plántulas viables (P) en ambas fases. Co: control, AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare*, AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub>, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis*, HOv: hidrolato de *Origanum vulgare*, HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis*.....260





MIRALLA ROMANA DE  
L'AZ DA HUMANIDADE  
OCTUBRE 2011





1

Introducción



## 1 Introducción

La Universidad de Santiago de Compostela recibió hace ya seis años el encargo por parte de la empresa Resconsa de la realización de los trabajos de seguimiento de los tratamientos de control de la flora vascular de la muralla romana de Lugo, atendiendo a la necesidad planteada por parte de los gestores públicos encargados del monumento de desarrollar estrategias de intervención para el control de la vegetación que colonizaba las paredes del monumento (Patrimonio de la Humanidad, UNESCO 2000), contribuyendo así a su conservación. Con este encargo se retomaron las colaboraciones anteriores (Buján *et al.*, 1998), a principios de este siglo, con el mismo objetivo de control de la flora vascular que crecía en sus paredes.

Con el inicio del seguimiento de los tratamientos de control de la flora de la muralla se ha planteado una metodología de trabajo científico-técnica apropiada para alcanzar los objetivos propuestos cada año. De este modo ha comenzado la realización de la tesis doctoral que se presenta.

En primer lugar se realizó una propuesta de tratamientos control de la vegetación que contemplaba el diseño de campañas periódicas de tratamiento fitosanitario (herbicidas de síntesis química) de la vegetación instalada en sus paredes, acompañadas de una limpieza posterior mediante corta/siega manual. Los condicionantes en la programación de estos trabajos (temporales y biológicos), así como los cambios normativos que cada vez limitaban más y seguramente prohibirán el uso de los herbicidas de síntesis en ciertos ámbitos de aplicación, como es el caso de parques y jardines públicos, nos llevó a explorar nuevas alternativas de control, más respetuosas con el medioambiente, contribuyendo a la sostenibilidad del ecosistema.

De este modo, se realizó la evaluación de los cambios en la cobertura de la flora vascular que coloniza las paredes de la muralla de Lugo (paramento exterior e interior) en ciclos anuales, con especial atención a la dominante *Parietaria judaica* L., tratando de elaborar un protocolo de actuaciones a corto plazo para el control integrado de la vegetación en el monumento. Se analizaron cambios en la cobertura de la flora vascular en relación con las características del monumento y la biología reproductiva de la especie dominante *Parietaria judaica*, y se evaluó la eficacia de nuevos métodos de control integrado, que pudiesen ser incorporados en los mencionados protocolos de actuaciones para la conservación del monumento.

De esta forma se comprobó que *Parietaria* continúa siendo la especie predominante, sobre todo en la parte exterior de la muralla. Los tratamientos de control con productos químicos de síntesis reducen su cobertura tras la aplicación, que se recupera gradualmente, tanto mediante el rebrote como la germinación de las semillas y el crecimiento de nuevas plantas, manteniendo así sus poblaciones en el monumento. El rebrote de parietaria se produce sobre todo en plantas protegidas en las grietas del monumento o incluso por otras plantas bien desarrolladas, de modo que la nube del producto, aplicado desde la base del monumento hacia arriba, no las alcanza con facilidad. En este mismo sentido, de la adecuación de los tratamientos de control a la biología reproductiva de la fauna, de los vencejos en particular, se deriva la imposibilidad de su realización en plena primavera, cuando las plantas alcanzan un desarrollo suficiente, posponiéndolo para finales de verano, cuando ya han alcanzado su máximo crecimiento, han florecido y fructificado dispersando sus semillas; por todo ello resulta difícil mejorar la eficacia de los mismos sobre el crecimiento de parietaria.

Para ello, en segundo lugar, se hizo necesario averiguar si resulta posible reducir la cobertura de parietaria en la muralla limitando la germinación y el establecimiento de nuevas plantas, para lo que se precisaba conocer tanto las condiciones para que ésta se produzca, como su nivel y ritmo, como el producto/tratamiento más apropiado para conseguirlo.

En este aspecto, los aleloquímicos producidos por las plantas, que son liberados al medio ambiente por exudación de las raíces, lixiviación de las hojas o descomposición de restos de material vegetal incorporados al suelo, podrían ser útiles. La revisión de este tema mostró que son numerosos los aceites esenciales, y en menor medida los hidrolatos, estudiados como potenciales herbicidas, que han mostrado tener efecto sobre la germinación de arvenses, entre ellos los de *Hyssopus officinalis* L., *Lavandula angustifolia* Miller, *Majorana hortensis* L., *Melissa officinalis* L., *Ocimum basilicum* L., *Origanum vulgare* L., *Salvia officinalis* L. y *Thymus vulgaris* L. (Arminante *et al.*, 2006). Se trata de productos que actúan muy rápido y cuya actividad es limitada porque la mayoría se volatilizan rápidamente (Dayan *et al.*, 2009), por lo que cabe esperar un mayor efecto sobre las plantas con germinación rápida y concentrada.

Se plantearon bioensayos dosis-respuesta para evaluar la potencialidad inhibitoria sobre la germinación de las semillas de *Parietaria judaica* de una treintena de productos, la mayoría aceites esenciales, hidrolatos y extractos de plantas, incorporando innovaciones metodológicas que contribuyeron a dicha evaluación, llegando a conocer para cada uno de ellos en cada concentración su efecto sobre la germinación, la posibilidad de recuperarla tras la exposición y la viabilidad de las plántulas obtenidas.

Los resultados satisfactorios obtenidos en la fase *in vitro* con algunos de los productos ensayados (primera fase), nos han conducido en tercer lugar a una secuencia de fases de transferencia tecnológica para verificar la eficacia *in situ* de aquéllos (aceites esenciales/hidrolatos y fitocidas de síntesis química) cuya actividad fitotóxica sobre las semillas y/o plántulas de *Parietaria judaica* había sido constatada previamente.

A pesar de que son muy escasos los estudios en los que se realiza dicha verificación, bien en invernadero o directamente en el campo, entre ellos los de Verdeguer (2011), en nuestro caso, hemos considerado que dichos estudios deberían ser realizados con carácter preliminar a la utilización directa en el campo de productos con potencialidad herbicida, como es el caso de los extractos y aceites, cuyos compuestos activos son en gran parte volátiles (Dayan, 2009), por lo que su efecto podría modificarse en condiciones semicontroladas. También en este caso hemos propuesto un protocolo metodológico que puede conducir a realizar aplicaciones *in situ*, en nuestro caso en la muralla, con seguridad.

Los estudios anteriormente comentados, realizados con cuatro aceites 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 finalmente, se ha continuado con su evaluación, tratando de detectar si alguno de ellos presenta también actividad fitotóxica sobre la germinación de las semillas de especies que con frecuencia compiten con los cultivos como *Epilobium hirsutum* L., *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.

Nuevamente se han planteado ensayos de fitotoxicidad *in vitro* e *in situ*, llegando a conocer para cada producto en cada concentración su efecto sobre la germinación, la posibilidad de recuperarla tras la exposición, la viabilidad de las plántulas obtenidas y el estado final de las semillas.

Con las diferentes tareas realizadas que aquí se presentan, se pretende contribuir al mantenimiento en buen estado de conservación de la muralla de Lugo, aportando además nuevos conocimientos sobre la potencialidad como herbicidas naturales de aceites e hidrolatos, que pueden ser integrados en agricultura orgánica/ecológica.



A nighttime photograph of the Roman wall of Lugo, Spain. The wall is illuminated from below, highlighting its stone texture. In the background, the illuminated towers of the Lugo Cathedral are visible against the dark sky. The foreground shows a road with white arrows and small lights.

2

## Control de la flora de la muralla romana de Lugo



## 2 Control de la flora de la muralla romana de Lugo

### 2.1 INTRODUCCIÓN

La muralla romana de Lugo fue declarada Patrimonio de la Humanidad por la UNESCO en el año 2000. Se trata de uno de los más importantes monumentos de la Hispania romana y de su época, al tratarse de la única fortificación completa en todo su trazado. Fue por ello también el monumento más estudiado de la Galicia romana y uno de los más significativos del tipo y grado de romanización del NO peninsular.

El monumento tuvo en su origen 85 torres, todas de planta semicircular pero no siempre del mismo diámetro y flecha, solían estar cercanas entre sí y estaban provistas (probablemente todas) de dos pisos altos con 2, 3 o 4 grandes ventanales cada uno, de los cuales hoy en día solo queda uno (y restaurado) en la zona de la Mosquera. Actualmente dispone de 10 puertas (cinco de las cuales son originales y cinco abiertas en los tiempos modernos), cinco escaleras y dos rampas que dan acceso al adarve. La técnica de construcción de este monumento es la característica de la época, un gran cuerpo interior "*opus caementicium*" constituido por mampostería y cascajos mezclados con cal y arena, localizado entre dos lienzos de pizarra tabular, sillares o mampostería de granito, formando un paredón, posiblemente enyesado por las dos caras (López de Rego, 2005; Alcorta Irastorza, 2008).

El marco legal que rige las intervenciones llevadas a cabo en el monumento tiene su origen en la Constitución Española, en el Estatuto de Autonomía de Galicia, Ley Orgánica 1/1981, de 6 de abril, y en el Real Decreto 2434/1982, de 24 de julio, sobre la transferencia de funciones y servicios de las autoridades estatales a la Comunidad Autónoma de Galicia en materia cultural.

Cualquier intervención que afecte a su estructura o área circundante debe cumplir con las regulaciones específicas sobre protección del patrimonio cultural a nivel nacional, según lo establecido en la ley 16/1985 sobre el Patrimonio Histórico Español, y las regulaciones establecidas en la Ley 8/1995 sobre Patrimonio Cultural de Galicia.

Este marco legal implica la colaboración de tres autoridades públicas responsables de proteger el monumento: autoridades estatales centrales, autoridades autonómicas de la Xunta de

Galicia y las autoridades locales del Ayuntamiento de Lugo. Desde que es Patrimonio de la Humanidad también es necesario seguir las indicaciones de la UNESCO y cumplir sus normas. Esta colaboración entre las diferentes autoridades es la base para la gestión directa del monumento, llevada a cabo por la Xunta de Galicia como propietaria y la autoridad responsable de su cuidado en la Comunidad Autónoma. Todos los trabajos de restauración y mantenimiento en la muralla romana se llevan a cabo en estricto cumplimiento de las directivas del Plan de Mantemento da Muralla Romana de Lugo, con vigencia plurianual.

La presentación de la candidatura ante la UNESCO para la declaración de la muralla como Patrimonio de la Humanidad impulsó la tarea de mejorar su aspecto realizando, entre otros trabajos, una limpieza de la flora adventicia colonizadora de sus paredes, cuyo crecimiento afecta a la conservación del monumento, puesto que sus raíces pueden contribuir a su deterioro mecánico y químico (Lisci *et al.*, 2003).

En este sentido, la empresa Resconsa encargó a principios del año 2012 a la Universidad de Santiago de Compostela la realización de los trabajos de seguimiento de los tratamientos de control de la flora vascular de la muralla romana de Lugo, atendiendo a la necesidad por parte de los gestores públicos de desarrollar estrategias de intervención para el control de la vegetación que colonizaba las paredes de la muralla romana de Lugo (Patrimonio de la Humanidad, UNESCO 2000), contribuyendo así a la conservación del monumento.

Fue en este año en el que, retomando colaboraciones anteriores, el grupo de investigación inició su trabajo en el marco de un Plan de Mantemento da Muralla Romana de Lugo, que persigue una gestión multidisciplinar del monumento, con un apartado específico de control de la flora vascular y de sus efectos medioambientales y sobre los materiales de construcción del monumento encargado a nuestro equipo.

Este control de la vegetación contemplaba el diseño de campañas periódicas de tratamiento fitosanitario (herbicidas de síntesis química) de la vegetación instalada en sus paredes; si bien los condicionantes en la programación de estos trabajos (temporales y biológicos), así como los cambios normativos que cada vez limitan más y seguramente prohibirán el uso de los herbicidas de síntesis en ciertos ámbitos de aplicación, como es el caso de parques y jardines públicos, nos llevó a explorar nuevas alternativas de control, más respetuosas con el medio ambiente, contribuyendo a la sostenibilidad del ecosistema.

Observando que un porcentaje considerable de la vegetación que coloniza la muralla, donde la especie principal es *Parietaria judaica* L., se incorpora por germinación de las semillas, los ensayos se encaminaron a conseguir un control de esta vegetación evaluando la fitotoxicidad de productos naturales, obtenidos de diferentes especies de plantas, sobre la germinación de las semillas.

Tras una evaluación preliminar del estado vegetativo de las plantas colonizadoras de la muralla, se recomendó inicialmente (primavera de 2012) hacer una limpieza mediante corta con anterioridad a la aplicación de los tratamientos fitocidas químicos.

Diversos colectivos ecologistas mostraron, en ese año, su preocupación por los posibles inconvenientes que los tratamientos y la retirada de plantas secas pudieran causar a la fauna, especialmente a las aves que nidifican en las paredes de la muralla, recomendando efectuar los trabajos fuera del periodo de nidificación de las mismas (fundamentalmente en los meses de mayo a junio). Esta recomendación también fue hecha por el Xefe da Sección de Biodiversidade en Lugo (Consellería de Medio Rural) y fue atendida, iniciándose el tratamiento químico a finales de julio, con la previsión de que según evolucionase la vegetación tras este primer tratamiento se realizaría o no otro segundo en noviembre. En este sentido se hicieron observaciones en relación con la población de vencejos (*Apus apus* L.), resultando que en junio, y hasta mediados de julio, su densidad fue elevada y se observaban sin dificultad, dado el comportamiento de vuelo habitual de estas aves; también se observaron aves en las paredes de la muralla introduciéndose en sus nidos de cría.

A finales de julio y especialmente a finales de agosto, su densidad disminuyó considerablemente, hasta un nivel muy bajo o incluso nulo (según la zona de que se tratase), por lo que, teniendo en cuenta el comportamiento de estos pájaros, cabía suponer que las crías ya volaran (sin regreso al nido) y que los adultos también se fueran, iniciando su migración anual. En consecuencia, se decidió realizar el tratamiento químico a finales de julio y principios de agosto para respetar el periodo de nidificación de las aves y garantizar la conservación de las poblaciones de las mismas en el monumento.

En relación con este asunto, en el año 2013 se encargó un informe científico a expertos para ampliar los conocimientos biológicos sobre la población de vencejos que emplea la muralla como hábitat de nidificación y compatibilizar las tareas de control de la vegetación en el monumento con los ciclos biológicos de las aves.

Dado que de los ensayos realizados a finales de la última década del siglo pasado se recomendaba el producto químico glifosato, se propuso realizar los tratamientos del primer año nuevamente con este principio activo, bajo una formulación incluida en el vigente Registro de Productos Fitosanitarios del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y autorizada para uso urbano, como parques y jardines. El producto que se propuso fue el Roundup Plus de Monsanto (glifosato 36%, sal isopropilamina) en el tratamiento de primavera, cuyo nombre comercial incluido en el mencionado registro cambia con posterioridad a Roundup Ultra Plus, manteniendo la recomendación para el tratamiento de otoño.

Algunas formulaciones del glifosato, como la que hemos propuesto, están autorizadas para uso urbano en parques y jardines y este principio activo contaba también con autorización de la Unión Europea, bastante restrictiva al respecto. Actualmente es uno de los herbicidas más utilizados en el mundo. Es un producto recomendado, especialmente en la pasada década, en publicaciones para realizar tratamientos de control de la vegetación (Baylis, 2000), también en monumentos (Lisci *et al.*, 2003; Jorda Pardo, 2011). Se venía utilizando sin problemas desde hacía unos 40 años y esta materia activa fue incluida en el Anexo I de la Directiva Europea 414/91/EEC, considerándose que su empleo no era, en las condiciones normales de uso, genotóxico, ni cancerígeno, ni mutagénico.

En el año 2012 en el que se retomaron las actividades de seguimiento de los tratamientos, labor interrumpida durante más de 10 años, este equipo investigador propuso también el ensayo localizado de dos productos químicos de última generación (Ajax, MCPA 60%+Finale, glufosinato amónico 15%; Kid, oxadiazón 30%+glifosato 10.8%) y también de un procedimiento físico (solarización) de control de la flora vascular colonizadora de las paredes de la muralla. Con esta propuesta se trataba de evaluar otros de métodos de control químicos y físicos, ambientalmente de mayor sostenibilidad y socialmente más aceptados (Papafotiou *et al.*, 2010), así como realizar una aproximación ecológica a dicho control (Mortensen *et al.*, 2000).

El primer tratamiento general de control no tuvo la efectividad esperada, tanto en el paramento interior como en las distintas partes del exterior, con un resultado desigual, especialmente en el control de *Parietaria judaica*, la planta más abundante, debido a la dificultad de ajustar la dosis de caldo aplicada y a la realización de la aplicación sin coadyuvante, entre otras razones. Por estos motivos se consideró conveniente realizar un tratamiento complementario puntual, en octubre.

En cuanto a los nuevos tratamientos realizados, la solarización con plástico negro afectó muy eficazmente a la vegetación; entre los tratamientos químicos el más efectivo inicialmente fue el Kid, aunque en ambos casos (de tratamiento químico experimental) la eficacia tampoco se consideró satisfactoria, por lo que también se propuso realizar un tratamiento de control en octubre.

Consideramos que para la programación del año 2013 era conveniente realizar una evaluación inicial de la recuperación de la vegetación tras los tratamientos de octubre, previa a la programación del tratamiento general y los experimentales. Los resultados de esta evaluación mostraron que la cobertura de la vegetación en la muralla era baja, sobre todo en la parte exterior del monumento, por lo que se podría considerar “limpia” en su mayor parte, lo que haría posible retrasar las actuaciones de control de la misma. En relación con dichas actuaciones, nuestro equipo consideró que el principal condicionante era la no interferencia de las mismas con los periodos biológicos críticos de la fauna en general, y sobre todo de aquellas especies de interés para la conservación, por lo que el principio de prevención que debía prevalecer, en tanto no se dispusiera de información más concreta sobre la biología y etología de las aves, motivó que se evitara intervenir desde finales de abril hasta finales de septiembre de ese año. En consecuencia, propusimos realizar los tratamientos de control de la vegetación de la muralla en el año 2013 en el mes de abril.

En este segundo año se propuso excluir de dichas actuaciones de control determinadas zonas, bien por la ausencia de vegetación o bien porque la cobertura era muy baja (sobre todo en las zonas que habían sido repasadas el año anterior); también se excluyeron los lienzos correspondientes a los nuevos tratamientos del pasado año, en los que se realizó un seguimiento a medio plazo, proponiendo una aplicación de superficie más amplia en la muralla con estos nuevos productos.

De esta forma, el primer tratamiento general de control de la vegetación en la muralla en el año 2013 se realizó en la primavera (en la segunda quincena de abril), para evitar la posible ineficacia que se puede producir de modo más o menos puntual, cuando las plantas más desarrolladas producen un efecto protector sobre otras y, sobre todo, evitando la interferencia con los vencejos, respetando sus fechas de estancia en la muralla de Lugo.

En este año 2013, los nuevos productos químicos ensayados en partes muy concretas de la muralla en el año 2012, dados los prometedores resultados se evaluaron en una aplicación con mayor extensión, y fueron aplicados en primavera a mayor escala, repitiéndose la aplicación

experimental en otoño con el producto con el que se observaron mejores resultados en la aplicación de primavera (Kid).

Evaluada la recuperación de la cobertura de la vegetación tras la primera aplicación, tanto de la general como de los ensayos experimentales, se observó que en un periodo próximo a medio año su abundancia se mantuvo por debajo de la inicial, por lo cual para no superar ese nivel de cobertura, se aconsejó una segunda aplicación en otoño (segunda quincena de octubre y noviembre), lo que nos pareció aconsejable por lo menos mientras no se consiguiera reducir la abundancia de *Parietaria judaica*, cuyo rápido crecimiento resultaba determinante para establecer la periodicidad de las aplicaciones.

Las consideraciones para el siguiente año 2014 pivotaban sobre la periodicidad de los tratamientos, la conveniencia de la realización de dos aplicaciones anuales, por lo menos mientras no se consiguiese reducir la abundancia de *Parietaria*, sobre la técnica de aplicación indicando las opciones de mejora; así como sobre los productos a emplear en las zonas susceptibles de aplicación.

En este sentido, quedó definido un protocolo de actuaciones que mantuvo continuidad en el año 2014, en el que, además de las dos aplicaciones anuales, también se recomendó realizar una limpieza general de toda la muralla a finales de año. En este periodo se verificó que el protocolo de actuaciones propuesto, que contemplaba dos aplicaciones anuales, resultó adecuado, garantizando que la cobertura de la vegetación en la muralla se mantuviese por debajo del 10%, lo cual le confirió al monumento un aspecto limpio todo el año.

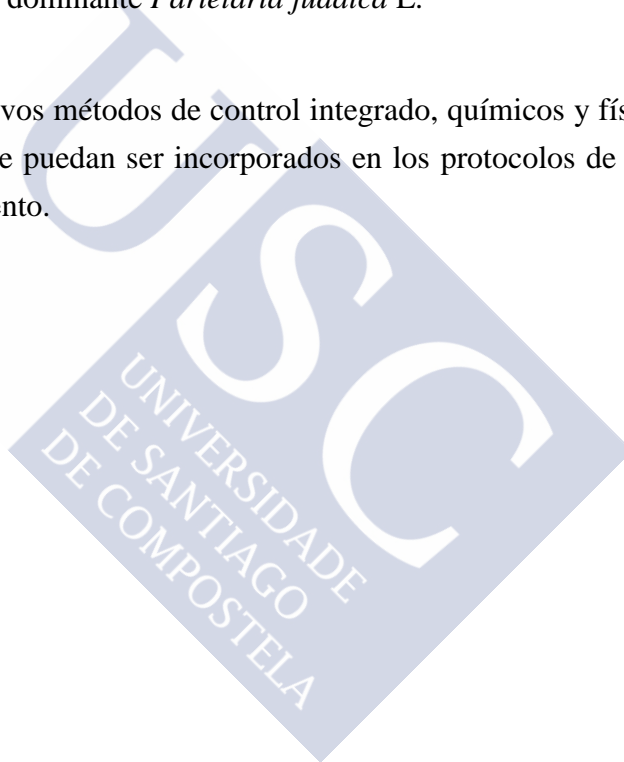
Por lo tanto, se han podido realizar ciclos periódicos durante tres anualidades (2012-14) que englobaron actividades de evaluación preliminar de la cobertura de la vegetación - composición específica y abundancia- en la muralla de Lugo (paramento exterior e interior), determinación de la eficacia de los tratamientos (químicos y físicos) de control (aplicaciones generales y ensayos particulares), así como de seguimiento posterior de la evolución de la vegetación (recuperación) tras éstos; además se han podido evaluar los cambios en la cobertura cuando se realizó una única aplicación anual (primavera u otoño). El conjunto de actuaciones realizadas en el periodo 2012-2014, se corresponde con la necesidad de realizar un control de la vegetación de la muralla lo más eficaz posible, contribuyendo así a la conservación del monumento, para lo que resultó necesario actualizar la información disponible sobre la cobertura de la vegetación de la muralla, la composición de sus especies más abundantes y su distribución en las distintas partes del monumento.

## 2.2 OBJETIVOS

Evaluar los cambios en la cobertura de la flora vascular que coloniza las paredes de la muralla de Lugo (paramento exterior e interior) en ciclos anuales con especial atención a la dominante *Parietaria judaica* L., en función del diseño de las campañas de tratamiento fitosanitario, que permitan la elaboración de un protocolo de actuaciones para el control integrado de la vegetación en el monumento.

Analizar los cambios en la cobertura de la flora vascular en relación con las características del monumento (paramento exterior e interior, orientación de los lienzos y cubos), y la biología reproductiva de la especie dominante *Parietaria judaica* L.

Evaluar la eficacia de nuevos métodos de control integrado, químicos y físicos (solarización - oscura y translúcida-), que puedan ser incorporados en los protocolos de actuaciones para la conservación del monumento.



## 2.3 MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.3.1 Evaluación de la cobertura de la vegetación

Para la evaluación de la cobertura de la vegetación en la muralla durante las anualidades estudiadas (2012-14), se realizaron inventarios periódicos siguiendo la misma metodología, evaluando 29 (de las que siete corresponden al interior) de las parcelas permanentes estudiadas con anterioridad, en el inicio de la pasada época, cuando se realizaron estudios sobre la composición florística y abundancia de la flora adventicia que la coloniza y sobre los métodos más adecuados para su control (Buján *et al.*, 1998), bajo sucesivos convenios de colaboración entre la Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria de la Xunta de Galicia y la Universidade de Santiago de Compostela.

Las mencionadas parcelas en las que se realizaron inventarios florísticos, de altura igual a la del monumento y de 3 m de anchura, se situaron en zonas representativas de la muralla y se correspondieron inicialmente con 22 lienzos en la parte exterior y siempre 7 lienzos en la interior, en las que se realizaron inventarios considerando cuatro bandas de vegetación horizontales de vegetación con características diferenciadas: balcón, parte alta del lienzo, parte media del lienzo y banqueta.

En cada banda se inventarió la composición específica y la abundancia (cobertura) de la vegetación, siguiendo la metodología habitual de análisis cuantitativo de la misma (Moore y Chapman, 1986), muy apropiada para este tipo de estudios ya que aporta información sobre la composición y abundancia específica y los cambios que se producen en las mismas, tanto en relación con las aplicaciones de tratamientos de control como con la dinámica natural de la vegetación. De este modo, la evaluación cuantitativa y cualitativa realizada por expertos *in situ* permite modular de modo inmediato y continuado las propuestas de protocolo de actuaciones de control de la flora vascular en la muralla.

El número de parcelas inventariadas se vio incrementado en función de la exigencia de los estudios realizados; la necesidad de incorporar inventarios para evaluar los efectos de los productos experimentales propuestos, o comparar las variaciones de la cobertura cuando se realiza una única aplicación anual (bien en primavera o en otoño).

Esta evaluación de la cobertura se realizó en el año 2012 de manera preliminar en los meses de junio y julio, y se repitió en septiembre (después de finalizar la aplicación del tratamiento general de verano) y en el mes de noviembre (al finalizar el tratamiento de repaso realizado en octubre) para evaluar la eficacia de los mismos.

En el año 2013, la evaluación de la cobertura se realizó con carácter preliminar en el mes de marzo, y se repitió en mayo, después de finalizar la aplicación del tratamiento general de primavera, antes de que se apreciase su efecto (lo que permitió detectar variaciones de cobertura respecto a la evaluación preliminar y valorar con mayor precisión la eficacia del tratamiento), así como transcurridos tres y cinco meses respectivamente (en julio y septiembre), lo que permitió evaluar la eficacia y la recuperación de la flora. Del mismo modo, se realizó la evaluación correspondiente al tratamiento de otoño en los meses de noviembre (inmediatamente después de la aplicación) y diciembre (transcurrido un mes, para evaluar la eficacia del mismo).

En el año 2014, la evaluación preliminar de la cobertura se realizó en el mes de marzo, evaluando la eficacia del tratamiento de primavera en el mes de junio y la recuperación de la cobertura en los meses de julio y septiembre, antes de la aplicación de otoño, cuya eficacia fue evaluada en los meses de octubre-noviembre.

En el periodo estudiado (2012-2014) se realizaron 15 inventarios en cada parcela permanente (29), resultando 435 inventarios (composición específica y abundancia); además se realizaron inventarios en las parcelas incorporadas ex profeso para evaluar los ensayos particulares (métodos experimentales o aplicaciones con carácter anual), que adicionaron 18 más, lo que supuso un total de 453 inventarios.

## **2.3.2 Tratamientos fitosanitarios de control de la vegetación**

### **2.3.2.1 Realización y seguimiento de la aplicación del tratamiento general**

En el primer año, 2012, el producto que se utilizó en el tratamiento químico aplicado a la muralla (finales de julio-principios de agosto) con carácter general (exterior e interior) fue el Roundup Plus (glifosato 36%, sal isopropilamina), incluido en el Registro de Productos Fitosanitarios del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y autorizado para parques y jardines públicos. Este producto se aplicó con una recomendación inicial de una dosis de 8

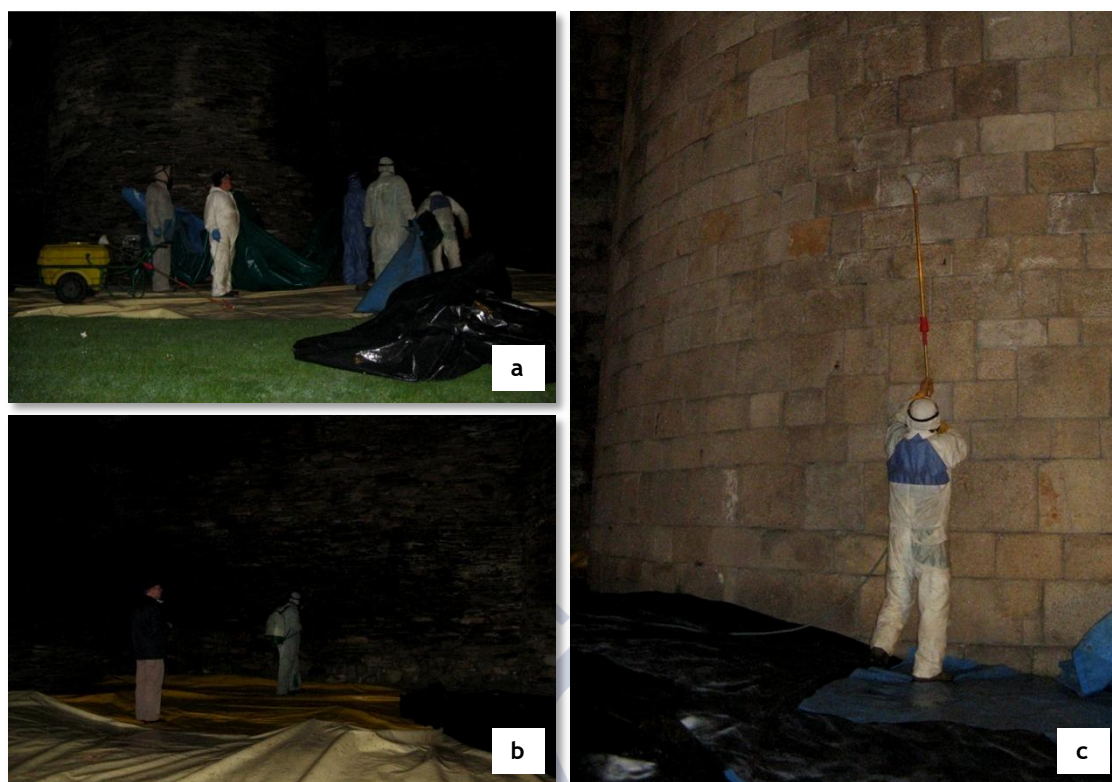
l/ha, así como de 300-400 l/ha de caldo fitocida, a bajo volumen, a una presión de 2 atmósferas. El tratamiento fitosanitario (y actividades derivadas del mismo) fue realizado por una empresa especializada y con amplia experiencia en este tipo de aplicaciones en el propio monumento (Figura 2.1).

La preparación del caldo fitocida se supervisó diariamente, si bien esta supervisión resultó más difícil de realizar en su aplicación dada la utilización de varios equipos que se rellenaban con frecuencia, por lo que el volumen consumido en dicha aplicación resultó algo menor que el que correspondería en función de la dosis recomendada y la superficie tratada, por eso se indicó, como responsables de los trabajos, la conveniencia de realizar un nuevo tratamiento en zonas puntuales en el mes de octubre.

Para la realización de este repaso puntual (tratamiento complementario), la preparación del caldo, del mismo modo que lo indicado para la aplicación inicial general, fue supervisada por nuestro equipo; la aplicación se realizó con el mismo producto fitocida (Roundup Plus), si bien en este caso, siguiendo las sugerencias de la empresa adjudicataria de los tratamientos, se realizó con una dosis de 10 l/ha, para compensar la ausencia de coadyuvante y la posible resistencia adquirida por los ejemplares de *P. judaica* tras varios años de tratamientos químicos con productos similares. Se aplicaron nuevamente 300-400 l/ha de caldo fitocida, a bajo volumen, a una presión de 2 atmósferas (en la segunda quincena de octubre).

Para un riguroso seguimiento de esta aplicación, y tras la experiencia inicial en la que resultó difícil ajustar *in situ* con exactitud el volumen de caldo aplicado en relación al recomendado, se realizaron cálculos previos del volumen de consumo teórico; a partir de los datos del levantamiento topográfico facilitados por el arquitecto conservador del monumento, Ignacio López de Rego, se obtuvieron los datos de superficie que permitieron generar una relación de volúmenes teóricos parciales que corresponderían al cubo/lienzo aplicado, en función de la dosis recomendada.

Este tratamiento complementario se realizó prestando especial atención a las zonas de elevada cobertura (ángulos entre cubos y lienzos) y en su seguimiento se realizaron continuas mediciones de consumo real que se cruzaron con el dato teórico a fin de afinar lo máximo posible el consumo por tramos.



**Figura 2.1** Aplicación del tratamiento fitosanitario general en la zona exterior de la muralla, en jornada nocturna, con carretilla y lanceta (a y c) y con mochila de batería (b), desde abajo (abril de 2014).

En el segundo año, 2013, se realizaron nuevamente dos tratamientos anuales, uno en primavera (abril) y otro en otoño (octubre-noviembre), con carácter selectivo en el exterior y en todo el interior, adarve y paseo.

La realización del tratamiento con carácter selectivo en ambas campañas facilitó el estudio posterior de los cambios de la cobertura de la vegetación en zonas concretas en las que en el periodo de un año se realizó una única aplicación; zonas excluidas de la aplicación en primavera (y tratadas en el otoño anterior) posibilitaron el estudio de los cambios en la cobertura entre otoños (otoño 12-13); de modo análogo, la selectividad del tratamiento de otoño, por su parte, dejó excluidas zonas que, habiendo sido tratadas en primavera, no lo fueron en otoño, permitiendo estudiar los cambios en la cobertura entre primaveras (primavera 13-14).

El producto empleado fue el Roundup Plus (primavera)/Roundup Ultra Plus (otoño) (mismo principio activo: glifosato 36%, sal isopropilamina), cuyo cambio de nombre comercial

aparecía como tal en el Registro de Productos Fitosanitarios del Ministerio; aplicado con la misma dosis (10 l/ha de producto, 300-400 l/ha de caldo) y pulverización.

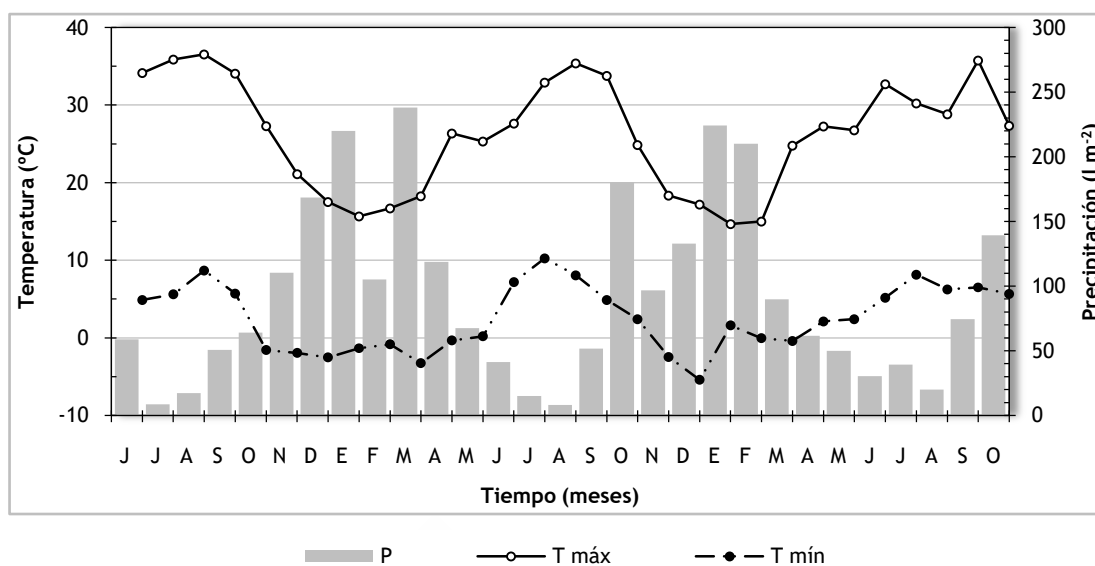
En este caso se adicionó un coadyuvante (Oil-Oro, aceite de parafina al 83%) autorizado para agricultura ecológica y en la segunda campaña, por motivos de comercialización indicados por la empresa adjudicataria de los trabajos se empleó, en combinación con el primero, otro diferente de igual composición (Zapi Garden).

En cuanto a la técnica de aplicación, en ambas campañas de 2012 y el primer tratamiento general de 2013 (primavera), los trabajos se realizaron con lanceta y carretilla desde el adarve y con mochila de batería (equipo utilizado habitualmente para aplicaciones discretas de productos fitosanitarios) desde la parte baja, para cubrir toda la altura de la muralla, empleando de manera puntual una mochila de motor (nebulizadora).

En el segundo tratamiento general (otoño), persiguiendo una mejora técnica de la aplicación, que permitiese modificar el ángulo de aplicación, más perpendicular al paramento, se empleó un nuevo modelo de boquilla de aplicación; se empleó la carretilla de campañas anteriores, si bien la nueva lanceta permitió una aplicación desde abajo (sin necesitar trabajar desde el adarve), combinando inicialmente una fase de nebulización (zona baja-media) y otra de presión (zona media-alta). De este modo, con la mochila de batería se cubrió la zona baja, la zona baja-media con lanceta en una fase de nebulización, y con lanceta y una fase de presión se alcanzaron las zonas medias-altas. La mejora técnica de la aplicación *in situ* supuso abandonar la fase de nebulización debido a la cantidad de producto que caía sobre las lonas protectoras, sin ser fijado por la vegetación. En algunas zonas de aplicación se empleó también en esta campaña la mochila de motor (nebulización); y aquellas zonas donde la altura del monumento supuso una limitación técnica, se completaron trabajando con mochila de batería desde el adarve.

En el tercer año, 2014, se realizaron también dos tratamientos anuales, uno en primavera (marzo-abril) y otro en otoño (septiembre), con carácter selectivo en el exterior y en todo el interior, adarve y paseo, siguiendo la metodología descrita en la última campaña del año anterior.

En la Figura 2.2 se muestran las condiciones meteorológicas registradas a lo largo de los meses de estudio en la muralla.



**Figura 2.2** Temperatura máxima media (T máx), temperatura mínima media (T mín) (°C) y precipitación (P) (l m<sup>-2</sup>) mensuales registradas a lo largo de los meses de estudio en la muralla (junio 2012-octubre 2014). Datos registrados en la estación meteorológica Campus Lugo (Lugo) (Meteogalicia, 2015).

### 2.3.2.2 Realización de los ensayos particulares

Inicialmente, en el año 2012, los lienzos y parcelas de los nuevos ensayos se eligieron y se replantearon siguiendo criterios de presencia de especies y abundancia de las mismas, de modo que las especies que representaban mayor cobertura en la parte exterior de la muralla (*Cymbalaria muralis* P. Gaertn., B. Mey. & Scherb. y *Parietaria judaica* L.) estuviesen presentes en la superficie a muestrear y su abundancia resultase suficiente para evaluar los efectos de los tratamientos propuestos.

#### 2.3.2.2.1 Tratamientos físicos (solarización)

Se ensayaron nuevos tratamientos físicos de control de la flora de la muralla basados en métodos de solarización (Sauerborn *et al.*, 1989; Sun *et al.*, 2015), empleando un plástico translúcido (solarización I) y un plástico negro (solarización II), de medidas 1.6x1.4 m y 2.0x1.5 m, respectivamente, que se colocaron en el lienzo entre los cubos 68 y 69 (L 68-69), seleccionado siguiendo los criterios previamente establecidos. En este caso no se realizaron repeticiones de localización porque se trataba de un ensayo simplemente orientativo para conocer si este sistema podría resultar efectivo o no.

Los plásticos se ubicaron en la zona media-alta de la muralla (mayor cobertura) sujetos a la pared con un listón de madera, cuñas y clavos, atendiendo las recomendaciones y con la ayuda de operarios propios de la empresa Resconsa, encargada de los trabajos de restauración y conservación arquitectónica del monumento, para lo que se necesitó emplear una máquina elevadora (plataforma de pluma telescópica H23TPX) (Figura 2.3a).

Para determinar la eficacia de los tratamientos físicos, previa colocación de los plásticos, se realizó una evaluación inicial de la cobertura, estableciendo unidades de muestreo permanente con una superficie de 25x25 cm, incluidas dentro de un cuadrado de 50x50 cm (dos por tratamiento –modelo de plástico-); trascurridos dos meses se retiraron los plásticos y se evaluó la cobertura final.

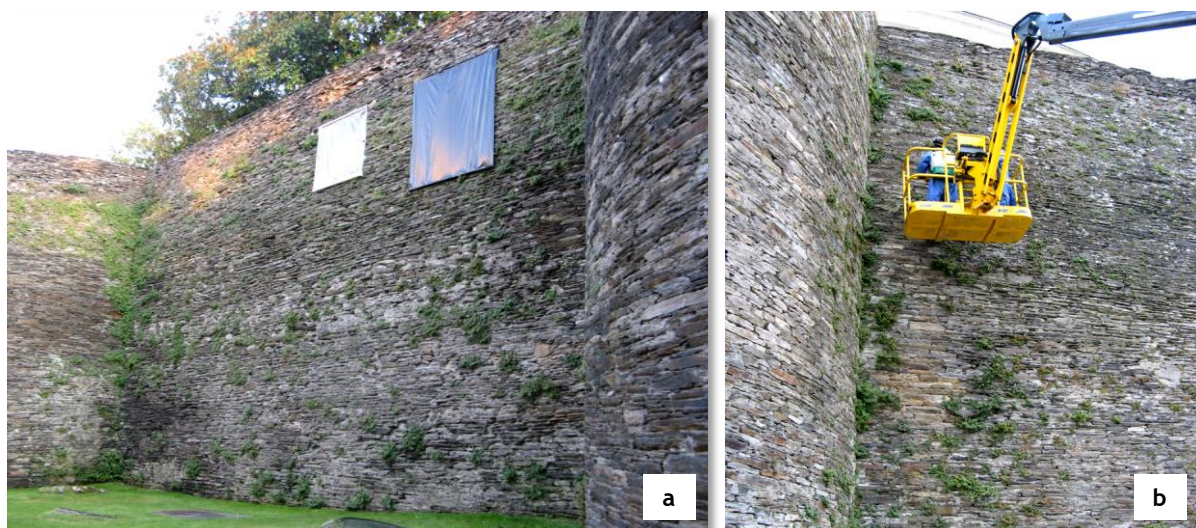
#### 2.3.2.2.2 *Tratamientos químicos (nuevos productos herbicidas)*

Se ensayaron dos nuevos tratamientos químicos (productos de síntesis) de control de la flora empleando un caldo resultante de la mezcla de dos herbicidas: Ajax-Finale (Ajax 2 l/ha; Finale 4 l/ha; 300-400 l de caldo/ha; 2 atmósferas) y el comercial Kid (10 kg/ha; 300-400 l de caldo/ha; 2 atmósferas), aplicados en los lienzos entre los cubos 71 y 72 (L 71-72) y 72 y 73 (L 72-73), respectivamente.

El Ajax (MCPA al 60%), el Finale (glufosinato amónico al 15%) y el Kid (mezcla de oxadiazón, 30%, y glifosato, 10.8%) también estaban incluidos en el Registro de Productos Fitosanitarios (actualización del 26.02.2013) del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y autorizados para parques y jardines públicos.

Los productos fueron aplicados por la misma empresa especializada en tratamientos fitosanitarios, utilizando mochilas de batería y perpendicularmente al paramento, en parcelas permanentes de 50x50 cm replanteadas en los respectivos lienzos (tres por tratamiento -herbicida-), para lo que se necesitó emplear la misma máquina elevadora de pluma telescópica (Figura 2.3b).

Para determinar la eficacia de los tratamientos químicos, se realizó una evaluación inicial de la cobertura previa a la aplicación, estableciendo unidades de muestreo con una superficie de 25x25 cm, incluidas dentro de la parcela de 50x50 cm; trascurridos dos meses se evaluó la cobertura final.



**Figura 2.3** Realización de los ensayos particulares: perspectiva de los tratamientos físicos, empleando plástico translúcido (solarización I) y plástico negro (solarización II) (a) y aplicación del producto fitocida, con mochila de batería, en uno de los lienzos seleccionados para tratamiento químico (b).

Estos nuevos productos químicos, ensayados inicialmente en el año 2012, fueron aplicados en la primavera de 2013 a mayor escala (entre la Puerta de San Pedro y la Puerta Falsa, en el paramento exterior), ya que anteriormente habían sido ensayados en pequeñas zonas, aconsejando los resultados prometedores iniciar su evaluación en un tramo más o menos amplio. En el tratamiento de otoño, tras la evaluación de su eficacia, se recomendó continuar únicamente con el Kid (en un tramo exterior entre la Puerta de la Estación y la Puerta Falsa).

En este caso para la preparación del caldo se adicionó el mismo coadyuvante del tratamiento general (Oil-oro en la primera campaña y en la segunda, en combinación con éste, el Zapi Garden).

La técnica de aplicación en el tratamiento de primavera combinó la mochila de batería para zonas bajas y carretilla y lanceta (desde el adarve); mientras que en otoño, tal como en el caso del tratamiento general, el empleo de una nueva boquilla permitió la aplicación desde abajo, si bien zonas muy altas o muy bajas, debido a la limitación del equipo, fueron repasadas con mochila de batería.

En el año 2014, observados los resultados obtenidos en el año anterior, se amplió la escala de aplicación del Kid en primavera y otoño, siguiendo la misma metodología descrita.

El resultado de la evaluación de la eficacia de todos los tratamientos realizados se consideró satisfactorio cuando el nivel de reducción de la vegetación alcanzado resultó muy elevado (96-100% de reducción), bastante satisfactorio cuando la reducción resultó elevada (50-95%), y poco satisfactorio cuando la reducción fue baja (<50%).

De igual modo, teniendo en cuenta la dinámica de la vegetación en el periodo estudiado, consideramos que un cubo o lienzo de la muralla presentó un aspecto limpio cuando la cobertura en las diferentes partes no superó el 10%.

### 2.3.2.3 Realización de la limpieza (exterior e interior)

Además de la limpieza general inicial, se realizó una limpieza parcial (finales de 2012) y otra general al final del convenio de colaboración (2012-14) para retirar los restos vegetales después de la aplicación, trabajo que fue realizado por la misma empresa encargada de los tratamientos.

Estas actividades de limpieza combinaron diferentes metodologías, condicionadas por la accesibilidad y la altura de las zonas a limpiar, empleando con carácter general una máquina elevadora (plataforma de pluma telescópica de 20 ó 30 m, dependiendo de la zona) y retirando las plantas directamente, con la ayuda de un rastrillo de plástico para un barrido inicial, o con un pequeño podón que se introdujo entre las lajas para ayudar a su retirada (Figura 2.4a,b,c). Puntualmente en zonas de acceso restringido, los restos vegetales fueron retirados mediante trabajo vertical, desempeñado por grupos de operarios especializados descolgados con arneses (Figura 2.4d,e,f).



**Figura 2.4** Brazo telescópico con cesta elevadora (a, b y c) empleados en los trabajos de limpieza de la vegetación en la zona exterior de la muralla; estructura de anclaje (d), material auxiliar (e) y realización de trabajos verticales en su paramento interior (f) (diciembre 2014).

### 2.3.3 Análisis estadístico y representación gráfica

La fase de elaboración, representación y análisis de datos obtenidos se ha realizado con Microsoft Excel 2010 y el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 27 para Windows, con licencia de la Universidad de Santiago de Compostela.

#### 2.3.3.1 Elaboración de datos

La variable analizada de cobertura media de la vegetación, así como la transformación que se ha aplicado para su posterior análisis se describen a continuación:

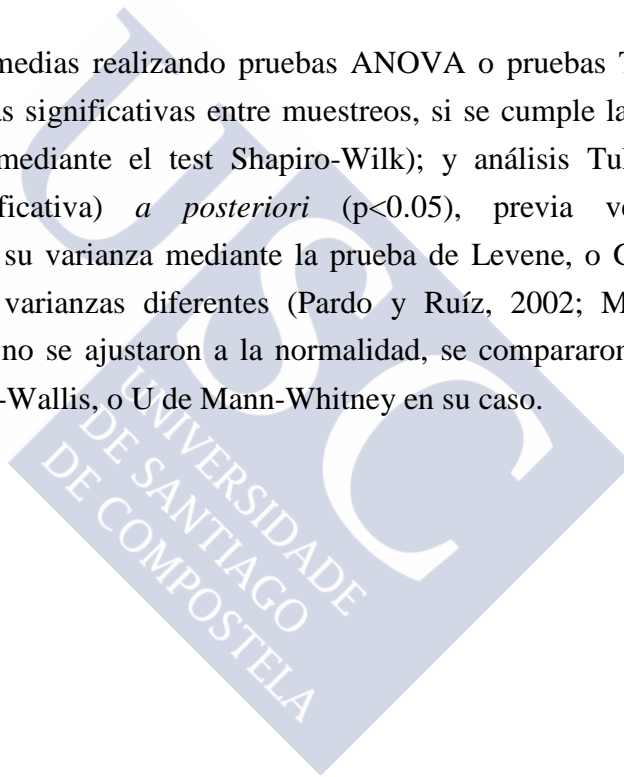
- **Cobertura de la vegetación**
  - Porcentaje de cobertura media (*Parietaria judaica* y global). Se calculó el porcentaje de cobertura media (desglose por especies) para cada una de las partes estructurales en las que se ha dividido el cubo/lienzo (balcón, parte alta, parte media y banqueta), para los inventarios realizados periódicamente.
- **Datos transformados.** Para el análisis de los datos se ha considerado necesario realizar también una transformación de los valores obtenidos para esta variable, aplicando la transformación habitualmente utilizada en cada caso (Montgomery, 2017).
  - Porcentaje de cobertura media. Se calculó el valor de los porcentajes de cobertura en cada uno de los inventarios como “ $\arcsin(\sqrt{p})$ ”, donde: arcsin: arcoseno de la función; p: valor de cobertura en tanto por uno.

#### 2.3.3.2 Análisis y representaciones

El estudio de la cobertura se ha realizado en tres campos de análisis:

- Representaciones gráficas mediante

- Diagramas de barras apilados, representando la distribución por especies en la cobertura media, por meses de muestreo y para las diferentes partes en las que se dividieron las paredes de la muralla para realizar los inventarios (balcón, parte alta, parte media y banqueta) y para el paramento exterior e interior, mostrando la dinámica de la cobertura de la vegetación (evaluación preliminar -previa a la aplicación del tratamiento-, evaluación de la eficacia y recuperación de la vegetación).
- Estudio de la distribución y dispersión de los datos mediante estadísticos descriptivos básicos y representaciones gráficas.
- Comparación de medias realizando pruebas ANOVA o pruebas T, en su caso, para detectar diferencias significativas entre muestreos, si se cumple la normalidad de los datos (analizada mediante el test Shapiro-Wilk); y análisis Tukey/DMS (Mínima Diferencia Significativa) *a posteriori* ( $p < 0.05$ ), previa verificación de la homogeneidad de su varianza mediante la prueba de Levene, o Games Howell para una asunción de varianzas diferentes (Pardo y Ruíz, 2002; Montgomery, 2017). Cuando los datos no se ajustaron a la normalidad, se compararon las medias con la prueba de Kruskal-Wallis, o U de Mann-Whitney en su caso.



## 2.4 RESULTADOS

### 2.4.1 Tratamiento general

#### 2.4.1.1 Paramento exterior de la muralla de Lugo

##### 2.4.1.1.1 Dos aplicaciones anuales

La evaluación de los cambios en la cobertura de la vegetación en el paramento exterior de la muralla se presenta en la Figura 2.5.

En el primer año (2012), esta cobertura resultó inicialmente baja en el balcón (menos de un 10%), algo más elevada en la parte alta y media (algo menos del 25% y 15% respectivamente), y también baja en la banqueta (menos del 10%).

Concretamente, en el balcón se observó una cobertura total próxima al 7% en el mes de junio, que se incrementó ligeramente en el siguiente mes, siendo la especie predominante *Cymbalaria muralis*, aunque fue *Parietaria judaica* la que experimentó un crecimiento porcentual mayor en ese periodo (Figura 2.5a).

En la parte alta del lienzo la cobertura fue mayor, un 20%, incrementándose también entre los meses de junio y julio; siendo *Parietaria judaica* la especie predominante (Figura 2.5b).

En la parte media del lienzo la cobertura resultó más baja que la anterior, con un 12%, incrementándose entre junio y julio (Figura 2.5c).

La cobertura en la banqueta 6%, fue la más baja, observándose también un incremento moderado en el mes de julio, presentando una cobertura similar *C. muralis* y *P. judaica* (Figura 2.5d)

Estos resultados confirmaron que la cobertura de la vegetación en la parte exterior de la muralla es desigual entre las diferentes partes analizadas, siendo la parte alta del lienzo la zona en la que las plantas alcanzan una mayor abundancia; tendencia que se observa en la práctica totalidad del monumento.

En el año 2013, tras el tratamiento general de primavera (abril), la cobertura media de la vegetación en la parte exterior de la muralla resultó baja durante los casi seis meses siguientes, alcanzando una media de un 10% o menos en cada una de las partes evaluadas, más baja en general, pero igualando casi en algunos casos la cobertura máxima evaluada antes de la aplicación, por lo que el resultado del tratamiento en las diferentes partes de la muralla pudo considerarse bastante satisfactorio o satisfactorio. En cuanto a la contribución específica a dicha cobertura, destacó nuevamente la de *P. judaica*, tanto en el balcón, como en la parte alta y media del lienzo, seguida de *C. muralis*.

Tras el tratamiento de otoño (octubre-noviembre) la cobertura media se situó inicialmente (primeros dos meses) por debajo del 5% en cada una de las partes, la contribución a esta cobertura fue prácticamente atribuible en su totalidad a *P. judaica*.

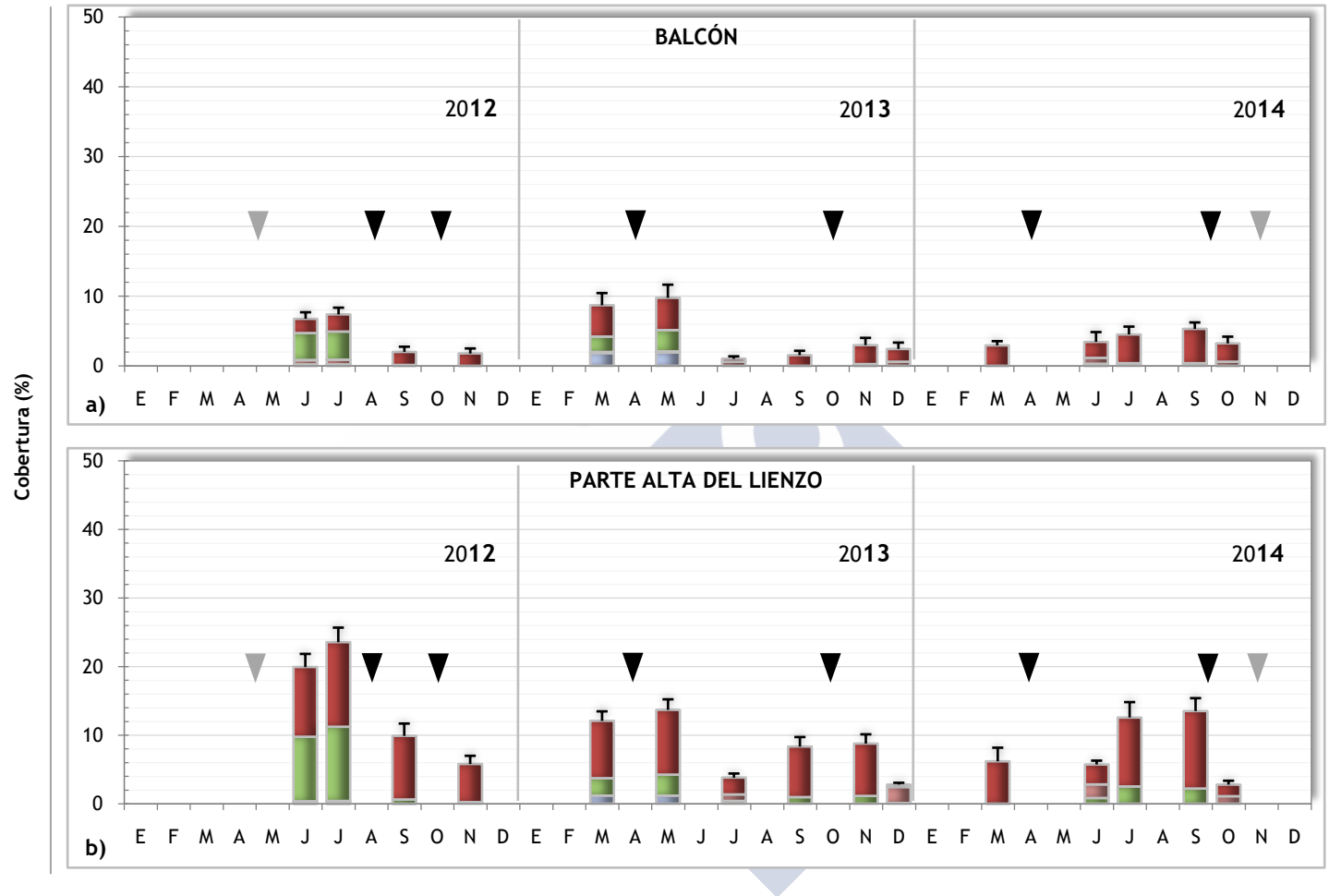
Analizando esta recuperación de la vegetación en las diferentes partes de la muralla, en la parte exterior, en el balcón se observó una elevada eficacia de ambos tratamientos, dada la reducción de la cobertura hasta valores muy bajos (2%), al final de año.

En la parte alta del lienzo también se observó una elevada eficacia, que afectó con carácter general a todas las especies, y en menor medida a *P. judaica*, cuya cobertura no se redujo totalmente tras el primer tratamiento, de modo que en el balance reducción-recuperación no se llegó a observar una desaparición total de la misma, lo que se apreció notoriamente en su importante recuperación a los seis meses, en los que casi igualó su nivel de cobertura inicial en el primer tratamiento.

Algo similar ocurrió en la parte media del lienzo, en la que se observó que nuevamente *P. judaica* en el entorno de los seis meses recuperó los niveles de cobertura inicial, tras el primer tratamiento. Esta especie se mantiene en valores muy bajos (2%) transcurridos dos meses tras el segundo tratamiento general, al final del periodo analizado.

En la banqueta los niveles iniciales de cobertura ya fueron bajos y se mantuvieron así casi seis meses, con una recuperación muy escasa de *P. judaica* y una nueva reducción tras el tratamiento de otoño.

Por lo tanto, en la parte exterior la especie que se recuperó más rápidamente es *P. judaica*, lo que resultó muy evidente sobre todo en la parte alta y media del lienzo.



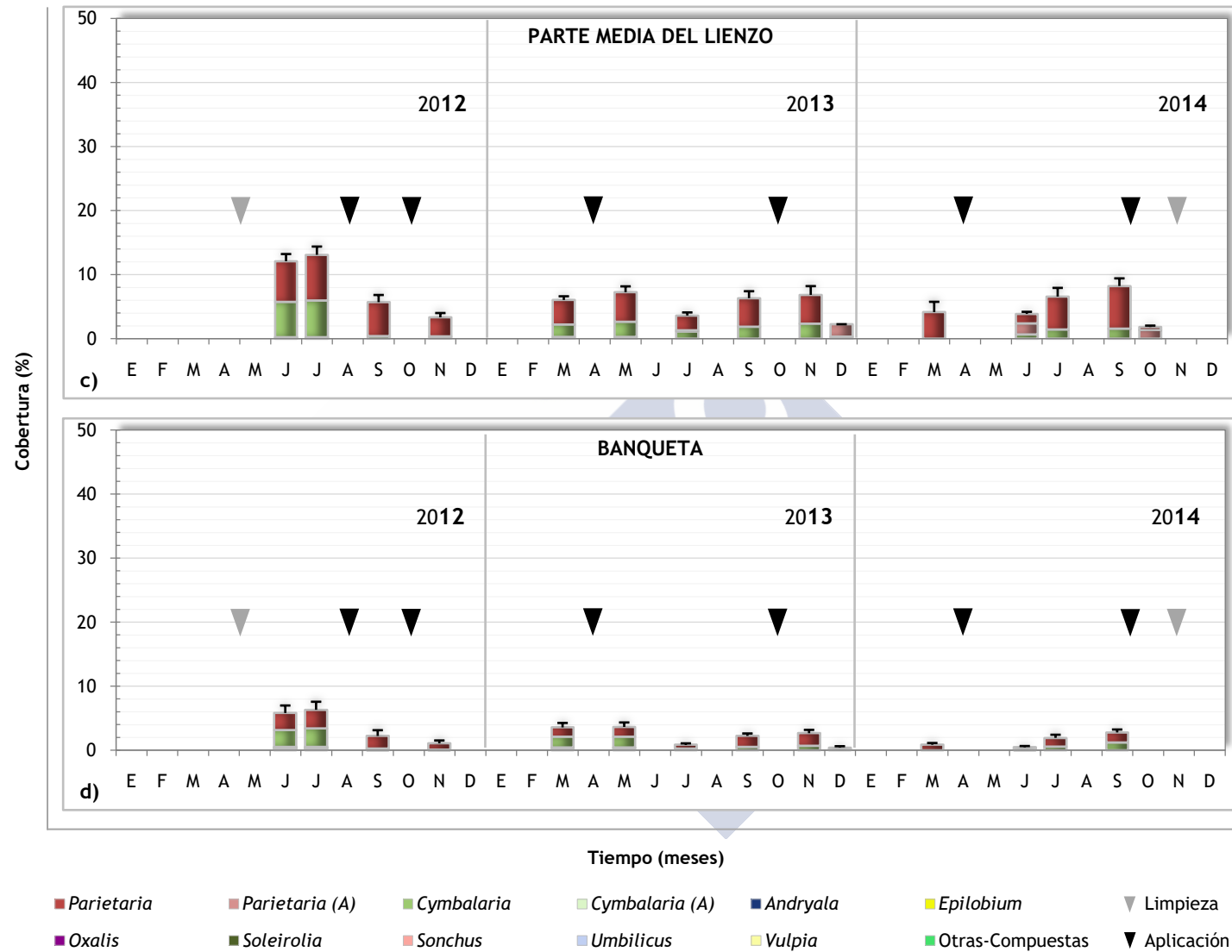


Figura 2.5 Cobertura media (%) de la vegetación y error estándar para la cobertura de *Parietaria*, en el balcón (a), parte alta del lienzo (b), parte media del lienzo (c) y banqueta (d), en los años 2012, 2013 y 2014, en el paramento exterior de la muralla. (Colores más suaves dentro de la misma gama indican afectación de la vegetación (A)).

En el año 2014, tras el tratamiento general de primavera (abril), la cobertura media de la vegetación en la parte exterior de la muralla resultó baja durante los casi seis meses siguientes, alcanzando nuevamente una media de un 10% o menos en cada una de las partes analizadas, más baja en general pero igualando casi en algunos casos la cobertura máxima evaluada previamente a la aplicación, por lo que nuevamente el resultado del tratamiento en las diferentes partes de la muralla pudo considerarse bastante satisfactorio o satisfactorio. En cuanto a la contribución específica de dicha cobertura, destacó nuevamente *Parietaria*, tanto en el balcón, como en la parte alta y media del lienzo, seguida de *Cymbalaria*. Tras el tratamiento de otoño (septiembre-octubre) la cobertura media se situó inicialmente (primeros dos meses) por debajo del 5% en cada una de las partes, con *P. judaica* como principal especie.

Analizando esta recuperación de la vegetación en las diferentes partes de la muralla, en su paramento exterior, en el balcón se observó una elevada eficacia de ambos tratamientos, dada la reducción de la cobertura hasta valores muy bajos (2%), a final de año.

En la parte alta del lienzo también se observó una elevada eficacia que afectó con carácter general a todas las especies, y en menor medida a *Parietaria*, cuya cobertura nuevamente no sufrió una reducción total tras el primer tratamiento, de modo que en el balance reducción-recuperación no llegó a observarse una desaparición total de la misma, lo que se apreció notablemente en su rápida recuperación a los casi seis meses, en los que alcanzó su nivel de cobertura inicial en el primer tratamiento.

Algo similar ocurrió en la parte media del lienzo, en la que se observó que nuevamente esta especie en el entorno de los seis meses recuperó los niveles de cobertura inicial, tras el primer tratamiento. Esta especie se mantuvo en niveles muy bajos (1%) transcurridos dos meses del segundo tratamiento general, al final del periodo evaluado.

En la banqueta los niveles iniciales de cobertura ya resultaron bajos y se mantuvieron así casi seis meses, con una recuperación muy escasa de la dominante y una nueva reducción después del tratamiento de otoño.

Por lo tanto, en la parte exterior la especie que se recuperó con más rapidez fue nuevamente *P. judaica*, lo que resultó muy evidente sobre todo en la parte alta y media del lienzo. Estos resultados confirman que la cobertura de la vegetación en el paramento exterior de la muralla

se mantiene desigual entre las diferentes partes analizadas, siendo la parte alta y media del lienzo las zonas en las que las plantas alcanzan una mayor abundancia, lo que se observa en la práctica totalidad del monumento.

Además, aunque resulta difícil de evaluar a simple vista, se ha comprobado que a la recuperación de *P. judaica* contribuyen, tanto el rebrote de plantas poco afectadas por el tratamiento, como la germinación y el crecimiento de nuevas plántulas, en los muestreos realizados posteriormente (campaña invierno/primavera 2016/2017) (Tabla 2.1). En esta especie el crecimiento de nuevas plantas puede igualar o incluso superar la cobertura detectada antes de cada tratamiento.

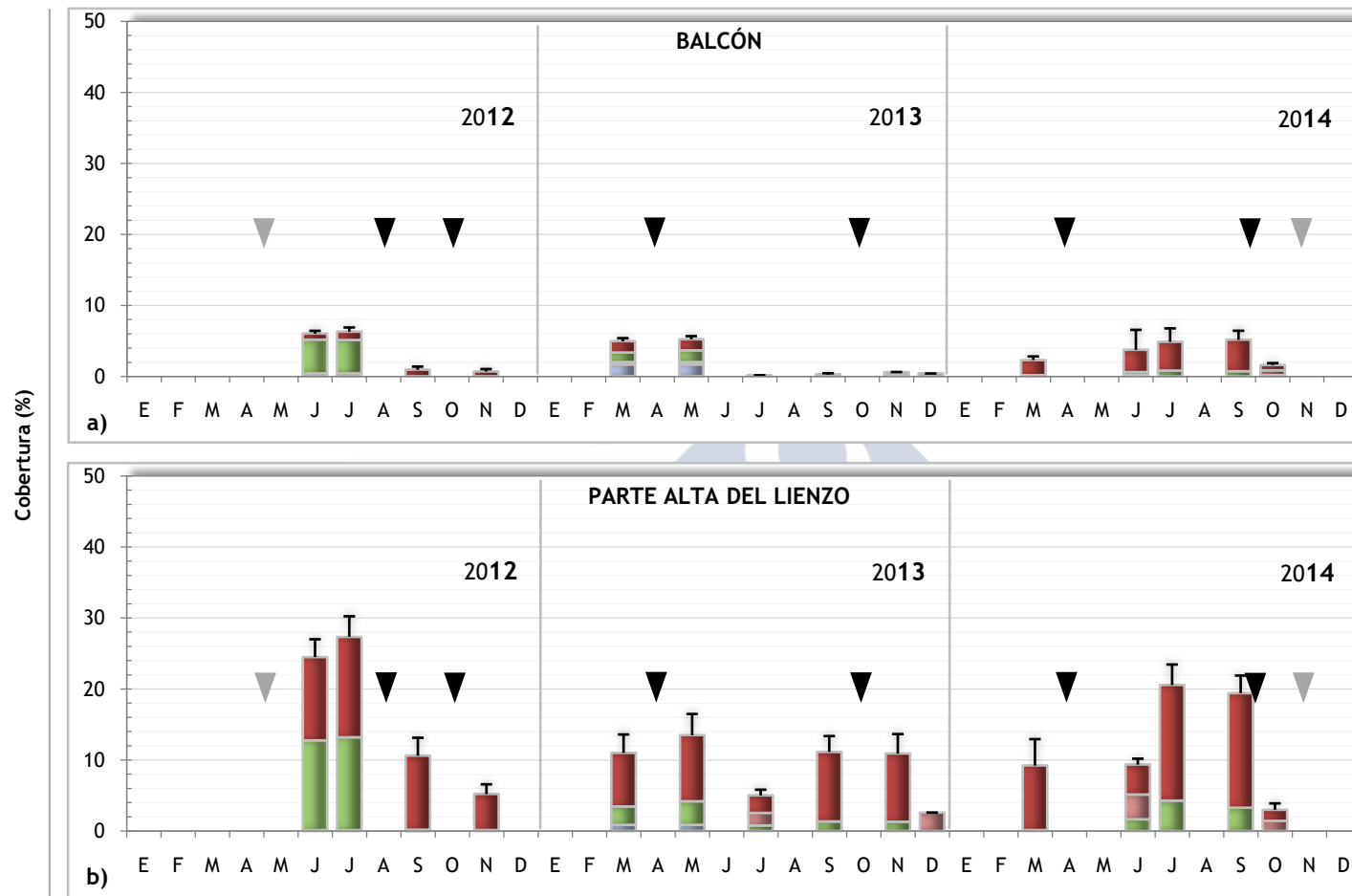
**Tabla 2.1** Cobertura media de la vegetación (%) en el balcón, parte alta del lienzo, parte media del lienzo y banqueta, evaluada en la campaña de aplicación del tratamiento fitosanitario correspondiente a invierno/primavera en dos anualidades consecutivas (2016/2017), previa al tratamiento (ATf) y transcurrido el primer mes desde su aplicación (PTf). C: cobertura (verde), CS: cobertura seca, CA: cobertura afectada, CV: cobertura verde, CVp: cobertura verde nuevas plántulas.

	CAMPAÑA INVIERNO/PRIMAVERA 2016				
	C(ATf)	CS(PTf)	CA(PTf)	CV(PTf)	CVp(PTf)
<b>Balcón</b>	4.40	0.40	3.00	2.00	5.80
<b>Parte Alta del Lienzo</b>	7.10	2.10	2.50	2.00	9.80
<b>Parte Media del Lienzo</b>	4.80	4.20	0.82	0.00	4.60
<b>Banqueta</b>	2.50	1.00	0.00	0.00	1.30
	CAMPAÑA INVIERNO/PRIMAVERA 2017				
	C(ATf)	CS(PTf)	CA(PTf)	CV(PTf)	CVp(PTf)
<b>Balcón</b>	2.21	0.42	0.37	1.42	2.76
<b>Parte Alta del Lienzo</b>	7.63	2.89	2.39	2.34	4.42
<b>Parte Media del Lienzo</b>	3.50	1.26	1.42	0.76	1.61
<b>Banqueta</b>	0.74	0.05	0.37	0.32	0.89

Valores medios de los inventarios realizados en los lienzos/cubos tratados en cada campaña. CVp corresponde al valor medio de la cobertura de nuevas plántulas de *Parietaria judaica*.

#### 2.4.1.1.2 Dos aplicaciones anuales: orientación

La comparación de los cambios en la cobertura de la vegetación, en la parte exterior de la muralla, entre inventarios de orientación norte y sur se presenta en la Figura 2.6 y Figura 2.7, respectivamente, tanto para la cobertura global como la específica de *P. judaica*.



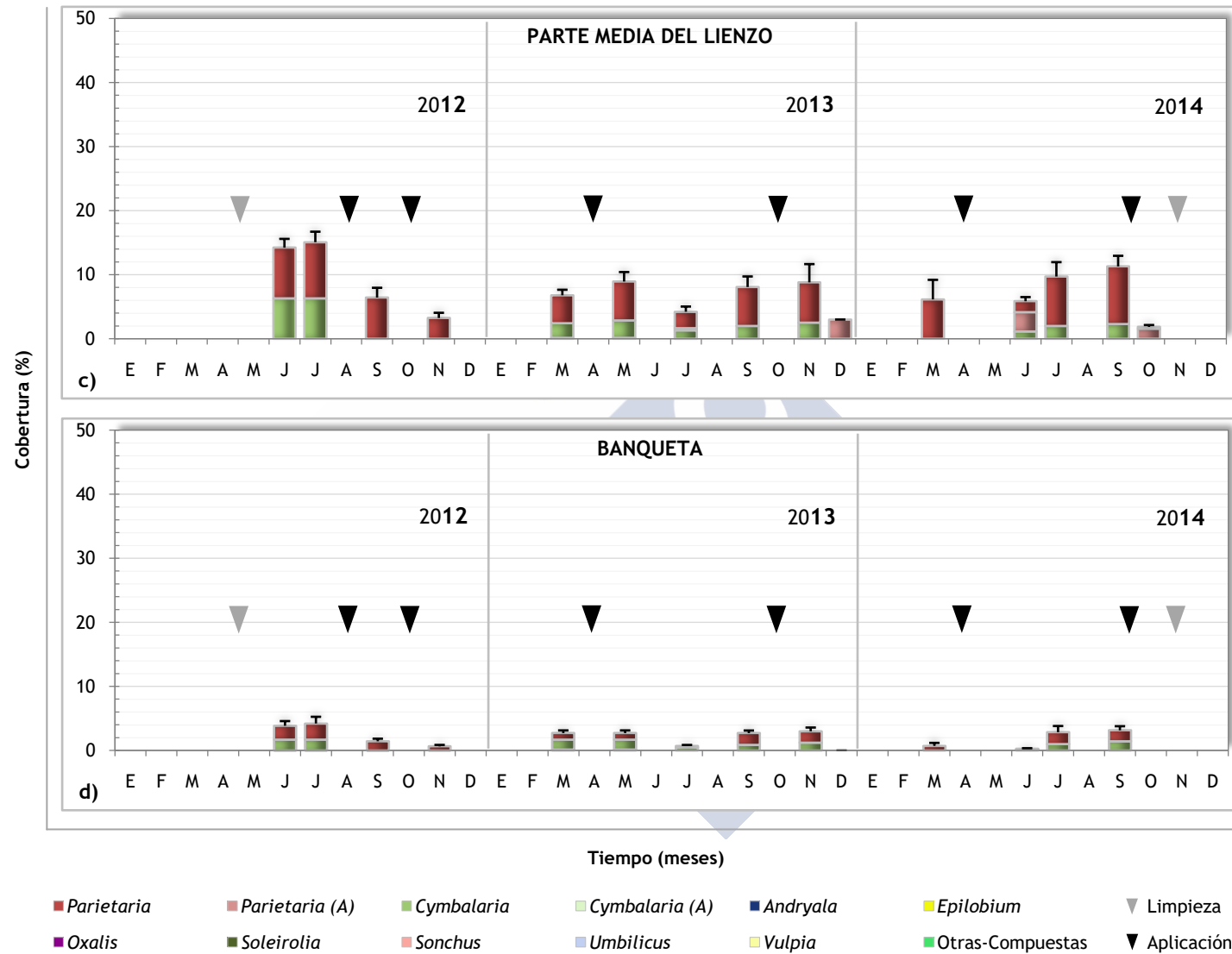
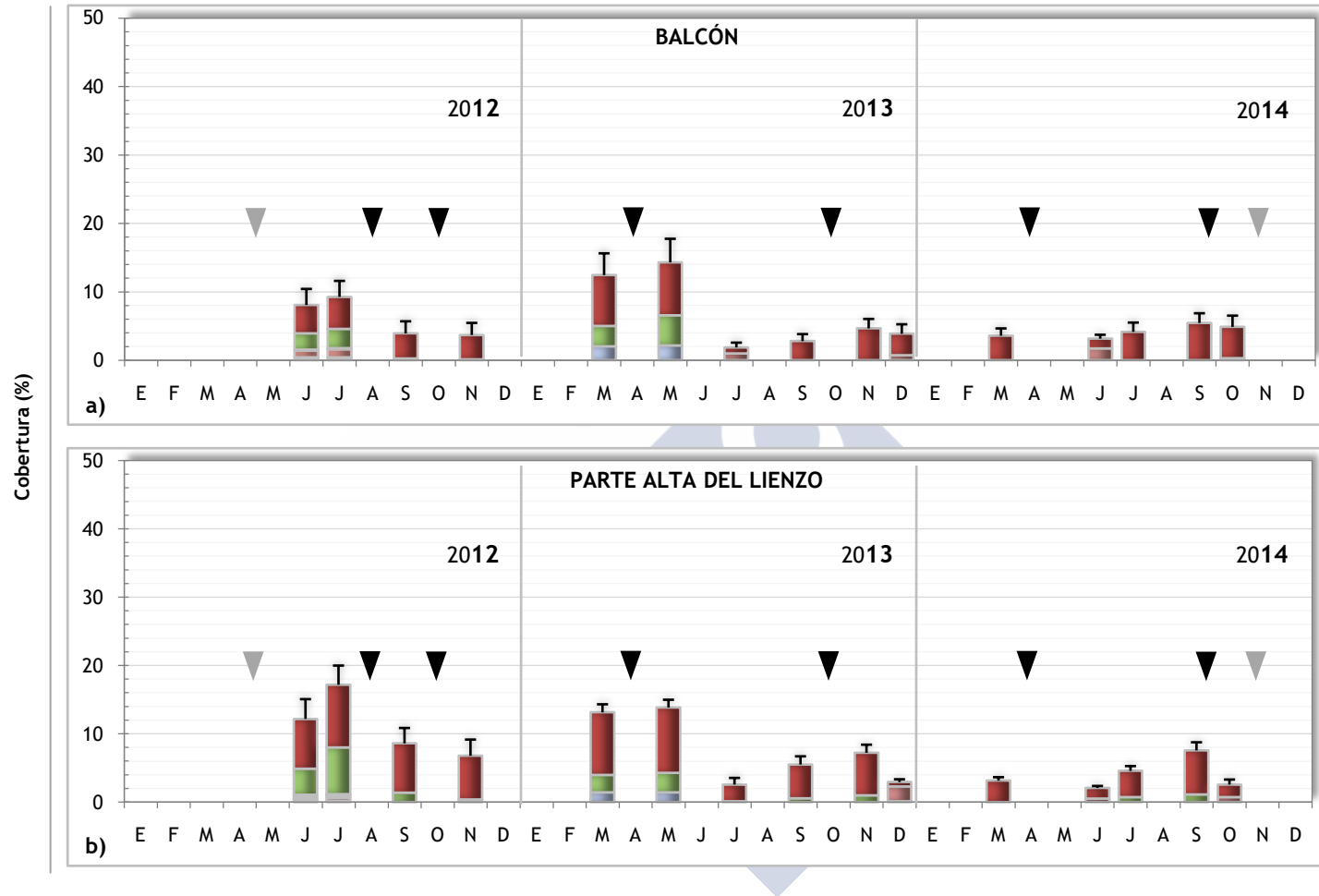


Figura 2.6 Cobertura media (%) de la vegetación y error estándar para la cobertura de *Parietaria*, en el balcón (a), parte alta del lienzo (b), parte media del lienzo (c) y banqueta (d), en los años 2012, 2013 y 2014, en el paramento exterior de la muralla con orientación norte. (Colores más suaves dentro de la misma gama indican afectación de la vegetación (A)).



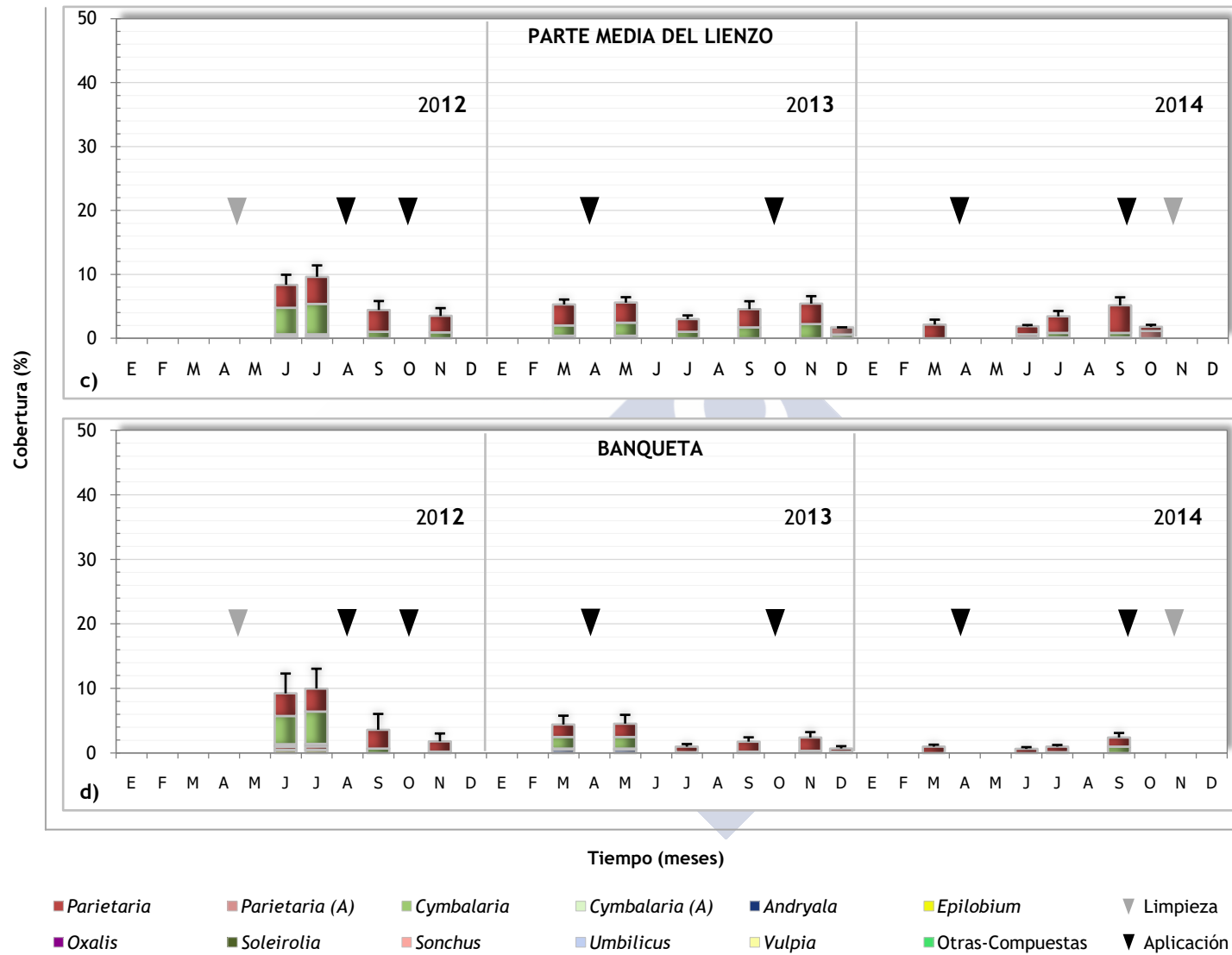


Figura 2.7 Cobertura media (%) de la vegetación y error estándar para la cobertura de *Parietaria*, en el balcón (a), parte alta del lienzo (b), parte media del lienzo (c) y banqueta (d), en los años 2012, 2013 y 2014, en el paramento exterior de la muralla con orientación sur. (Colores más suaves dentro de la misma gama indican afectación de la vegetación (A)).

En el periodo analizado, los inventarios orientados hacia el norte presentaron en general valores máximos, tanto de cobertura global como específica (*Parietaria*), más elevados que los de orientación sur; no obstante, estas diferencias no siempre resultaron significativas.

En el primer año (2012), no se observaron diferencias para la cobertura global antes de la aplicación entre inventarios con orientación norte y sur, para ninguna de las partes inventariadas (balcón, parte alta y media del lienzo, y banqueta), y tampoco se observaron para la cobertura específica.

En el segundo año (2013), tampoco se observaron diferencias, a excepción del balcón para la cobertura global muestreada previamente (mayo) antes de la aplicación de primavera, más elevada en el sur (14%) (Figura 2.7a), y especialmente baja en el norte (5%) (Figura 2.6a); y la cobertura específica no mostró diferencias para este año.

En el último año (2014), se observaron diferencias de cobertura global y específica previa a la aplicación de otoño (septiembre-octubre) únicamente en la parte alta del lienzo; en este caso la cobertura global observada en la parte norte (19%) (Figura 2.6b) fue superior a la alcanzada en la zona sur (8%) (Figura 2.7b), la diferente contribución de *Parietaria* fue de un 16% en el norte frente a un 6% en la zona sur.

### 2.4.1.1.3 Una aplicación anual

La aplicación selectiva de los tratamientos generales en el otoño del primer año (2012) y en la primavera del siguiente (2013), permitió realizar en un grupo más reducido de inventarios el seguimiento de la cobertura de la vegetación a lo largo de un año en el que únicamente se diseñó una campaña de aplicación.

#### **Otoño 2012-otoño 2013**

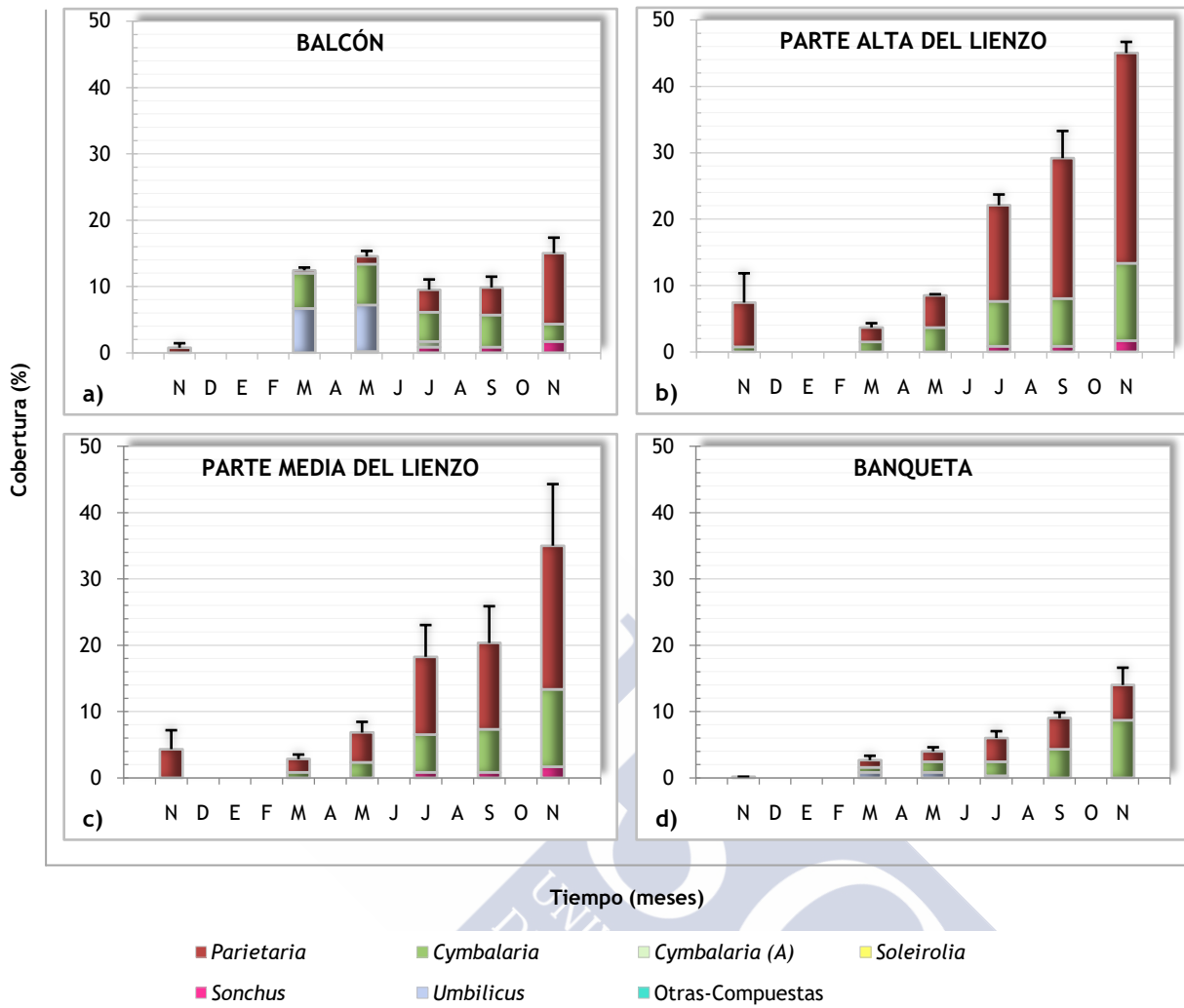
En el caso del seguimiento anual desde el otoño de 2012 al otoño de 2013 (Figura 2.8), la cobertura inicialmente presentó valores por debajo del 10% en todas las partes de la muralla, motivo por el que las zonas evaluadas no fueron incluidas en la campaña de tratamiento general de la siguiente primavera.

Con posterioridad, en los últimos meses, como resultado del crecimiento tanto de las plantas no tratadas como de las nuevas que se instalaron por germinación, especialmente de *P. judaica*, la cobertura alcanzó valores superiores al 30% en la parte alta y media del lienzo (Figura 2.8b,c), y algo superiores al 10% en el balcón y en la banqueta (Figura 2.8a,d), lo que repercutió en la apariencia de la muralla, que ofrecía a partir de la primavera un aspecto poco cuidado.

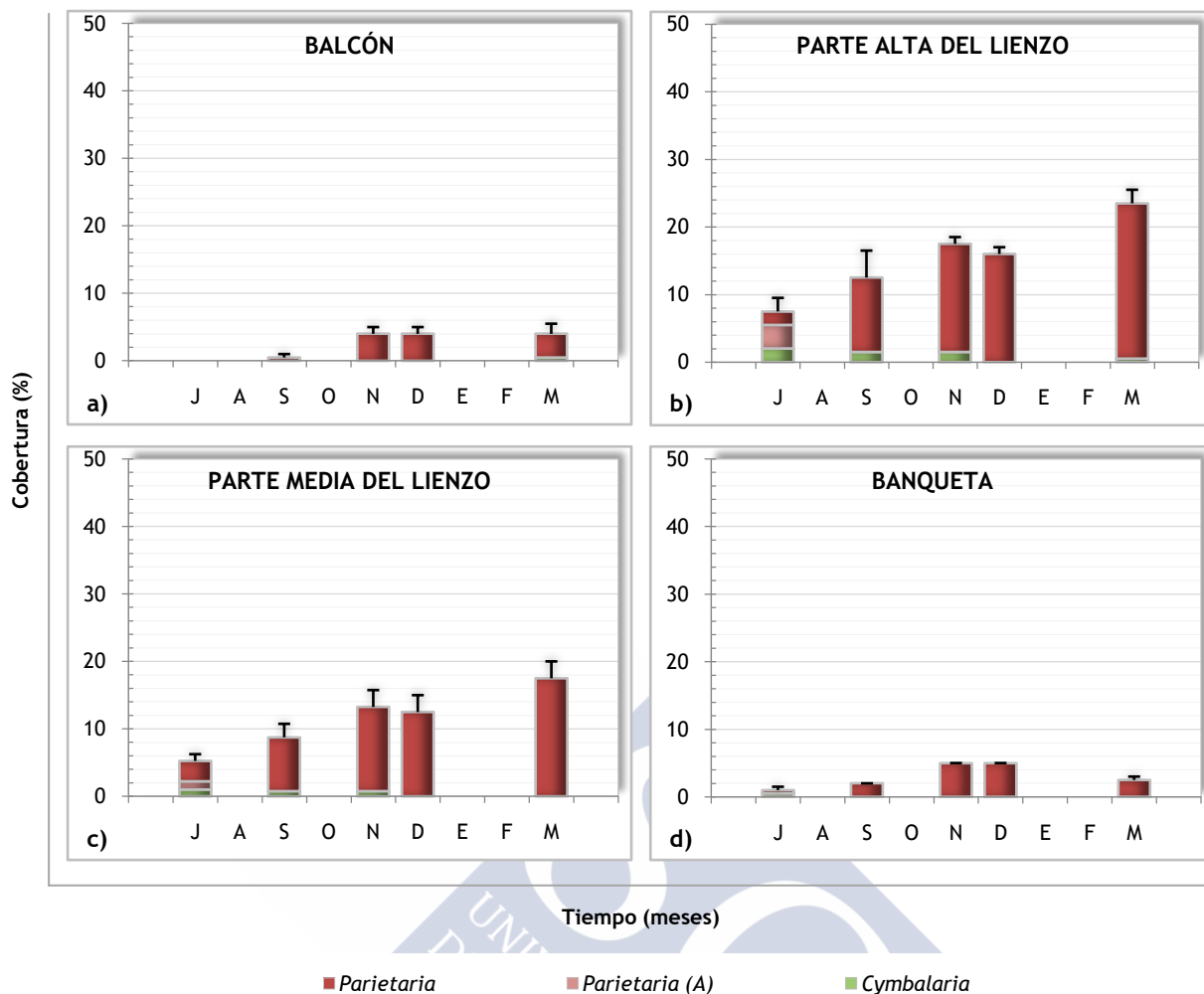
#### **Primavera 2013-Primavera 2014**

En el relación con el seguimiento anual desde la primavera de 2013 a la primavera de 2014 (Figura 2.9), de modo análogo, inicialmente la cobertura de la vegetación se mantuvo por debajo del 10% en todas las partes del monumento, lo cual le confirió un aspecto de limpieza, motivando que las zonas evaluadas fuesen excluidas de la campaña de tratamiento general del otoño siguiente.

El crecimiento posterior resultó comparativamente más lento, ya que las condiciones ambientales no resultaron tan favorables, próximo a un 20% de cobertura en la parte alta y media (Figura 2.9b,c), que se mantuvo por debajo del 10% en el balcón y en la banqueta (Figura 2.9a,d).



**Figura 2.8** Evolución de la cobertura media (%) de la vegetación y error estándar para la cobertura de *Parietaria*, en el balcón (a), parte alta del lienzo (b), parte media del lienzo (c) y banqueta (d), entre el otoño de 2012 y el otoño de 2013, en el paramento exterior de la muralla. (Colores más suaves dentro de la misma gama indican afectación de la vegetación (A)).

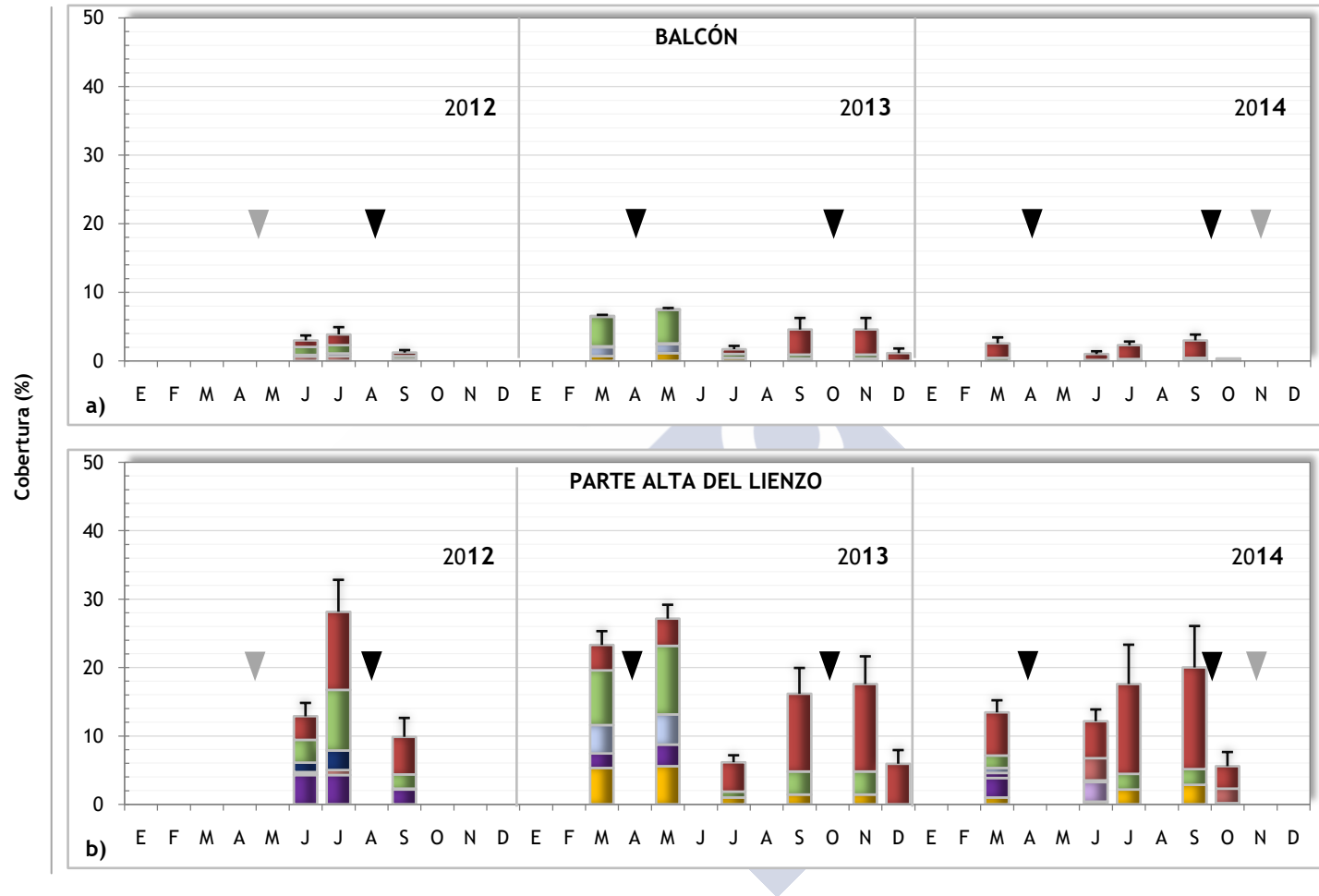


**Figura 2.9** Evolución de la cobertura media (%) de la vegetación y error estándar para la cobertura de *Parietaria*, en el balcón (a), parte alta del lienzo (b), parte media del lienzo (c) y banqueta (d), entre la primavera de 2013 y la primavera de 2014, en el paramento exterior de la muralla. (Colores más suaves dentro de la misma gama indican afectación de la vegetación (A)).

#### 2.4.1.2 Paramento interior de la muralla de Lugo

La evaluación de los cambios en la cobertura de la vegetación en el paramento interior de la muralla se presenta en la Figura 2.10.

Inicialmente, en el año 2012, esta cobertura resultó muy baja en el balcón (menos de un 5%), más elevada en la parte alta y media del lienzo (algo menos del 30% y poco más de un 10%, respectivamente) y también fue baja en la banqueta (5%) (Figura 2.10a,b,c,d).



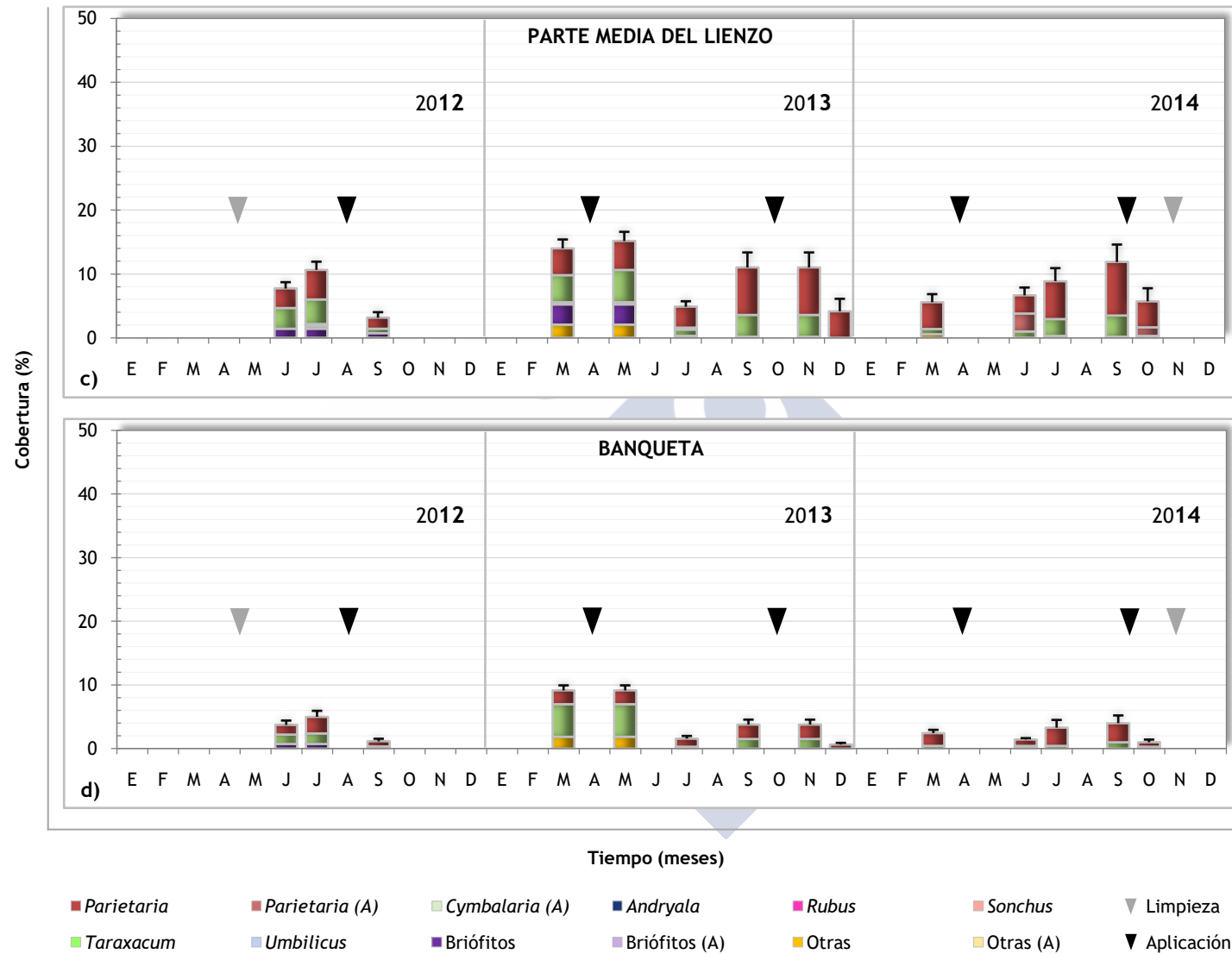


Figura 2.10 Cobertura media (%) de la vegetación y error estándar para la cobertura de *Parietaria*, en el balcón (a), parte alta del lienzo (b), parte media del lienzo (c) y banqueta (d), en los años 2012, 2013 y 2014, en el paramento interior de la muralla. Otras: Brasicáceas, Compuestas y Gramíneas. (Colores más suaves dentro de la misma gama indican afectación de la vegetación (A)).

La riqueza específica observada fue mayor que la del exterior, destacando la abundancia de musgo en algunas partes concretas; además *C. muralis* y *P. judaica* presentaron valores de cobertura similares en cada una de las partes estudiadas.

Al igual que lo observado en su paramento exterior, la cobertura de la vegetación en el interior resultó desigual dependiendo de la parte analizada, siendo la parte alta del lienzo la zona en la que las plantas alcanzaron una mayor abundancia, incluso algo superior a la encontrada en esa parte en el paramento exterior.

En el segundo año, 2013, en las paredes interiores del monumento, la cobertura media de la vegetación resultó nuevamente más elevada que en el exterior, alcanzando en casi todas sus partes niveles también comparativamente más elevados, tanto previamente como tras el tratamiento de primavera, cuyo resultado se pudo considerar bastante satisfactorio. La contribución específica estuvo más repartida, ya que este paramento presentó mayor riqueza específica, destacando nuevamente *P. judaica*. Tras el tratamiento de otoño la cobertura sufrió una reducción similar a la experimentada tras el primero, presentando también una cobertura mayor que la observada en su paramento exterior (principalmente en la parte alta y media del lienzo).

En el balcón, aunque la abundancia se mantuvo en niveles muy bajos, la eficacia inicial observada resultó media, debido, según nuestra observación personal, al balance reducción-recuperación en *C. muralis*, así como a la recuperación de *Parietaria*.

En la parte alta del lienzo se observó, para ambos tratamientos generales (primavera/otoño) una reducción elevada y una rápida recuperación, especialmente de *parietaria*.

En la parte media del lienzo la reducción también fue elevada y experimentó igualmente una rápida recuperación de la especie, si bien en menor medida que la parte alta.

En la banqueta la eficacia inicial fue alta y la recuperación lenta.

En el tercer año, 2014, en la pared interior de la muralla la cobertura media de la vegetación resultó nuevamente más elevada que en la exterior del monumento, especialmente en la parte alta; alcanzando niveles también comparativamente más elevados en su parte alta y media previamente a los tratamientos de primavera y otoño, cuyos resultados pudieron considerarse

bastante satisfactorios, ya que los niveles de cobertura observados tras las aplicaciones estacionales fueron muy bajos y similares a los de la parte exterior. La contribución específica estuvo más repartida ya que esta parte presentó una riqueza específica mayor, destacando la dominante *Parietaria*.

En el balcón la abundancia se mantuvo muy baja y se apreció nuevamente la rápida recuperación de *Parietaria*, por lo que la cobertura previa a ambas aplicaciones resultó similar.

En la parte alta del lienzo se observó también en ambos tratamientos una reducción elevada y una rápida recuperación, sobre todo de *Parietaria*.

En la parte media del lienzo la reducción de la cobertura también fue elevada y se experimentó igualmente una recuperación de *Parietaria* rápida, aunque en menor medida que la observada para la parte alta.

En la banqueta la eficacia inicial fue alta y la recuperación lenta.

Estos resultados, observados tanto en los paramentos exterior como interior de la muralla, confirman las tendencias observadas en el año anterior, indicando sobre la conveniencia de la realización de dos aplicaciones anuales ya que, tras el tratamiento general de control de la vegetación en la primavera con un resultado bastante satisfactorio o satisfactorio, dependiendo de la parte de la muralla considerada, la recuperación de la vegetación a corto plazo (casi seis meses) puede acercarse a los valores alcanzados previamente a aquél, lo que resulta de interés sobre todo en aquellas partes de mayor cobertura (parte alta y media del lienzo), tanto en el exterior como en el interior, que son determinantes para la evaluación del estado de limpieza del monumento.

Tras la ejecución de un segundo tratamiento general (otoño), consiguiendo una reducción de la cobertura similar, nuevamente la recuperación resultó muy rápida, si bien, debido a las condiciones meteorológicas del invierno, menos favorables para el crecimiento, los valores alcanzados al final fueron más bajos que los hallados previamente. Particularmente en los dos últimos años la realización de dos tratamientos fitosanitarios anuales permitió que la cobertura de la vegetación no superase el umbral del 10%, situación en la cual entendemos que el aspecto de la muralla resulta cuidado.

Por otra parte, en cuanto a la contribución específica, destaca la rápida recuperación de *P. judaica*, cuyo rápido rebrote junto con la germinación y establecimiento de nuevas plantas, contribuyen a su dominancia, especialmente en el paramento exterior.

Por lo tanto se deduce que la aplicación de un primer tratamiento general en primavera permite mantener la vegetación de la muralla con niveles de abundancia muy bajos durante cerca de medio año, con un buen aspecto del monumento. Para el mantenimiento de dichos niveles de abundancia y el efecto visual de limpieza se necesita la aplicación de un segundo tratamiento general en otoño, al menos mientras no se consiga reducir la abundancia de parietaria, cuyo rápido crecimiento resulta determinante para establecer la periodicidad de las aplicaciones.

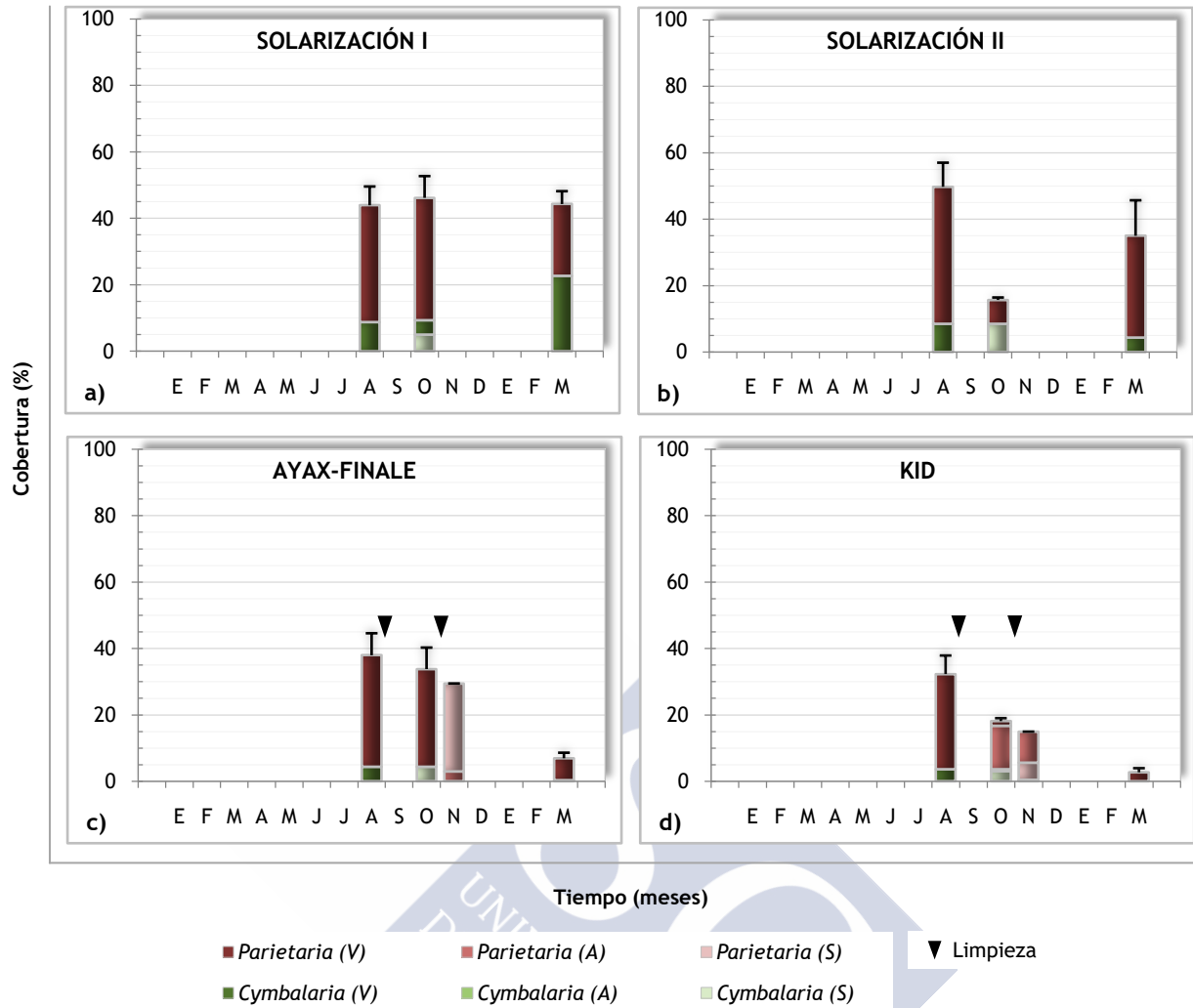
Teniendo en cuenta que *P. judaica* es la especie más abundante, sobre todo en la parte exterior, y con una capacidad de recuperación muy rápida, también se deduce que es preciso un seguimiento detallado tanto de su capacidad de germinación y establecimiento de nuevas plantas, como sobre el efecto (rebrote o mortalidad a nivel individual) de los tratamientos aplicados.

Nuestras observaciones a lo largo del periodo de estudio en pequeñas parcelas con muestreos puntuales, nos permiten afirmar que un alto porcentaje de individuos de *P. judaica* detectados en una fase muy inicial (plantas procedentes de semillas germinadas con dos cotiledones nada más) se incorporan a la cobertura global en 2-3 meses. Del mismo modo, un porcentaje superior al 50% de los individuos afectados por los tratamientos no consiguen rebrotar posteriormente.

De este modo se pone de manifiesto la conveniencia de la realización de estudios dirigidos al control de la germinación y establecimiento de nuevas plantas de esta especie.

#### **2.4.2 Ensayos particulares**

La evaluación de los nuevos ensayos realizados en la muralla en el año 2012 se presenta en la Figura 2.11.



**Figura 2.11** Cobertura media (%) de la vegetación y error estándar para la cobertura de *Parietaria*, en el lienzo de los ensayos particulares: tratamientos físicos (solarización I y solarización II) (a y b) y tratamientos químicos (Ayax-Finale y Kid) (c y d), para los meses de agosto (antes de la aplicación) y octubre-noviembre (tras la aplicación) en el año 2012, y marzo en el año 2013, en el paramento exterior de la muralla. (Colores más suaves dentro de la misma gama indican afectación de la vegetación, V: verde, A: afectada, S: seca).

El tratamiento de solarización I (plástico translúcido) no produjo una reducción o afectación apreciable de la cobertura de la vegetación Figura (2.11a). El efecto fue distinto para las diferentes especies, ya que no se observó una reducción importante de *P. judaica*, si bien en el caso de *C. muralis* un 50% de la inicial estaba seca.

El tratamiento de solarización II (plástico negro) afectó muy eficazmente a la vegetación resultando la reducción de *P. judaica* considerablemente elevada (mayor del 75%) y la de *C. muralis* total (2.11b).

En cuanto a los tratamientos químicos (de síntesis), la afectación de la vegetación resultó moderada y desigual, apreciándose inicialmente cambio de color e incluso pérdida de hojas (aspecto no evaluado), o plantas totalmente secas. En el caso de la mezcla Ajax-Finale, la reducción de *C. muralis* en dos meses fue total si bien *P. judaica* apenas sufrió reducción y ésta no resultó significativa en el mes de octubre (tras la primera aplicación), pero sí tras una segunda aplicación, con la cual la cobertura global también se redujo significativamente; además en este caso la afectación se apreció por un aspecto de vegetación seca total (2.11c).

En el caso del tratamiento con Kid, *Cymbalaria* también apareció seca en un elevado porcentaje, y *Parietaria* perdió aproximadamente la mitad de su cobertura. La reducción de la cobertura en este caso resultó significativa ya tras la primera aplicación, tanto en *P. judaica* como en la cobertura total. Tras el tratamiento complementario se mantuvo en buena parte una afectación mediante cambio de color o pérdida de hojas (2.11d).

En estos tratamientos experimentales, la afectación moderada de la vegetación tras una primera aplicación, como en el caso del tratamiento general, también pudo ser debida a la dificultad de ajustar con exactitud la dosis de caldo fitocida por unidad de superficie, lo que se detectó únicamente en la primera aplicación del primer año.

En el segundo año, tras la aplicación (en primavera) del producto experimental resultante de la mezcla Ajax-Finale, la cobertura de la vegetación resultó comparable a la evaluada antes de la aplicación, sin que se hubiese producido una disminución apreciable de la misma, por lo que el resultado fue poco satisfactorio (Figura 2.12); mientras que cuando se aplicó el Kid, con un resultado bastante satisfactorio, sí que se observó una importante reducción inicial, seguida de una recuperación de la cobertura a los casi seis meses, comparable a la evaluada previamente (Figura 2.13). En los dos ensayos destacó nuevamente el aporte de *P. judaica*. Cabe señalar en el segundo ensayo una eficacia parcial del tratamiento, que se manifestó en que una elevada proporción de plantas se mostraron afectadas, con decoloración y defoliación, pero no totalmente secas.

La eficacia de ambos tratamientos experimentales fue por tanto desigual, a pesar de que fueron aplicados siguiendo la misma metodología del tratamiento general; entre ellos el Kid es el que produjo sin duda los mejores resultados, presentando además unos niveles de recuperación comparables a los alcanzados con el tratamiento general.

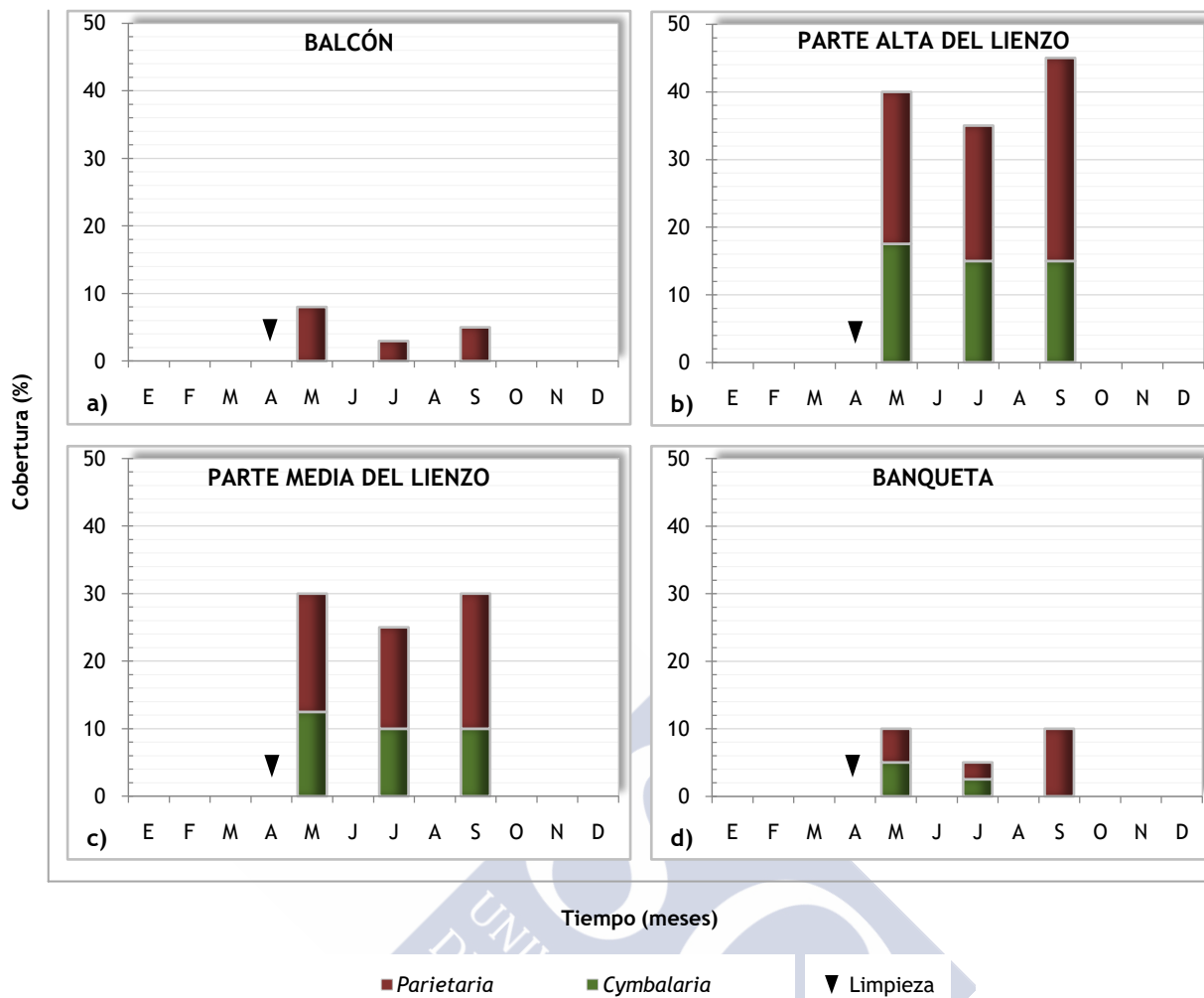
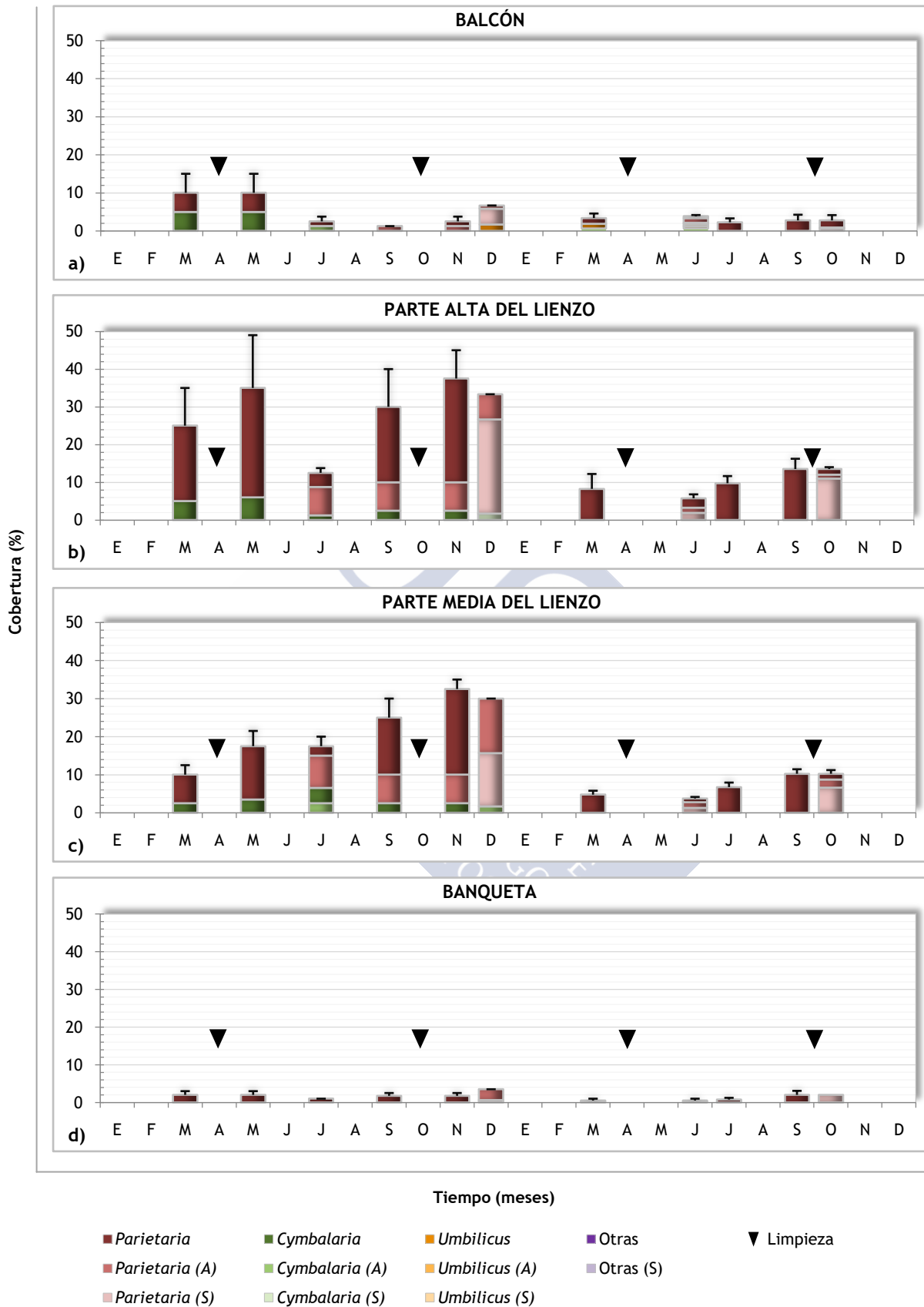


Figura 2.12 Cobertura media (%) de la vegetación y error estándar para la cobertura de *Parietaria*, en el balcón (a), parte alta del lienzo (b), parte media del lienzo (c) y banqueta (d), para los meses de mayo, julio y septiembre (tras la aplicación del tratamiento químico Ajax-Finale) en el año 2013, en el paramento exterior de la muralla.

En el caso del Kid la afectación observada en la vegetación fue más baja que la observada para los primeros ensayos de este producto en el año anterior y, como la concentración de producto ensayado no cambió en este año, las diferencias observadas pudieron ser atribuibles a la técnica de aplicación, en el año 2012 perpendicular a las paredes de la muralla y en 2013 paralela a las mismas (desde arriba hacia abajo).

Tras la aplicación de otoño con el Kid se volvió a apreciar una importante reducción inicial, sin observarse al mes de la aplicación fracción verde de *Parietaria*, mostrándose seca o afectada en su totalidad. Estos resultados motivaron que en el tercer año (2014), se aconsejase continuar únicamente con la aplicación del Kid de modo más extensivo.

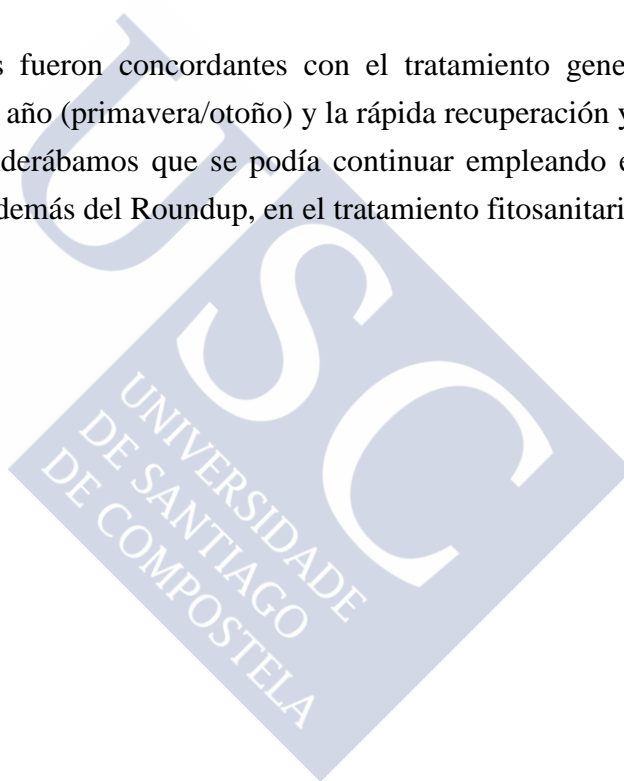


**Figura 2.13** Cobertura media (%) de la vegetación y error estándar para la cobertura de *Parietaria*, en el balcón (a), parte alta del lienzo (b), parte media del lienzo (c) y banqueta (d) (tras la aplicación del tratamiento químico Kid) en los años 2013 y 2014, en el paramento exterior de la muralla. Otras: Brassicáceas. (Colores más suaves dentro de la misma gama indican afectación de la vegetación, V: verde, A: afectada, S: seca).

En este último año (2014) los resultados obtenidos fueron muy satisfactorios, similares a los obtenidos con el tratamiento general, puesto que la reducción de la cobertura de la vegetación fue muy elevada, de modo que tras la recuperación se mantuvo próxima al 10% (parte alta y media del lienzo) (Figura 2.13b,c), o incluso más baja (balcón y banqueta) (Figura 2.13a,d).

Estos resultados confirmaban la idoneidad del Kid para los tratamientos de control de la vegetación de la muralla, ya que es un producto que presenta una baja concentración del principio activo (glifosato), por lo que puede contribuir a una técnica de control ambientalmente más sostenible, aunque su presentación como polvo mojable puede conllevar problemas técnicos de aplicación, no detectados hasta el momento.

Además, estos resultados fueron concordantes con el tratamiento general en cuanto a la aplicación de dos veces al año (primavera/otoño) y la rápida recuperación y germinación de *P. judaica*, por lo que considerábamos que se podía continuar empleando el Kid con carácter extensivo en la muralla, además del Roundup, en el tratamiento fitosanitario general.



## 2.5 DISCUSIÓN

Los monumentos o restos arqueológicos relacionados con nuestra historia antigua frecuentemente son colonizados por plantas, frecuentemente de su entorno próximo, lo que justifica que su control forme parte de los planes integrales de conservación de los mismos. En este sentido, la presentación de la candidatura ante la UNESCO para la declaración de la muralla de Lugo como Patrimonio de la Humanidad impulsó la tarea de mejorar su aspecto realizando, entre otros trabajos, una limpieza de la flora adventicia colonizadora de sus paredes, cuyo crecimiento afecta a la conservación del monumento, puesto que sus raíces pueden contribuir a su deterioro mecánico y químico (Lisci *et al.*, 2003).

La técnica de construcción de la muralla, con un gran cuerpo interior “*opus caementicium*” constituido por mampostería y cascajos mezclados con cal y arena, localizado entre dos lienzos de pizarra tabular, sillares o mampostería de granito, formando un paredón, posiblemente enyesado por las dos caras (López de Rego, 2005; Alcorta Irastorza, 2008), facilita y posiblemente favorece el crecimiento de las plantas, cuyas semillas se acumulan y germinan entre los materiales que se depositan en los huecos, las pequeñas irregularidades y repisas de las paredes, creciendo e introduciendo sus raíces entre las rendijas hacia el gran cuerpo interior.

Los trabajos de control de la flora adventicia realizados hace casi dos décadas, tras la declaración del monumento como Patrimonio de la Humanidad, y que han tenido continuidad periódica en la década pasada, permitieron controlar de manera permanente la vegetación leñosa (Buján *et al.*, 1998), cuyas cepas llegaron a afectar de modo puntual la propia estabilidad de las paredes, y mantener reducida la cobertura de la vegetación herbácea, más difícil de controlar.

En efecto, el crecimiento de la flora adventicia en la muralla se produce limitado sobre todo por la disponibilidad de agua, lo que en sus paredes está condicionado por la precipitación, como ocurre en muchos monumentos y restos arqueológicos (Caneva *et al.*, 1992), pero además contribuye a ello la absorción y el escurrido de agua en el paseo o adarve. De este modo se comprende que, a medida que se producen las precipitaciones, la muralla se humedece externa e internamente, sobre todo en la parte alta de sus paramentos, facilitando así la germinación de las semillas y el crecimiento de las plantas arraigadas en ella.

La aplicación de los tratamientos de control integrados (fitosanitario combinado con siega o recorte manual) en la muralla reduce inicialmente la cobertura de la vegetación herbácea perenne, que resulta inicialmente afectada por el fitocida; de manera que muchas plantas se secan totalmente, mientras que una menor proporción rebrotan y crecen nuevamente. De esta forma, finalizada la limpieza o recorte manual, la muralla se presenta limpia, fisionómicamente sin vegetación, comenzando la recuperación transcurrido alrededor de un mes, creciendo rápidamente hasta el verano, alcanzando en algunas partes hasta un 20%, siendo las especies más abundantes *Cymbalaria muralis* y *Parietaria judaica*, sobre todo en su parte exterior (Figuras 2.5).

Pero además, a la recuperación de las poblaciones de las diferentes plantas que crecen en la muralla contribuye la germinación de las semillas y el crecimiento de nuevas plantas entre las rendijas del monumento, cuyo escaso desarrollo en el momento de la realización de los tratamientos de control facilita que no resulten afectadas por el mismo. Esta incorporación de nuevas plantas resulta difícil de evaluar cuantitativamente al realizar el seguimiento visual de la cobertura de la vegetación; no obstante hemos podido verificarlo en los primeros muestreos tras la aplicación del fitosanitario y la siega posterior, cuando las nuevas plántulas resultaron visibles, antes de que se iniciase el crecimiento por rebrote de las que ya estaban instaladas previamente (Tabla 2.1).

Por todo ello, en relación con la periodicidad y extensión de realización del tratamiento de control de la vegetación de la muralla, proponemos un protocolo de actuaciones con dos aplicaciones anuales. La primera aplicación anual del tratamiento de control de la vegetación de la muralla debe realizarse en la primavera, con una abundancia media o incluso baja de la misma, evitando así la ineficacia que de modo puntual se produce cuando las plantas muy crecidas protegen total o parcialmente a otras (efecto en el que también influye el procedimiento de aplicación); pero sobre todo para procurar no interferir con los periodos de estancia de los vencejos en la muralla, siguiendo así la instrucción de la Consellería do Medio Rural sobre la “afección á avifauna do plan de mantemento da muralla romana de Lugo 2011-2014” (Ref.: MR110260/bmm). Tras esta primera aplicación cabe esperar que en un periodo próximo a medio año la abundancia de la vegetación se mantendrá por debajo de la inicial, de partida; por lo que, para garantizar un nivel bajo o muy bajo de la misma, transcurrido dicho periodo, se necesitaría una segunda aplicación anual, en otoño, para no superar el nivel inicial, por lo menos mientras no se consiga reducir la abundancia de *Parietaria*, cuyo rápido crecimiento resulta determinante para establecer la periodicidad de las aplicaciones.

Teniendo en cuenta que *P. judaica* es la especie más abundante en la muralla, sobre todo en la parte exterior, y con una capacidad de recuperación muy rápida, se deduce que es preciso un seguimiento detallado de la misma, especialmente de su capacidad de germinación y establecimiento de nuevas plantas, con el objetivo de conocer si se puede mejorar su control.

El fitocida utilizado en este periodo, glifosato (Roundup Plus/Roundup Ultra Plus Monsanto), está incluido bajo formulación, en el vigente Registro de Productos Fitosanitarios del actual Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y autorizada para uso urbano, como parques y jardines, así como en la Directiva propia de la Unión Europea (Directiva Europea 414/91/EEC) considerando que su empleo no es, en las condiciones normales de uso, genotóxico, ni cancerígeno, ni mutagénico. Desde su introducción comercial en la década de los setenta se ha convertido en el herbicida dominante en todo el mundo (Baylis, 2000; Duke y Powles, 2008), a lo que también ha contribuido su paso a compuesto genérico que ha reducido su coste, así como la introducción de cultivos transgénicos resistentes al mismo. Sin embargo, como señalan los autores anteriormente mencionados, su uso, desde el punto de vista agronómico, se está cuestionando, debido a la evolución de plantas arvenses resistentes al glifosato (Powles, 2008). Todos estos aspectos agronómicos relacionados con la utilización del glifosato, junto con los efectos sobre el medio ambiente, especialmente el subsuelo (Juhler *et al.*, 2001) y la salud humana, han contribuido a la no aceptación/su descrédito social de este producto, de modo que, a pesar de que el año pasado la Unión Europea ha renovado por cinco años más su licencia, países como Italia han introducido serias restricciones a su utilización y en España ya son varias las ciudades en las que se ha prohibido su utilización en espacios públicos.

Por todo ello, ya desde el comienzo de nuestra colaboración técnica para el control de la flora adventicia de la muralla de Lugo, hemos tratado de evaluar otros métodos de control químicos y físicos, que al menos presentaran una concentración más baja de principio activo en composición, y que resultasen de mayor sostenibilidad ambiental y socialmente más aceptados (Papafotiu *et al.*, 2010), así como realizar una aproximación ecológica a dicho control (Mortensen *et al.*, 2000).

Para ello se han incorporado nuevos tratamientos químicos de síntesis, con los que las plantas resultan moderadamente afectadas, con decoloración y defoliación. Entre ellos con la mezcla Ajax-Finale, la cobertura de la vegetación resultó comparable a la evaluada antes de la aplicación, sin que se hubiese producido una disminución apreciable de la misma, por lo que el resultado fue poco satisfactorio; mientras que cuando se aplicó el Kid, con un resultado

bastante satisfactorio, sí que se observó una importante reducción inicial, seguida de una recuperación de la cobertura a los casi seis meses, comparable a la evaluada previamente; de modo que este último resultó propuesto para la continuidad de los tratamientos (Figura 2.13). Además, la solarización con plástico negro resultó muy eficaz (Figura 2.11), mostrando que este método puede ser utilizado puntualmente en el monumento, como método complementario en partes concretas en las que se observa una menor eficacia de los métodos generales aplicados en cada momento.



## 2.6 CONCLUSIONES

1. La cobertura de la vegetación en la muralla, especialmente en la parte exterior, se mantiene desigual entre las diferentes partes de su paramento analizadas, siendo la parte alta del lienzo la zona en la que las plantas alcanzan una mayor abundancia; lo que se observa de modo general en la práctica totalidad del monumento.

También difiere entre su parte exterior e interior, esta última más elevada y diversa, así como en relación con la orientación, más abundante en las zonas orientadas al norte. Esta heterogeneidad a su vez resulta afectada por la propia arquitectura del monumento y su absorción de la humedad.

2. *Parietaria judaica* L. es la planta más abundante, sobre todo en la parte exterior, manteniendo sus poblaciones tras los tratamientos de control, tanto por su capacidad de rebrote como por la abundante renovación con nuevas plántulas. El control integrado de la vegetación en general y de *P. judaica* en particular, permite establecer un ciclo de crecimiento de unos cuatro a seis meses, hasta recuperar la cobertura inicial, por lo que resulta conveniente la realización de dos actuaciones de control anuales.
3. En relación con la eficacia de nuevos métodos de control integrado que puedan ser incorporados, la solarización con plástico negro resultó muy eficaz, mostrando que este método puede ser utilizado puntualmente en el monumento, como método complementario a otras actuaciones de control; entre los nuevos tratamientos químicos ensayados el más efectivo resultó el Kid.







3

Control de la germinación y  
del crecimiento inicial de  
*Parietaria judaica* L.



### **3 Control de la germinación y del crecimiento inicial de *Parietaria judaica* L.**

#### **3.1 INTRODUCCIÓN**

Las actividades investigadoras en el campo de los herbicidas naturales que se presentan en este capítulo se han iniciado en el año 2012, atendiendo a la necesidad, planteada por parte de los gestores públicos, de desarrollar nuevas estrategias de intervención para el control de la vegetación que colonizaba las paredes de la Muralla Romana de Lugo (Patrimonio de la Humanidad, UNESCO 2000), contribuyendo así a la conservación del monumento. Fue en este año en el que, retomando colaboraciones anteriores, nuestro grupo de investigación inició su trabajo en el marco de un Plan de Mantenimiento de la Muralla Romana de Lugo, que persigue una gestión multidisciplinar del monumento, con un apartado específico de control de la flora vascular encargado a nuestro equipo.

Este control de la vegetación contemplaba inicialmente la continuidad en el diseño de campañas periódicas de tratamiento fitosanitario (herbicidas de síntesis química) de la vegetación instalada en sus paredes; si bien los condicionantes en la programación de estos trabajos (temporales y biológicos), así como los cambios normativos que limitan y previsiblemente prohibirán el uso de los herbicidas de síntesis en ciertos ámbitos de aplicación, como es el caso de parques y jardines públicos, nos llevó a explorar nuevas alternativas sustitutivas o complementarias de control, viables técnica, económica y ambientalmente y respetuosas con los materiales de construcción del monumento, contribuyendo a la sostenibilidad de las tareas de mantenimiento de la muralla.

El estudio de la cobertura de la vegetación de la muralla y su variación tras la aplicación de los tratamientos de control presentado en el capítulo anterior (Control de la flora de la Muralla Romana de Lugo), muestra que *Parietaria judaica* L. es la especie predominante, sobre todo en su parte exterior. Los tratamientos de control con productos químicos de síntesis reducen eficazmente su cobertura tras la aplicación, que se recupera gradualmente, tanto mediante el rebrote como la germinación de las semillas y el crecimiento de nuevas plantas, manteniendo así sus poblaciones en el monumento. El rebrote de parietaria se produce sobre todo en plantas protegidas en las grietas del monumento o incluso por otras plantas bien desarrolladas,

de modo que la nube del producto, aplicado desde la base del monumento hacia arriba, no las alcanza con facilidad.

En este mismo sentido, de la adecuación de los tratamientos de control a la biología reproductiva de los vencejos, se deriva la imposibilidad de su realización en plena primavera, cuando las plantas alcanzan un desarrollo suficiente, posponiéndolo para finales de verano, cuando ya han alcanzado su máximo crecimiento, han florecido y fructificado dispersando sus semillas; por todo ello resulta difícil mejorar la eficacia de los mismos sobre el crecimiento de parietaria. Se hace necesario averiguar si resulta posible reducir la cobertura de parietaria en la muralla limitando la germinación y el establecimiento de nuevas plantas, para lo que se precisa conocer tanto las condiciones para que se produzca, como su nivel y ritmo, como el producto/tratamiento más apropiado para conseguirlo.

Los compuestos alelopáticos 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).

Los aleloquímicos producidos por las plantas son liberados al medio ambiente por exudación de las raíces, lixiviación de las hojas o descomposición de restos de material vegetal incorporados al suelo. Cuando son liberados, por lo general, resulta una mezcla de muchos compuestos orgánicos que pueden ejercer efectos tóxicos de manera sinérgica (Kalinova, 2010).

Los aleloquímicos son una mezcla compleja, principalmente de terpenoides, en particular monoterpenos (C10) y sesquiterpenos (C15), y una variedad de compuestos aromáticos, óxidos, alcoholes, ésteres, aldehídos y cetonas, que determinan el característico aroma y olor de la planta que los produce. Posiblemente estos compuestos pueden producir más de un efecto sobre los procesos celulares responsables de la reducción del crecimiento de las plantas; sin embargo, los detalles del mecanismo bioquímico por el cual cada compuesto particular ejerce un efecto tóxico sobre el crecimiento de las plantas no son bien conocidos (Batish *et al.*, 2008).

Dichos compuestos son producidos por numerosas plantas aromáticas y medicinales, particularmente de la familia de las labiadas pero también de otras, a partir de las cuales se obtienen principalmente aceites esenciales e hidrolatos, y otros derivados.

Son numerosos los aceites esenciales estudiados como potenciales herbicidas, entre ellos el de *Hyssopus officinalis* L., *Lavandula angustifolia* Miller, *Majorana hortensis* L., *Melissa officinalis* L., *Ocimum basilicum* L., *Origanum vulgare* L., *Salvia officinalis* L. y *Thymus vulgaris* L., que han mostrado tener actividad inhibidora sobre la germinación de *Raphanus sativus* L. y *Lepidium sativum* L. (Arminante *et al.*, 2006).

Los aceites esenciales de *Carum carvi* L., *Mentha spicata* L., *Origanum onites* L., *Thymbra spicata* L. y sus dos principales componentes, timol y carvacrol, mostraron una actividad inhibitoria sobre la germinación de las semillas de arvenses estudiadas *in vitro* (Azirak y Karaman, 2008).

Aceites esenciales de diversas variedades de orégano (*Origanum* spp.) y albahaca (*Ocimum basilicum* L.) se han ensayado contra *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. y *Chenopodium album* L. (Vasilakoglu *et al.*, 2007). Estos aceites, compuestos principalmente de *p*-cimeno (20-25%), y terpineno (15-25%) y timol (10-35%), han sido patentados para el control de musgos (Dayan *et al.*, 2009).

El potencial herbicida del aceite de *Cistus ladanifer* L. fue ensayado *in vitro* frente a *Amaranthus hybridus* L., *Portulaca oleracea* L., *Chenopodium album* L., *Conyza canadensis* (L.) Cronq. y también *Parietaria judaica* L. Su actividad fue diferente según la especie sobre la que actuó, inhibiendo completamente la germinación de *Amaranthus hybridus*, efecto que también produjo el aceite esencial de *Eucalyptus camaldulensis* (Verdeguer *et al.*, 2009), y controlando casi totalmente la germinación de *Conyza canadensis* y *Parietaria judaica* a todas las concentraciones probadas sin diferencias entre ellas (Verdeguer *et al.*, 2012).

En esta misma línea se han estudiado los aceites esenciales de diferentes especies de salvia (Bisio *et al.*, 2010), eucalipto y romero (Ramezani *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2013), *Eucalyptus citriodora* Hook. (Setia *et al.*, 2007), *Thymus vulgaris* L. (Grosso *et al.*, 2010), *Thymus daenensis* Celak (Kashkooli y Saharkhiz, 2014), *Thymus fallax* Fish (Onaran *et al.*, 2014).

El efecto fitotóxico de los aceites esenciales, cuyos compuestos pueden encontrarse en bajas concentraciones 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 (Setia *et al.*, 2007; Ramezani *et al.*, 2008; Bisio *et al.*, 2010; Verdeguer *et al.*, 2012; Miranda *et al.*, 2015; Pinheiro *et al.*, 2015). Fisiológicamente dicho efecto se manifiesta en una reducción del contenido en clorofila, afectando al proceso fotosintético, y en la actividad respiratoria de las plántulas, así como al metabolismo energético (Singh *et al.*, 2004; Setia *et al.*, 2007). Puesto que actúan muy rápido y su actividad es limitada porque la mayoría se volatilizan rápidamente (Dayan *et al.*, 2009), cabe esperar un mayor efecto sobre las plantas con germinación rápida y concentrada, planteándose la posibilidad de que la proporción de semillas cuya germinación resulta inhibida por dicho efecto, variable según el tipo de producto y su concentración, puede recuperar su potencialidad germinativa cuando cesa su actividad.

Los hidrolatos son subproductos de los procesos de obtención de aceite esencial que pueden recuperarse al finalizar la destilación, una vez separada del aceite (Gawde *et al.*, 2009), pudiendo contener pequeñas cantidades de compuestos volátiles solubilizados que podrían mantener actividad fitotóxica, pudiendo resultar así un producto bioherbicida de bajo coste.

Es posible adquirir hidrolatos comerciales de una amplia gama de plantas de las que se obtienen aceites esenciales, incluso también ecológicos, lo que, junto con las razones de tipo económico, justifica el interés de su estudio para analizar su potencialidad como bioherbicidas.

Son escasos los estudios realizados sobre el efecto de hidrolatos sobre la germinación y el desarrollo inicial de plántulas, destacando en nuestro entorno los realizados por Valiño (2013), que muestran el potencial fitotóxico del hidrolato procedente de la obtención del aceite esencial de jara (*Cistus ladanifer* L.) sobre la germinación y el desarrollo inicial de malas hierbas.

Son más frecuentes los estudios realizados con extractos, Araniti *et al.* (2012) encontraron el efecto inhibitorio de la germinación de los extractos de 17 plantas sobre *Chenopodium album*, *Sinapis alba* y *Echinochloa crus-galli*, Ali *et al.* (2014) encontraron efecto reductor del extracto de *Thymus numidicus* sobre el crecimiento de plántulas de *Medicago sativa* y *Triticum aestivum*, Puig *et al.* (2018) encontraron efecto inhibitorio de preemergencia del *Eucalyptus globulus* sobre *Lactuca sativa* y *Agrostis stolonifera*.

Nuestra hipótesis es que, si alguno de los aceites, hidrolatos y extractos estudiados presenta actividad fitotóxica sobre la germinación de las semillas y/o el desarrollo inicial de las plántulas de dicha especie, se podría incorporar su utilización a los tratamientos de control de la vegetación de la muralla. Puesto que actúan muy rápido y su actividad es limitada en el tiempo porque la mayoría se volatilizan rápidamente (Dayan *et al.*, 2009), cabe esperar un mayor efecto sobre las plantas con germinación rápida y concentrada, planteándose la posibilidad de que la proporción de semillas cuya germinación resulta inhibida por dicho efecto, variable según el tipo de producto y su concentración, puedan recuperar su potencialidad germinativa cuando cesa su actividad, como puede ocurrir por efecto de la salinidad o el estrés hídrico sobre la germinación de las semillas (Guja *et al.* 2010), aspecto que no suele incluirse de manera complementaria en los ensayos de fitotoxicidad.

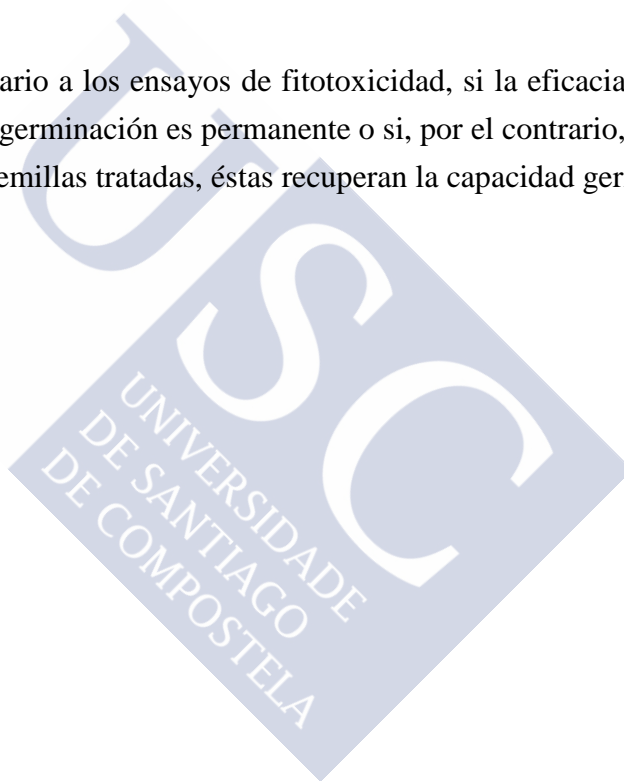


### 3.2 OBJETIVOS

Verificar la idoneidad de *Parietaria judaica* L. para realizar bioensayos de fitotoxicidad evaluando su potencialidad germinativa (nivel y ritmo de germinación de las semillas y emergencia de plántulas).

Evaluar *in vitro* la potencialidad fitotóxica de productos generados por nosotros (extractos acuosos por maceración) e industriales (aceites esenciales e hidrolatos), estudiando los efectos sobre la germinación y el crecimiento inicial de la especie más abundante en la muralla romana de Lugo *Parietaria judaica* L.

Analizar, de modo complementario a los ensayos de fitotoxicidad, si la eficacia (productos y concentración) inhibitoria de la germinación es permanente o si, por el contrario, tras la lluvia, simulada con un lavado de las semillas tratadas, éstas recuperan la capacidad germinativa.



### 3.3 MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.3.1 Especie estudiada

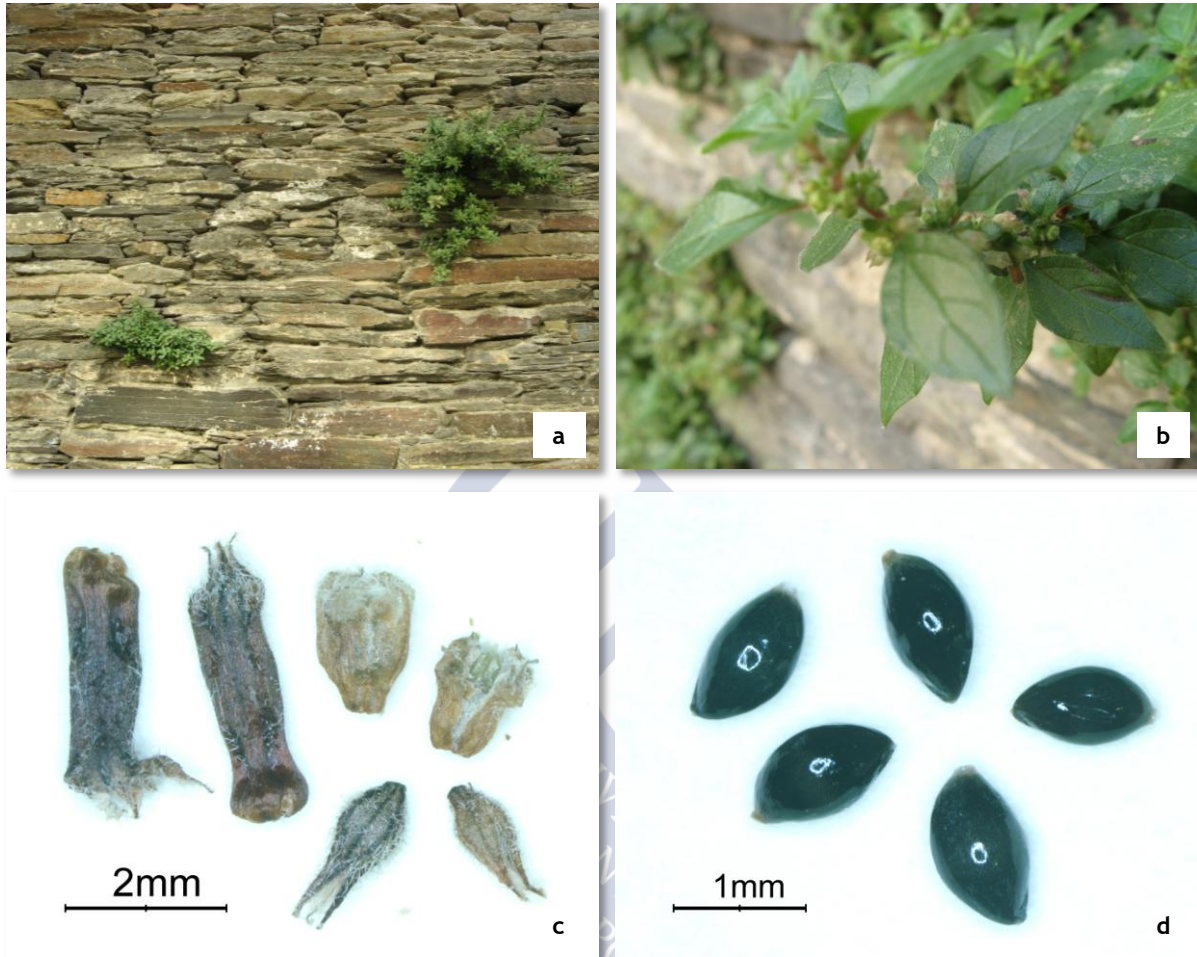
*Parietaria judaica* L. es una especie perteneciente a la familia Urticaceae, se trata de una planta perenne de hojas simples, alternas, pecioladas, de borde entero, con tres nervios basales; sin estípulas, de 1-5x0.5-3 cm, de forma oval –lanceolada u oblongo- lanceolada, con el ápice agudo (Figura 3.1). Las flores se reúnen en fascículos de 3-8(10) flores en las axilas de las hojas; hay flores masculinas, bisexuales y femeninas. Las bisexuales y masculinas tienen el perianto de 3 ó 4 lóbulos, acrescente, de hasta 3.5 mm, con pelos delgados, llevan 3 o 4 estambres opuestos a los lóbulos y un ovario rudimentario. Las flores femeninas tienen el perianto formado por 3 o 4 lóbulos, de hasta 2,5 mm, lanceolados, agudos, conniventes y muy pubescentes, el ovario es elipsoidal con estigma sésil o con un estilo linear muy corto. Florece casi todo el año y su polen es un alérgeno importante. Aquenios ovoideo o comprimidos, negruzcos, de hasta 1.3 mm, incluidos en el perianto persistente (Paiva, 2005).

En cuanto a la morfología de las semillas, se corresponde con el tipo foliar axial con un embrión grande, central y con endosperma apreciable, y con el subtipo foliar axial (FA1), característico de las Urticáceas (Martín, 1946; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Según dichos autores, las semillas de esta familia pueden carecer de dormición o presentar dormición fisiológica.

Se trata de una planta ruderal y viaria, de hábitat saxícola y de ambientes urbanos, hallándose con frecuencia adosada a paredes y muros, y en suelos nitrificados. Se encuentra ampliamente distribuida en el sudoeste de Asia, el sur y oeste de Europa y en la región Mediterránea, introducida en Norteamérica (Tutin, 2006). Recientemente se ha incorporado como arvense debido a cambios en las técnicas de cultivo, como el empleo del no laboreo (Verdeguer, 2011).

*P. judaica* crece abundantemente en zonas urbanas, industriales y terrenos baldíos. Produce gran cantidad de semillas con buena dispersión y que germinan en un amplio rango de temperaturas. Presenta plasticidad fenotípica y compite con otras especies excluyéndolas. Ofrece resistencia a herbicidas. Los escasos trabajos existentes sobre el control de *P. judaica* indican que son necesarias aplicaciones repetidas para evitar su crecimiento (Bass y Clements, 1990).

En la medicina tradicional se ha empleado *P. judaica* como lenitivo intestinal y contra los dolores reumáticos (Leporatti y Corradi, 2001).



**Figura 3.1** Plantas de *Parietaria judaica* en la muralla de Lugo (a y b), variabilidad de la morfología de sus flores (hermafroditas, masculinas y femeninas) con perianto acréscente (c) y frutos monospermos (aquenios) (d).

### 3.3.2 Metodología

#### 3.3.2.1 Fenología de la germinación de las semillas y de la emergencia de plántulas

**Germinación de las semillas en diferentes condiciones.** Para la realización de los ensayos de germinación (controles *-in vitro* y condiciones naturales-, bioensayos de fitotoxicidad *-in vitro-*), se recogieron inicialmente frutos de *P. judaica* en plantas de la muralla de Lugo a partir de los cuales se obtuvieron plantas desarrolladas en ambiente controlado, para poder

garantizar así la disponibilidad de semillas; de estos individuos se recolectaron diferentes lotes (2013, 2014 y 2015) de frutos maduros (provistos de su perianto persistente), que fueron almacenados independientemente en condiciones de laboratorio (20°C) y en oscuridad hasta el momento de la realización de los ensayos.

Los frutos monospermos -aquenios- (por lo que en adelante nos referiremos a ellos como semillas) que se utilizaron en los ensayos fueron seleccionados con su perianto o bien retirando previamente éste, aplicando criterios de color, conformación y tamaño, evaluados por transparencia en el caso de mantener su perianto, seleccionando con prevalencia los que presentaban el color propio de su madurez, estaban bien conformados para su tipo y su tamaño se ajustaba al más frecuente observado para la especie (descartando los tamaños demasiado reducidos).

Para evaluar la germinación de las semillas (con y sin su perianto) correspondientes a los diferentes años de producción tras su almacenamiento, se realizaron ensayos con las recién producidas, así como transcurrido cierto tiempo (uno y seis meses, un año, año y medio y dos años), en condiciones controladas favorables para su germinación: fotoperiodo de 16 horas luz, a 22°C, y 8 horas oscuridad, a 16°C, humedad relativa 80%, en las instalaciones de la RIAIDT (Rede de Infraestructuras de Apoio á Investigación e Desenvolvemento Tecnolóxico) del campus de Lugo), consistentes en una cámara Misa (controlador de temperatura Air Blue, humidificador centrífugo Herrmidifier, tubos fluorescentes específicos para cámaras fitotrón Osram L 58W/77 Fluora y programador horario Orbis Inca Duo). Además de las condiciones de exposición a luz (fotoperiodo) que pueden presentar las semillas dispuestas en la superficie del suelo (o en el exterior de la muralla), se ha estudiado su germinación en condiciones de oscuridad total, cuando están enterradas en el mismo (o en las rendijas más profundas del monumento).

Para cada tratamiento, se seleccionaron semillas de *P. judaica*, siguiendo los criterios descritos anteriormente, y se dispusieron en 4 réplicas de 25 semillas, en placas Petri de 9 cm de diámetro, cubiertas con doble capa de papel de filtro previamente desinfectado en una estufa Gallenkamp (80°C, 24 h), que se han humedecido con 6 ml de agua destilada, precintadas posteriormente con papel flexible Parafilm. Para el estudio de la germinación en condiciones de oscuridad, las placas se han mantenido en una caja opaca, y envueltas individualmente con papel de aluminio. Se evaluó la germinación de las semillas en cada caso, realizando recuentos con periodicidad diaria durante cuatro semanas (periodo suficiente para la estabilización de la dinámica de la germinación), retirando las semillas germinadas,

entendiendo como tal aquélla en la que la radícula se observaba claramente, como proponen Boojh y Ramakrishnan (1982), Vigna *et al.* (1983), y como se ha realizado habitualmente en estudios ecológicos de la germinación.

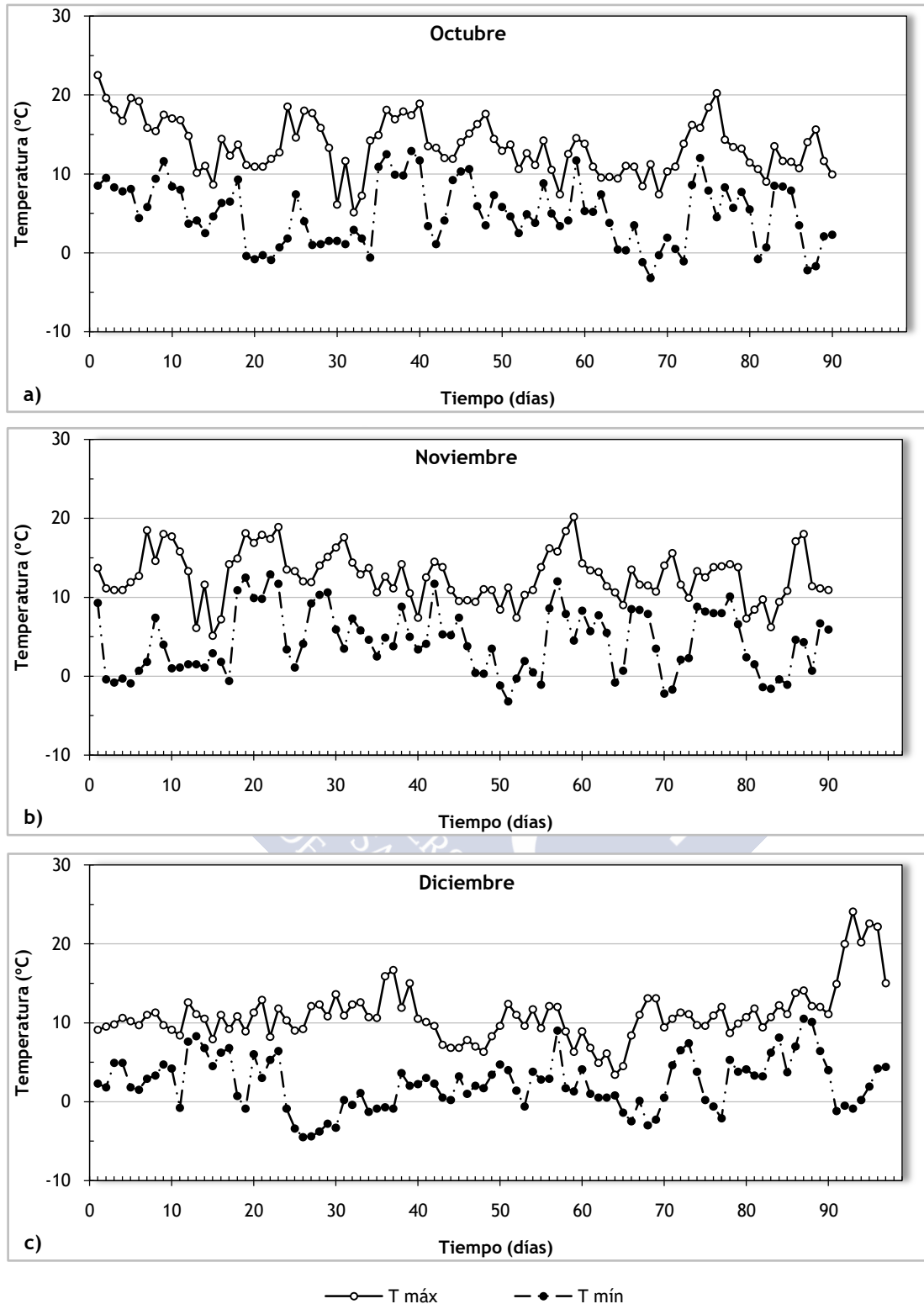
Para el recuento de las germinaciones en condiciones de oscuridad, se utilizó una lámpara de luz verde (frecuencia a la que las semillas no muestran en general sensibilidad que modifique su proceso germinativo) (Baskin y Baskin, 1998); no obstante, se realizó paralelamente otro ensayo en estas condiciones realizando únicamente un recuento final, manteniendo las placas en condiciones de oscuridad inalterables, lo que permitió confirmar la idoneidad de la metodología.

**Germinación de las semillas con el almacenamiento.** Se evaluó la germinación de las semillas de *P. judaica* transcurridos uno y dos años desde su producción (semillas de 2014 y 2013, respectivamente), seleccionándolas sin su perianto, aplicando los criterios establecidos anteriormente, y en condiciones de fotoperiodo, siguiendo la misma metodología descrita.

**Fenología de emergencia de plántulas.** Para evaluar la emergencia de las plántulas de la especie en condiciones ambientales naturales, se realizaron ensayos con frutos seleccionados (con y sin perianto) recién producidos, que se sembraron en bandejas perforadas (26.5x34.0x6.0 cm) rellenas con 2.5 l de sustrato comercial Pindstrup Universal (turba rubia de *Sphagnum* con estructura fina y gruesa, corteza de pino compostada y perlita; con 1,2 g de NPK y 0.05 ml de humectante por litro de sustrato), perlita y vermiculita (3:1:1), y divididas en cuatro cuadrantes para facilitar una siembra homogénea y los recuentos posteriores.

Previa hidratación del sustrato, se sembraron cuatro réplicas de 100 semillas por bandeja (25 por cuadrante) que fueron cubiertas por 250 ml adicionales de sustrato para proteger las semillas de las condiciones que las pudiesen desplazar, posteriormente dispuestas sobre portadoras se colocaron en una de las escaleras exteriores de la Escuela Politécnica Superior de Ingeniería de Lugo (EPSE), protegidas de la lluvia. La caracterización de las condiciones meteorológicas a las que han estado expuestas las bandejas se presenta en la Figura 3.2.

La emergencia se evaluó con una periodicidad de dos veces por semana durante tres meses (tiempo necesario para observar la estabilización de las emergencias), retirando las plántulas, considerando como emergidas aquéllas que presentaron sus cotiledones totalmente desplegados, prestando especial atención a no retirar semillas no germinadas.



**Figura 3.2** Temperatura máxima y mínima diaria (°C) registradas durante los ensayos de fenología de la emergencia de plántulas de *Parietaria judaica* (tres meses) en condiciones naturales, procedentes de semillas sin y con perianto, desde su producción, para los meses de octubre (a), noviembre (b) (lote de 2015) y diciembre (c) (lote de 2014). Datos registrados en la estación meteorológica Campus Lugo (Lugo) (Meteogalicia, 2016).

Esta metodología de evaluación de la emergencia de *P. judaica* se repitió con regularidad en tres intervalos temporales desde la producción de las semillas (octubre, noviembre con semillas de 2015 y diciembre con semillas de 2014) -considerando que no existe variabilidad interanual en el nivel de germinación de las semillas de esta especie y que ésta se produce fundamentalmente en otoño-.

### 3.3.2.2 Bioensayos de fitotoxicidad *in vitro*

Se realizaron bioensayos de fitotoxicidad (dosis-respuesta) en los que se probaron 3 productos originales (extractos acuosos), 19 productos industriales (14 aceites esenciales y 5 hidrolatos), así como otros productos con propiedades fitocidas (hipoclorito de sodio o ácido acético), además de 3 fitocidas químicos de síntesis (herbicidas), para evaluar su efecto sobre la germinación y desarrollo inicial de *P. judaica*.

#### 3.3.2.2.1 Productos estudiados

**Extractos acuosos.** Entre las especies que poseen actividad alelopática, la mimosa (*Acacia dealbata* Link), la jara pringosa (*Cistus Ladanifer* L.) y el eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.) se encuentran con facilidad en nuestro entorno geográfico, por ello se han seleccionado con el objetivo de evaluar dicha actividad sobre *P. judaica* mediante la producción de extractos acuosos. Éstos se han obtenido por maceración durante cuatro semanas de sus hojas y ramillas más jóvenes (250 g de biomasa verde en 2.5 l de agua destilada) en condiciones de laboratorio (20°C), filtrando la fase líquida resultante de esta maceración, tomando como referencia el procedimiento realizado por Pérez (2002) y Verdeguer (2011).

**Aceites esenciales/hidrolatos.** Los aceites esenciales e hidrolatos (productos industriales) se han adquirido a diferentes casas comerciales y, para algunos de ellos, su composición fue facilitada por las mismas (un grupo de los cuales incluyeron además una descripción detallada de la metodología de análisis aplicada); para los restantes fue analizada, a petición propia, mediante la técnica de resonancia magnética nuclear de protón (NMR), aconsejada para este tipo de análisis, quedando reflejada dicha composición de los productos estudiados, aceites e hidrolatos, en la Tabla 3.1 y Tabla 3.2, respectivamente.

El análisis de la composición de los aceites esenciales (puros o presentes en el hidrolato) realizado mediante la técnica de resonancia magnética nuclear de protón (NMR), consistió en el estudio de la respuesta de los núcleos de ciertos átomos, en presencia de campos magnéticos externos, frente a ondas electromagnéticas de determinadas frecuencias. La realización de análisis de NMR de protón es una técnica sencilla y rápida de análisis ya que, a diferencia también de la muy extendida NMR de carbono 13, la riqueza en 1H de las moléculas biológicas es casi del 100% (Breitmaier, 2006).

Un aspecto fundamental de la NMR es que la respuesta de los núcleos depende del entorno químico de la molécula de la cual forman parte, lo cual permite la identificación de las estructuras individuales. La utilización de la NMR que se hace en este trabajo, consiste en realizar el espectro del aceite esencial, esto permite obtener un espectro característico con diversas señales, algunas de las cuales son características de un determinado componente. Como el área de las señales es proporcional al número de átomos que se encuentran en la muestra, se puede deducir, comparando entre las distintas señales, la proporción de los diversos componentes identificados (Salinero *et al.*, 2012; Feás *et al.*, 2013).

**Otros productos.** Además se han testado otros productos con propiedades fitocidas (lejía, menos del 5% de hipoclorito sódico, y vinagre, 3-5% ácido acético en agua) y fitocidas de síntesis química (Ajax, MCPA 60%+Finale, glufosinato amónico 15%; Kid, oxadiazón 30%+glifosato 10.8%; y Roundup Ultra Plus, glifosato 36%).

#### 3.3.2.2.2 Realización de los bioensayos

Para evaluar su efecto sobre la germinación de las semillas, se ha diseñado un protocolo de bioensayos dosis-respuesta, en condiciones controladas (las antes referidas -fotoperiodo de 16 horas de luz, a 22°C, y 8 horas de oscuridad, a 16°C, humedad relativa 80%- en las mismas instalaciones) que, según los estudios preliminares, resultaron muy adecuadas para su germinación.

**Tabla 3.1** Composición de los 14 aceites esenciales determinada por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC/MS) o con detector de ionización de llama (GC/FID), o bien resonancia magnética nuclear de protón (NMR) de los aceites en cloroformo deuterado. AEAd: aceite esencial de *Acacia dealbata* Link, AECl: aceite esencial de *Cistus ladanifer* L., AEEg: aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill., AELa: aceite esencial de *Lavandula angustifolia* Mill., AELh: aceite esencial de *Lavandula hybrida* É. Rev. ex Briq., AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* L., AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L., AERo-A: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. alcanfor, AERo-C: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. cineol, AESI: aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* Vahl, AETv: aceite esencial de *Thymus vulgaris* L., AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. linalol<sub>1</sub>, AETv-L<sub>2</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. linalol<sub>2</sub>, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* Loeffl. ex L.

Compuestos <sup>a</sup>	ACEITES ESENCIALES													
	AEAd	AECl	AEEg	AELa	AELh	AEOv	AERo	AERo-A	AERo-C	AESI	AETv	AETv-L <sub>1</sub>	AETv-L <sub>2</sub>	AETz
α-pinene		81.37 <sup>c</sup>				0.91 <sup>b</sup>	0.39 <sup>c</sup>	21.96 <sup>bd</sup>	11.87 <sup>bd</sup>		5.51 <sup>b</sup>		2.34 <sup>b</sup>	1.26 <sup>b</sup>
α-thuyene						1.05					1.52			0.73
camphene							0.16	8.55	3.99		2.00		0.69	
β-pinene	*	7.32					0.37	2.32	6.19		0.78			
β-myrcene						1.50		3.86	1.66		2.34	3.50 <sup>c</sup>	8.19	1.62
α-terpinene						1.12		0.55			3.33	8.14	3.57	1,45
p-cymene		5.70				6.34		1.60	1.50		5.48	2.68	1.99	19.23
limonene			*		*			3.34	3.05	*	3.30	3.01	2.95	
1-8-cineole							99.09	19.71	45.80		5.08 <sup>f</sup>	1.30		
γ-terpinene						4.66		1.56	0.34		8.77		8.99	8.06
linalool			*	*	*	1.30		0.90	0.70	*	5.63	81.37	45.35	4,71
camphor								18.62	11.61					0.79
borneol								2.66	3.28				1.33	1.30
4-terpineol						0.78		0.83	0.53		9.58		10.71	1.04
α-terpineol								2.14	1.84		4.56		1.12	
geraniol			*		*					*	2.57			
bornyl acetate								1.53	0.71		0.75			
thymol						3.80					3.00			49.39
carvacrol						70.24								2.76
β-caryophyllene						2.23		2.36	2.42		0.70		0.94	1.48

germacrene D		4.31	
terpinolene		1.19	1.01
tricyclene	0.62		
sabinene		1.39	0.74
trans-thuyanol		3.74	1.55
linalyl acetate		2.40	0.63
hotrienol			0.57
trans- $\beta$ -ocimene		1.05	
cis-thuyanol		1.89	
trans- <i>p</i> -menth-2-en-1-ol		0.56	
trans-verbenol		1.08	
neral	0.62 <sup>e</sup>	0.53	
verbenone	1.42	4.06	
geranial	*	0.84	
bicyclogermacrene		0.54	
geranyl acetate		2.07	
citronelol	*		
cumarina	*		
viridiflorol	5.70		

<sup>a</sup> Compuestos detectados en análisis por espectrometría de masas y tiempos de retención (en porcentaje  $\geq 0.5\%$ ), o presentes en los resultados de los otros análisis.

<sup>b</sup> Porcentajes calculados a partir de GC/FID sin factor de corrección.

<sup>c</sup> Porcentajes relativos al total de los compuestos detectados por NMR. Los espectros obtenidos se han comparado con los de los compuestos puros obtenidos a partir de la web de Sigma-Aldrich (<https://www.sigmaaldrich.com>), la base de espectros "Spectral Database for Organic Compounds, SDBS" y la base SciFinder.

<sup>d</sup> Porcentaje de  $\alpha$ -pinene+ $\alpha$ -thuyene.

<sup>e</sup> Porcentaje de neral+humulene.

<sup>f</sup> Porcentaje de 1-8-cineole+ $\beta$ -phelandrene.

\* Compuesto presente en el producto comercial industrial.

**Tabla 3.2** Principales compuestos de los aceites esenciales presentes en los 5 hidrolatos estudiados. HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* L., HRo: hidrolato de *Rosmarinus officinalis* L., HTv-L: hidrolato de *Thymus vulgaris* L. linalol, HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* L. timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis* Loefl. ex L.

HIDROLATOS				
HOv	HRo	HTv-L	HTv-T	HTz
<b>carvacrol<sup>a</sup> (96.15)<sup>b</sup></b>	$\alpha$ -pinene	$\alpha$ -pinene	$\alpha$ -pinene	<b>thymol<sup>a</sup> (81.30)<sup>b</sup></b>
thymol (3.85)	camphene	$\beta$ -myrcene	$\beta$ -myrcene	carvacrol (18.70)
	$\beta$ -pinene	$\alpha$ -terpinene	$\alpha$ -terpinene	
	$\beta$ -myrcene	limonene	$\gamma$ -terpinene	
	limonene	$\gamma$ -terpinene	<i>p</i> -cymene	
	1-8-cineole	<i>p</i> -cymene	linalool	
	camphor	<b>linalool</b>	<b>thymol</b>	
	<i>p</i> -cymene	4-terpineol	carvacrol	
	$\beta$ -caryophyllene	$\alpha$ -terpineol		
	$\alpha$ -terpineol	borneol		
	borneol			

<sup>a</sup> Compuestos detectados en análisis por resonancia magnética nuclear de protón (NMR).

<sup>b</sup> Porcentajes relativos al total de los compuestos detectados por NMR.

Debido al elevado número de productos ensayados, para cada tratamiento se ha testado inicialmente una dosificación máxima, de 4  $\mu$ l para un volumen de 2 ml de disolución en agua destilada de pH 7 en el caso de los aceites (2  $\mu$ l ml<sup>-1</sup>) y la del producto sin dilución (100%) en los extractos acuosos, hidrolatos, lejía y vinagre, para dicho volumen; cuando se trató de los fitocidas de síntesis, de disoluciones con concentraciones de producto equivalentes a su aplicación en la muralla: Ajax+Finale (Ajax: 2 l/ha, Finale: 4 l/ha); Kid (1 kg/ha); Roundup Ultra Plus (10 l/ha), 400 l/ha de caldo, para lo cual prepararon disoluciones de volumen 40 ml con concentración equivalente: Ajax+Finale: (0.2 ml Ajax+0.4 ml Finale)/40 ml agua; Kid: 1 g Kid/40 ml agua; Roundup Ultra Plus: 1 ml Roundup Ultra Plus/40 ml agua).

A continuación, para aquellos productos que resultaron eficaces (bien por inhibición de la germinación o anormal desarrollo inicial de sus plántulas), se probaron tres concentraciones decrecientes (1, 0.5 y 0.25  $\mu$ l ml<sup>-1</sup>) en el caso de los aceites, e igualmente concentraciones del 50, 25 y 12.5% para el resto de los productos, de manera similar a las utilizadas en estudios con aceites (Verdeguer *et al.*, 2009, 2012) y con hidrolatos (Valiño, 2013).

Además, en los casos de los aceites esenciales con los que no se encontró efecto fitotóxico en los ensayos iniciales, se probaron tres concentraciones crecientes (10, 20, 200  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ); utilizando como control agua destilada.

Cada bioensayo dosis respuesta se realizó en dos fases secuenciales de cuatro semanas de duración cada una (tiempo suficiente para que se estabilizara la dinámica de la germinación para la especie estudiada, como se observó en estudios previos). Fase I: Inhibición, las semillas estuvieron en presencia de cada producto en la concentración correspondiente; finalizada esta fase, se realizó una evaluación rigurosa del estado (consistencia) de las semillas no germinadas y aquellas aparentemente viables se pasaron a una segunda fase (sólo cuando su proporción fue igual o superior al 10%).

Las semillas seleccionadas para la segunda fase (Fase II: Recuperación), se retiraron de las placas donde se aplicó el producto, se depositaron en coladores de pequeño tamaño, respetando sus réplicas, se mantuvieron sumergidas en agua destilada durante 5 minutos, y a continuación fueron transferidas a nuevas placas en las que estuvieron únicamente en presencia de agua (destilada, 2 ml), en dosificación constante, simulando así un hipotético lavado natural del producto, analizando la posible recuperación de su potencialidad germinativa, 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).

En cada tratamiento se prepararon cuatro réplicas de 25 semillas de *P. judaica*, seleccionadas con el criterio descrito para ensayos anteriores y colocadas en placas Petri de 9 cm de diámetro, sobre doble capa de papel de filtro humedecido con la correspondiente dosificación del producto (los aceites se dosificaron directamente sobre un disco de papel de filtro de 2 cm de diámetro situado en el centro) y precintadas con papel flexible Parafilm, realizando un recuento diario de la germinación.

Además del estudio de la germinación, en cada una de las fases descritas, se evaluó simultáneamente el desarrollo inicial de las plántulas; para ello, con periodicidad diaria, una vez cuantificadas, se retiraron cuidadosamente las semillas germinadas (número variable según el nivel de germinación) en cada réplica de cada producto, transfiriéndolas a nuevas placas de tratamiento (preparadas simultáneamente al inicio de cada bioensayo) e identificándolas según su fecha de germinación. Se realizó un seguimiento de cada una de estas semillas consistente en la tipificación de las plántulas, diferenciando las viables (bien desarrolladas y verdes) de las que no lo fueron (con clorosis y/o escaso desarrollo del

epicotilo o hipocotilo) a los 5 días de desarrollo, verificando dicha diferenciación transcurridos 10 y 15 días, lo cual ha permitido establecer una relación de categorías tipológicas según el grado de daño causado (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3** Clasificación tipológica de plántulas de *Parietaria judaica* según el grado de daño fitotóxico observado.

### 3.3.3 Análisis estadístico y representación gráfica

La fase de elaboración, representación y análisis de datos obtenidos se realizó con Microsoft Excel 2010, GraphPad Prism 7 y el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 27 para Windows, con licencia de la Universidad de Santiago de Compostela.

#### 3.3.3.1 Elaboración de datos

Las variables analizadas de germinación/emergencia, así como la transformación que se aplicó para su posterior análisis, y las referentes a la tipología de plántulas se describen a continuación:

- **Variables de germinación/emergencia.** Las variables de germinación/emergencia que se estudiaron han sido las que a continuación se detallan:
  - Porcentaje final acumulado de germinación. Se recogieron datos, con periodicidad diaria, de cuantificación de semillas germinadas, calculando el porcentaje de germinación final acumulado. En el caso de los bioensayos de fitotoxicidad, para la Fase I (inhibición) y globalmente al término de la Fase II (inhibición+recuperación).

Para evaluar comparativamente el efecto de los tratamientos sobre esta variable se han establecido cinco niveles cualitativos de germinación de las semillas: muy bajo ( $\leq 10\%$ ), bajo (11-30%), medio (31-70%), elevado (71-89%) y muy elevado ( $\geq 90$ ).

- Porcentaje final acumulado de emergencia. Se recogieron datos, con periodicidad de dos veces por semana, de cuantificación de plántulas emergidas, calculando el porcentaje de emergencia final acumulado.

Para evaluar comparativamente el efecto de las condiciones sobre esta variable se han establecido cinco niveles cualitativos de emergencia de las plántulas, similares a los correspondientes al porcentaje de germinación.

- Tiempo medio de germinación/emergencia. Para caracterizar la germinación/emergencia de la especie se calculó este parámetro, que guarda relación con el ritmo de germinación (Ellis y Roberts, 1980; Bradbeer, 1988; Thompsett y Pritchard, 1998):

$$t_m = \frac{N_1 \times T_1 + N_2 \times T_2 + \dots + N_n \times T_n}{N_1 + N_2 + \dots + N_n}$$

Donde:  $t_m$ : tiempo medio de germinación/emergencia;  $N_1$ : número de semillas germinadas/plántulas emergidas en  $T_1$ ;  $N_2$ : número de semillas germinadas/plántulas emergidas en  $T_1$  y  $T_2$ ;  $T_n$ : días transcurridos desde que las semillas se pusieron a germinar.

- **Datos transformados.** Para el análisis de los datos se consideró necesario realizar también una transformación de los valores obtenidos para estas variables, aplicando la transformación habitualmente utilizada en cada caso (Montgomery, 2017).
  - Porcentaje final acumulado de germinación/emergencia. Se calculó el valor de los porcentajes finales de germinación/emergencia en cada uno de los tratamientos/condiciones como “ $\arcsin(\sqrt{p})$ ”, donde: arcsin: arcoseno de la función;  $p$ : valor de germinación/emergencia en tanto por uno.
  - Tiempo medio de germinación/emergencia. Se calculó como “ $\log(t_m + 1)$ ”, donde: log: logaritmo en base 10 de la función;  $t_m$ : tiempo medio de germinación/emergencia.
- **Tipología de las plántulas**
  - Proporción de tipos de plántulas. En los bioensayos de fitotoxicidad, para la Fase I (inhibición) y la Fase II (recuperación, cuando procedió realizarla), se recogieron datos de la tipología de plántulas de 5, 10 y 15 días, calculando su proporción final en la muestra, siempre que se pudo disponer a la terminación del ensayo de un mínimo de 10 individuos estudiados.

### 3.3.3.2 Análisis y representaciones

El estudio de la germinación de las semillas/emergencia de las plántulas se realizó en tres campos de análisis:

- Representaciones gráficas mediante
  - Dinámica de germinación de las semillas/emergencia de las plántulas
  - Diagramas de barras agrupados, representando la germinación final de las semillas de diferentes lotes, con el tiempo de almacenamiento a corto plazo.
  - Curvas dosis-respuesta para el tratamiento determinado, características en estudios con bioensayos de toxicidad, que reflejan las variaciones entre individuos de una misma población; las curvas sigmoidales dosis-respuesta (pendiente variable) y su coeficiente de determinación ( $R^2$ ), se obtuvieron representando la concentración (abscisas) y el porcentaje final medio de germinación (ordenadas), usando GraphPad Prism 7. Para cada tratamiento, se calculó el valor de  $IC_{50}$  (Concentración Inhibitoria Máxima Media, concentración que produce una inhibición del 50% de la respuesta germinativa), que se determinó en función de su curva dosis-respuesta específica. Todo esto se ha realizado según la propuesta de Fagodia *et al.* (2017).

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + ((X^{\text{HillSlope}}) / (IC50^{\text{HillSlope}})))$$

- Estudio de la distribución y dispersión de los datos mediante estadísticos descriptivos básicos y representaciones gráficas.
- Comparación de medias realizando pruebas ANOVA o pruebas T, en su caso, para detectar diferencias significativas entre tratamientos/condiciones para la especie, cuando se cumple la normalidad de los datos (analizada mediante el test Shapiro-Wilk); y análisis Tukey/DMS (Mínima Diferencia Significativa) *a posteriori* ( $p < 0.05$ ), previa verificación de la homogeneidad de su varianza mediante la prueba de Levene,

o Games Howell para una asunción de varianzas diferentes (Pardo y Ruíz, 2002; Montgomery, 2017). Cuando los datos no se ajustaron a la normalidad, se compararon las medias con la prueba de Kruskal-Wallis, o U de Mann-Whitney en su caso.

El estudio de la tipología de plántulas se realizó tal como se describe a continuación:

- Representaciones gráficas mediante
  - Diagramas de barras apilados y agrupados, representando la distribución proporcional de tipos de plántulas presentes en cada concentración (creciente) para ambas fases estudiadas (Fase I-Inhibición, Fase II-Recuperación), transcurridos 5 y 15 días, para cada uno de los productos estudiados (pudiendo tratarse del grupo de extractos acuosos, aceites esenciales, hidrolatos u otros productos con propiedades fitocidas).



### 3.4 RESULTADOS

#### 3.4.1 Fenología de la germinación de las semillas

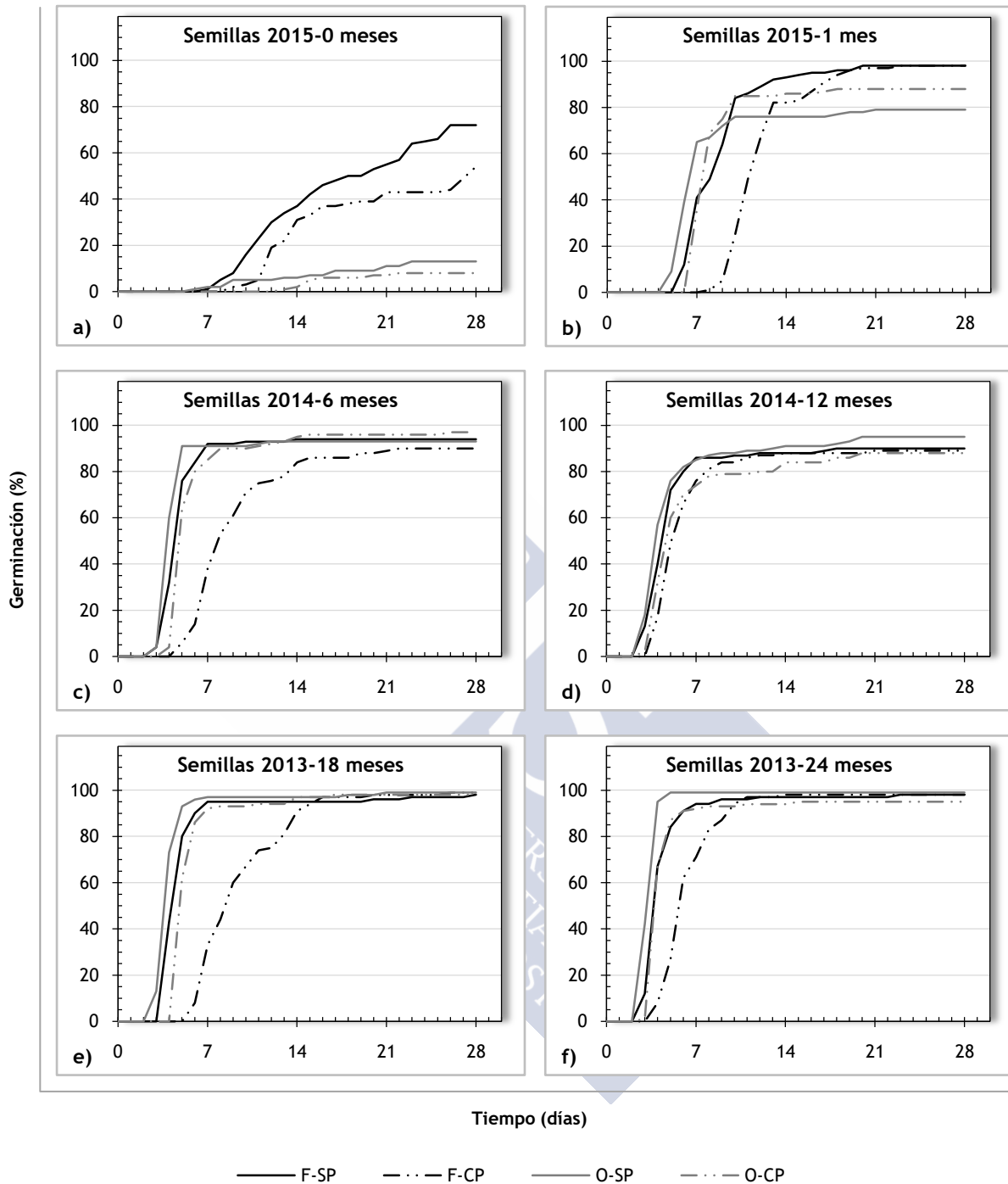
En relación con la fenología de la germinación de *P. judaica* (Figura 3.3), las semillas recién producidas presentaron un nivel de germinación elevado (72%) en condiciones de fotoperiodo cuando estuvieron desprovistas de su perianto, que difirió significativamente del encontrado cuando mantuvieron esta envoltura (54%); estos valores difirieron significativamente de los observados en condiciones de oscuridad que se mantuvieron inicialmente bajos (Figura 3.3a).

Tras el primer mes de almacenamiento, las semillas sin perianto o con éste persistente alcanzaron valores de germinación muy elevados en fotoperiodo (98%) y elevados en oscuridad (79 y 88%, respectivamente) que difirieron significativamente entre sí (Figura 3.3b).

Con medio año de almacenamiento se observaron valores muy elevados en todas las condiciones (Figura 3.3c); que se mantuvieron con el almacenamiento de uno, uno y medio y dos años, estabilizándose así a corto plazo la tendencia germinativa (Figura 3.3d,e,f).

La germinación de las semillas recién producidas se produjo rápidamente en todas las condiciones (13-17 días), con un tiempo medio que bajó significativamente a partir del primer mes de almacenamiento y hasta los dos años (4-7 días); la principal variación se encontró en semillas con perianto y en condiciones de fotoperiodo, en las que dicho proceso se produjo de forma significativamente más lenta en comparación con las semillas desnudas (Tabla 3.4).

En cuanto a la variabilidad interanual, en condiciones de fotoperiodo y con ambiente controlado y sin perianto, las semillas del primer lote (2013) mantuvieron niveles de germinación muy elevados en los dos primeros años de almacenamiento; como las del segundo lote (2014), lo que confirma que la estabilidad germinativa de esta especie se mantiene también en diferentes poblaciones (lotes) (Figura 3.4).

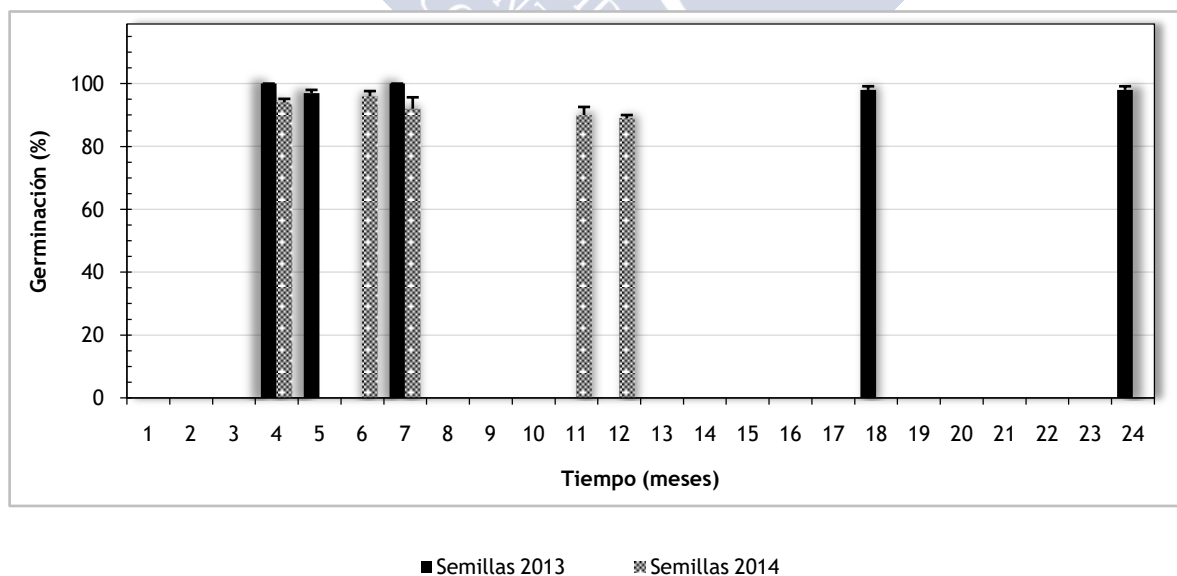


**Figura 3.3** Germinación media acumulada (%) a lo largo del tiempo (cuatro semanas), de semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, SP, y con perianto, CP, en condiciones de fotoperiodo, F, y oscuridad, O) recién producidas (a) y con un mes de almacenamiento (b) (lote de 2015), seis meses (c) y un año (d) (lote de 2014), año y medio (e) y dos años (f) (lote de 2013).

**Tabla 3.4** Tiempo medio (días) de germinación de las semillas de *Parietaria judaica* (sin/con perianto, en condiciones de fotoperiodo/oscuridad) recién producidas (0 meses) y con un mes de almacenamiento (1 mes) (lote de 2015), seis meses (6 meses) y un año (12 meses) (lote de 2014), año y medio (18 meses) y dos años (24 meses) (lote de 2013). F-SP: fotoperiodo semillas sin perianto, F-CP: fotoperiodo semillas con perianto, O-SP: oscuridad semillas sin perianto, O-CP: oscuridad semillas con perianto.

	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO		
	0 meses	1 mes	6 meses
F-SP	15.24 ± 1.63 a	8.92 ± 0.12 a	5.02 ± 0.04 a
F-CP	16.70 ± 0.95 a	12.27 ± 0.58 b	9.04 ± 0.55 b
O-SP	13.21 ± 1.99 a	7.11 ± 0.25 c	4.45 ± 0.10 a
O-CP	15.84 ± 0.48 a	8.16 ± 0.22 a	6.10 ± 0.25 c
	12 meses	18 meses	24 meses
F-SP	5.06 ± 0.15 a	5.34 ± 0.18 a	4.66 ± 0.32 a
F-CP	6.04 ± 0.18 b	9.82 ± 0.81 b	6.63 ± 0.14 b
O-SP	5.30 ± 0.32 ab	4.47 ± 0.20 c	3.62 ± 0.06 c
O-CP	6.12 ± 0.36 b	5.87 ± 0.26 a	4.55 ± 0.09 a

Valores medios ± error estándar y test *post hoc* DMS ( $p < 0.05$ ), o test correspondiente, letras iguales para un mismo tiempo de almacenamiento indican que no hay diferencias significativas entre condiciones ambientales y de las semillas. Los valores medios se corresponden con los datos sin transformar, los resultados de la prueba ANOVA, o la correspondiente en su caso, y comparaciones *post hoc* se han interpretado a partir de datos transformados.

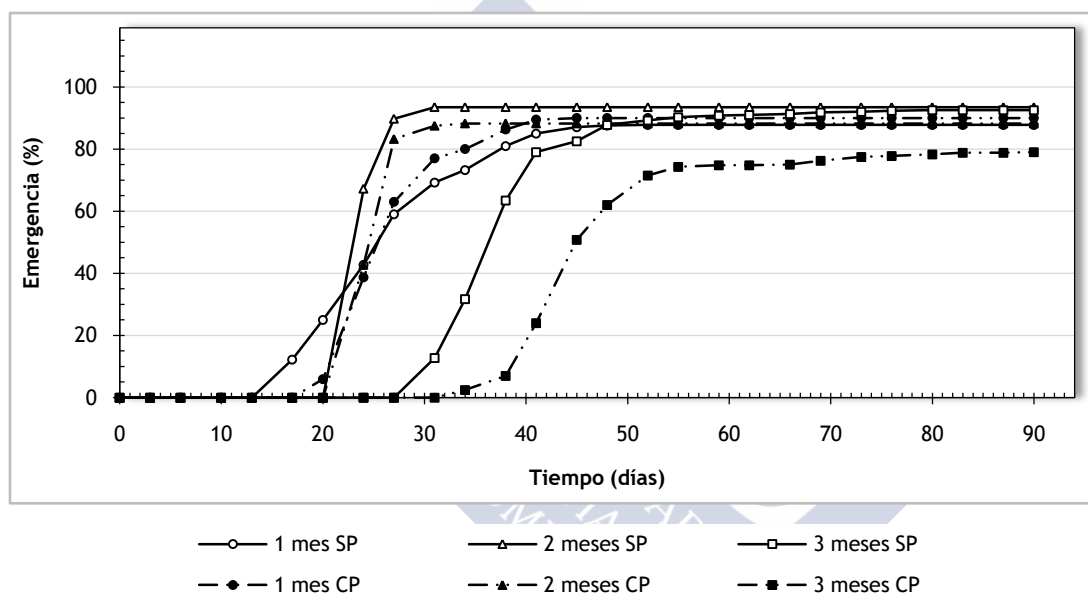


**Figura 3.4** Variabilidad de la germinación (%) a lo largo de dos años de almacenamiento, de semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo) pertenecientes a dos lotes de producción (lote de 2013 -dos años de almacenamiento-, lote de 2014 -un año de almacenamiento-).

### 3.4.2 Fenología de la emergencia de plántulas

La emergencia de plántulas de semillas recién producidas de *P. judaica* alcanzó niveles elevados o muy elevados en los tres meses estudiados; siendo la principal diferencia significativa la de las semillas con perianto en el último mes (Figura 3.5).

La emergencia se inició en torno a la tercera semana, tiempo medio de 25-28 días, con retraso en el tercer mes (39-47 días) que presentó la principal diferencia significativa en el tiempo medio con los otros dos, tanto en las semillas sin como con perianto, que a su vez en este mes difirieron entre sí (Tabla 3.5).



**Figura 3.5** Emergencia media acumulada (%) a lo largo del tiempo (tres meses) de las plántulas de *Parietaria judaica* en condiciones naturales (semillas sin perianto, SP, y con perianto, CP), recién producidas (1 mes) y transcurridos dos meses (lote de 2015), y tres meses (lote de 2014).

**Tabla 3.5** Tiempo medio (días) de emergencia de plántulas de *Parietaria judaica* (en condiciones naturales), procedentes de semillas (sin perianto, SP, y con perianto, CP) recién producidas (1 mes) y transcurridos dos meses (lote de 2015), y tres meses (lote de 2014).

	FENOLOGÍA
1 mes-SP	26.99 ± 0.75 ac
1 mes -CP	27.66 ± 0.37 a
2 meses -SP	25.00 ± 0.05 bc
2 meses -CP	25.80 ± 0.16 c
3 meses -SP	38.69 ± 1.25 d
3 meses -CP	46.63 ± 0.85 e

Valores medios ± error estándar y test *post hoc* DMS ( $p < 0.05$ ), o test correspondiente, letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre condiciones (naturales y de las semillas). Los valores medios se corresponden con los datos sin transformar, los resultados de la prueba ANOVA, o la correspondiente en su caso, y comparaciones *post hoc* se han interpretado a partir de datos transformados.

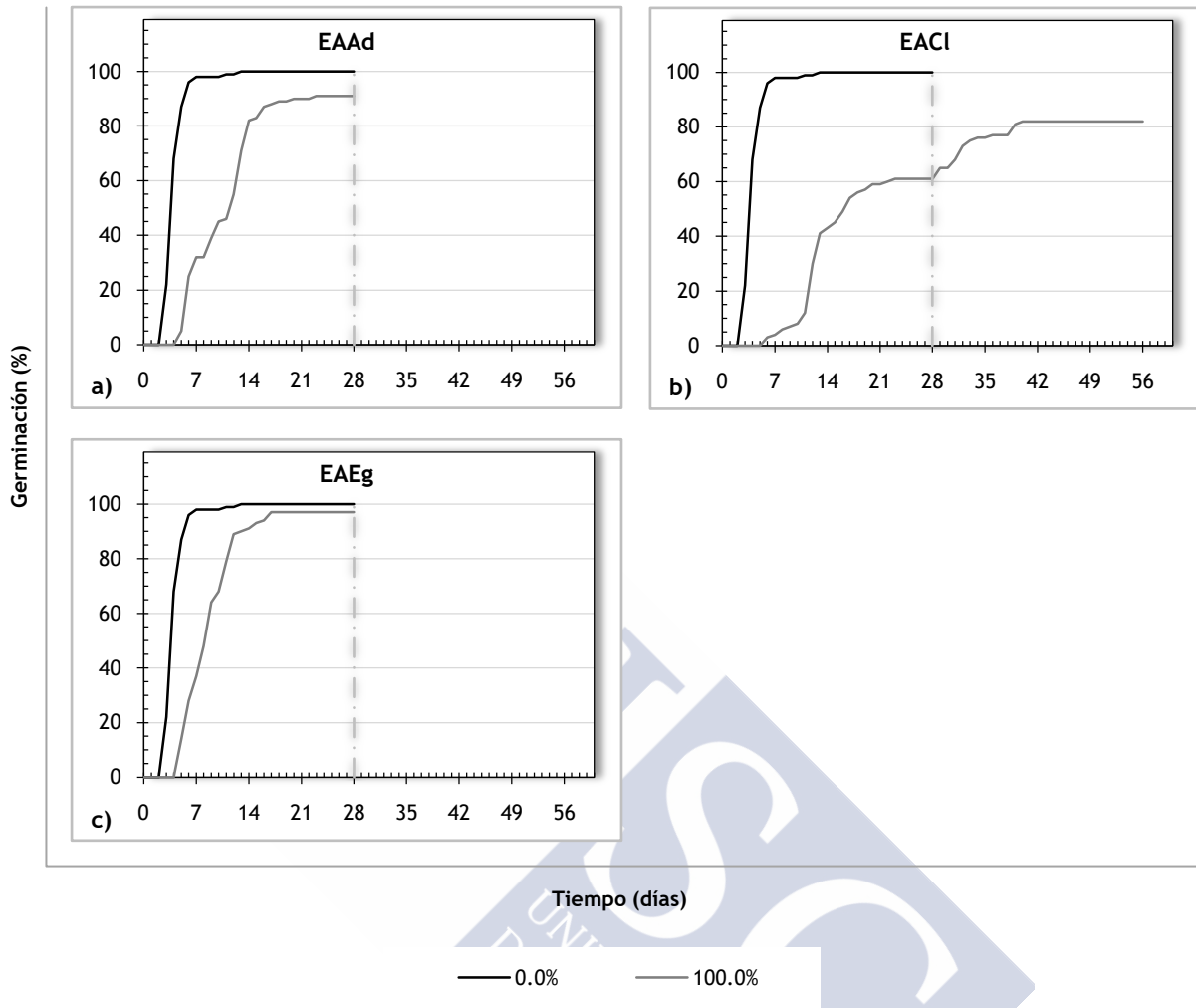
### 3.4.3 Bioensayos de fitotoxicidad *in vitro*

#### 3.4.3.1 Efecto sobre la germinación de las semillas

En relación a los extractos acuosos (Figura 3.6), únicamente el de *C. ladanifer* redujo significativamente el nivel de germinación hasta valores medios (Figura 3.6b), mientras que con los extractos de *A. dealbata* y *E. globulus* se mantuvieron valores similares al control (Figura 3.6a,c).

En cuanto al tiempo medio de germinación, éste se incrementó significativamente para todos los extractos, pasando de 4 a 13 días con el extracto de *C. ladanifer*, ocurriendo una germinación rápida en todo caso (Tabla 3.6).

La dinámica de la germinación de esta especie se modificó escasamente para el extracto de *C. ladanifer* tras el alivio de su exposición al producto (Fase II-Recuperación), incrementándose un 20%.



**Figura 3.6** Germinación media acumulada (%) para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas) de semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo), en el control (0%) y con los extractos acuosos en la concentración inicial sin dilución (100%). EAd: extracto acuoso de *Acacia dealbata* (a), EACI: extracto acuoso de *Cistus ladanifer* (b), EAEG: extracto acuoso de *Eucalyptus globulus* (c).

**Tabla 3.6** Tiempo medio (días) de germinación para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) de las semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo), en el control (0%) y con los extractos acuosos ensayados en la concentración (C) inicial sin dilución (100%). EAd: extracto acuoso de *Acacia dealbata*, EACI: extracto acuoso de *Cistus ladanifer*, EAEG: extracto acuoso de *Eucalyptus globulus*.

C (%)	EXTRACTOS ACUOSOS		
	EAd	EACI	EAEG
0.0	4.37 ± 0.14 a	4.37 ± 0.14 a	4.37 ± 0.14 a
100.0	10.62 ± 1.77 b	13.29 ± 0.46 b	8.79 ± 0.65 b

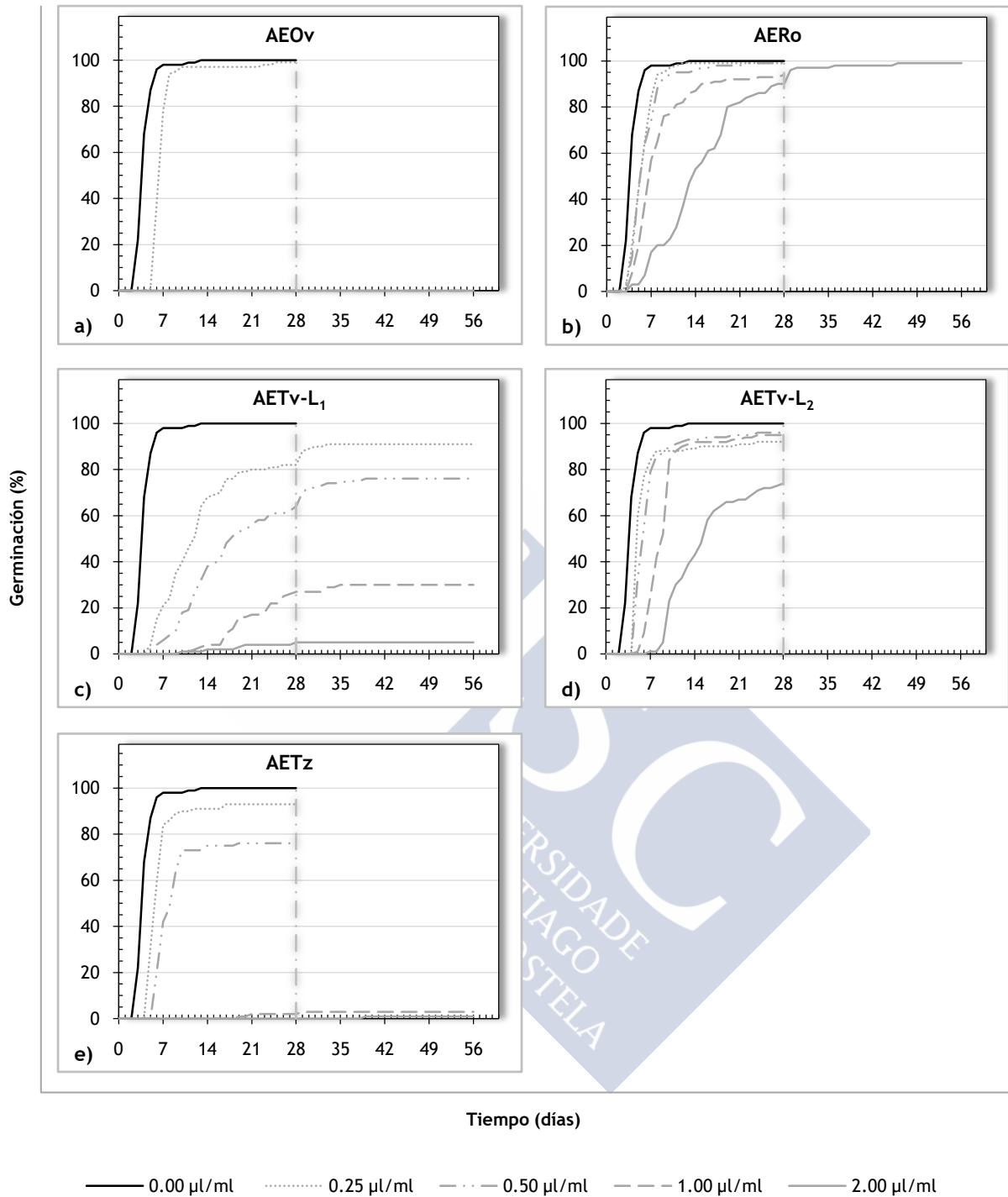
Valores medios ± error estándar, letras iguales para un mismo producto indican que no hay diferencias significativas entre concentraciones. Los valores medios se corresponden con los datos sin transformar, los resultados de la prueba T ( $p < 0.05$ ), o correspondiente, se han interpretado a partir de datos previamente transformados.

Se evaluó la dinámica de la germinación de las semillas de *P. judaica*, en los bioensayos de fitotoxicidad con aceites esenciales (*A. dealbata*, *C. ladanifer*, *E. globulus*, *L. angustifolia*, *L. hybrida*, *O. vulgare*, *R. officinalis*, *S. lavandulifolia*, *T. vulgaris*, *T. zygis*), quimiotipados o no, e hidrolatos (*O. vulgare*, *R. officinalis*, *T. vulgaris*, *T. zygis*), quimiotipados o no, en la concentración de partida y en las tres decrecientes o crecientes, según resultó procedente, para la Fase I-Inhibición y globalmente a la finalización de la Fase II-Recuperación. También se evaluó la viabilidad de las plántulas de 5 y 15 días cuando resultó procedente.

En cinco de los aceites estudiados se produjo una reducción de la germinación y/o un incremento de la proporción de plántulas no viables en la concentración inicialmente ensayada ( $2 \mu\text{l ml}^{-1}$ ), que se fue disminuyendo en los ensayos posteriores (Figura 3.7); mientras que en los otros nueve dichos efectos se apreciaron incrementando dicha concentración (Figura 3.8).

En relación con la dinámica de la germinación de las semillas de *P. judaica*, para la Fase I-Inhibición, el nivel final de germinación se redujo significativamente con el aceite de *O. vulgare* en las tres primeras concentraciones ( $2, 1, 0.5 \mu\text{l ml}^{-1}$ ), inhibiéndose totalmente, alcanzando valores muy elevados en la cuarta concentración ( $0.25 \mu\text{l ml}^{-1}$ ), similares al control (Figura 3.7a). Con el aceite de *R. officinalis* (cineol), el nivel de germinación se mantuvo muy elevado, similar al control con las dos concentraciones más bajas (Figura 3.7b). El aceite de *T. vulgaris* linalol<sub>1</sub> redujo significativamente la germinación con todas las concentraciones, que además difirieron entre sí, hasta niveles muy bajos (5%) con la máxima; incrementándose gradualmente a medida que la concentración disminuyó (Figura 3.7c). El aceite de *T. vulgaris* linalol<sub>2</sub> redujo significativamente la germinación únicamente con la mayor concentración, manteniéndose no obstante en niveles elevados (Figura 3.7d). Con el aceite de *T. zygis* (timol) se redujo significativamente la germinación con todas las concentraciones, inhibiéndola completamente en la primera, hasta valores muy bajos en la segunda (2%) y manteniéndolos elevados o muy elevados en las otras dos (Figura 3.7e).

En cuanto al tiempo medio de germinación, muy rápida en el control (4 días), éste aumentó significativamente para los aceites a medida que se incrementó su concentración (15 días, aceite de *T. vulgaris*<sub>1</sub>,  $2 \mu\text{l ml}^{-1}$ ); lo que se observó incluso con el aceite de *R. officinalis* (14 días), donde los niveles de germinación se mantuvieron muy elevados; si bien ésta ocurrió rápido en todo caso (Tabla 3.7).



**Figura 3.7** Germinación media acumulada (%) para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas) de semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo), en el control ( $0 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) y con los aceites esenciales en concentraciones decrecientes ( $2, 1, 0.5$  y  $0.25 \mu\text{l ml}^{-1}$ ). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (c), AETv-L<sub>2</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>2</sub> (d), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (e).

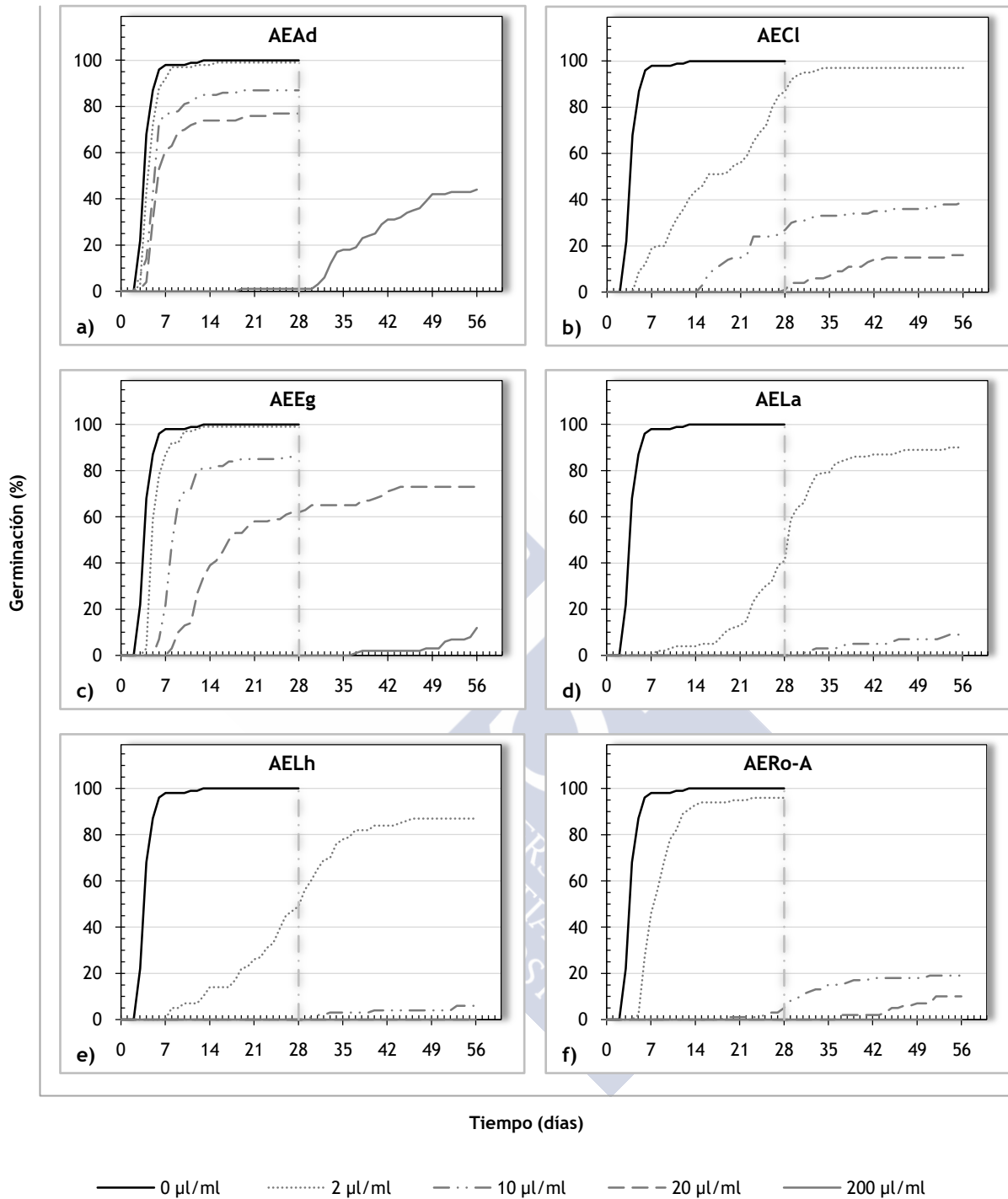
**Tabla 3.7** Tiempo medio (días) de germinación para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) de las semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo), en el control ( $0 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) y con los aceites esenciales ensayados en concentraciones (C) decrecientes (2, 1, 0.5 y  $0.25 \mu\text{l ml}^{-1}$ ). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare*, AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub>, AETv-L<sub>2</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>2</sub>, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis*.

C ( $\mu\text{l ml}^{-1}$ )	ACEITES ESENCIALES				
	AEOv	AERo	AETv-L <sub>1</sub>	AETv-L <sub>2</sub>	AETz
0.00	4.37 ± 0.14 a	4.37 ± 0.14 a	4.37 ± 0.14 a	4.37 ± 0.14 a	4.37 ± 0.14 a
0.25	7.20 ± 0.29 b	5.95 ± 0.98 d	11.06 ± 0.54 d	6.05 ± 0.30 d	6.43 ± 0.14 c
0.50		6.44 ± 0.47 d	15.10 ± 1.36 b	6.85 ± 0.50 d	8.03 ± 0.38 b
1.00		8.16 ± 0.86 c	19.85 ± 0.59 c	9.17 ± 0.22 c	
2.00		13.94 ± 0.96 b	15.44 ± 3.63 bd	14.18 ± 0.41 b	

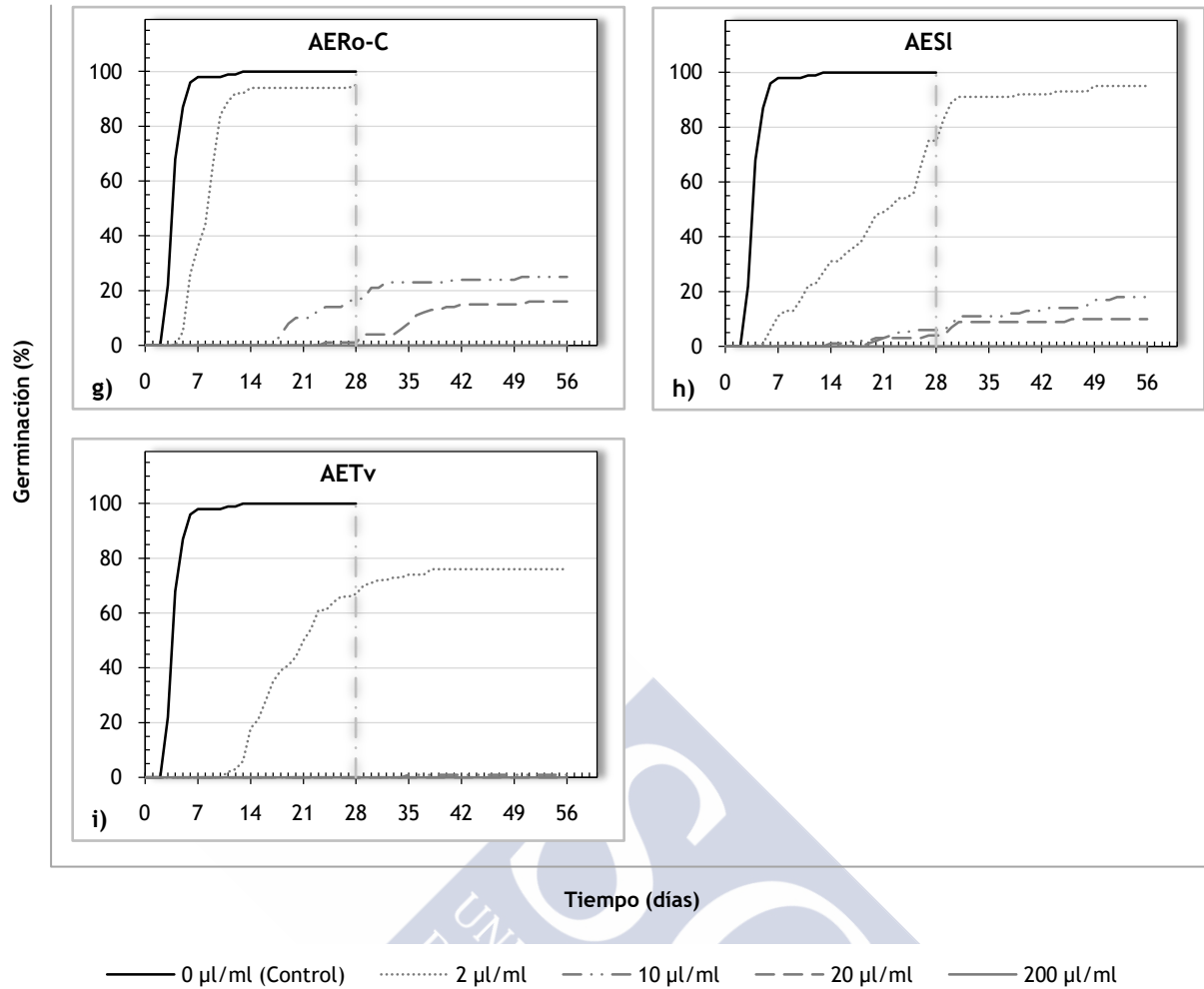
Valores medios ± error estándar y test *post hoc* DMS ( $p < 0.05$ ), o test correspondiente, letras iguales para un mismo producto indican que no hay diferencias significativas entre concentraciones. Los valores medios se corresponden con los datos sin transformar, los resultados de la prueba ANOVA, o la correspondiente en su caso, y comparaciones *post hoc* se han interpretado a partir de datos previamente transformados.

Los aceites de *L. angustifolia*, *L. hybrida* y *Thymus vulgaris* redujeron significativamente el nivel de germinación, inhibiéndola completamente en las tres concentraciones más elevadas ( $10, 20, 200 \mu\text{l ml}^{-1}$ ); bajando a niveles medios con la inicial ( $2 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) (Figura 3.8d,e,i). Con los aceites de *C. ladanifer*, *R. officinalis* (ambos quimiotipos) y *S. lavandulifolia*, se observó una reducción significativa del nivel de germinación hasta valores bajos o muy bajos, en las tres concentraciones más elevadas, pudiendo incluso inhibirse totalmente en la más alta (Figura 3.8b,f,g,h). Los aceites de *A. dealbata* y *E. globulus* redujeron significativamente los niveles de germinación hasta valores muy bajos con la mayor concentración, inhibiéndola totalmente el de eucalipto; manteniendo niveles muy elevados, elevados o medios, respectivamente, con las otras tres concentraciones (Figura 3.8a,c).

En cuanto al tiempo medio de germinación, de nuevo se elevó significativamente para los aceites a medida que se incrementó su concentración, pasando de 4 a 22 días con el aceite de *L. angustifolia* ( $2 \mu\text{l ml}^{-1}$ ), produciéndose lentamente. Es de señalar que tanto con el aceite de *L. angustifolia* como con el de *L. hybrida* la germinación se produjo gradualmente sin llegar a estabilizarse ( $2 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) (Tabla 3.8).



**Figura 3.8** Germinación media acumulada (%) para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas) de semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperíodo), en el control (0 µl ml<sup>-1</sup>) y con los aceites esenciales en concentraciones crecientes (2, 10, 20 y 200 µl ml<sup>-1</sup>). AEAd: aceite esencial de *Acacia dealbata* (a), AECl: aceite esencial de *Cistus ladanifer* (b), AEEg: aceite esencial de *Eucalyptus globulus* (c), AELa: aceite esencial de *Lavandula angustifolia* (d), AELh: aceite esencial de *Lavandula hybrida* (e), AERo-A: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* alcanfor (f), AERo-C: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* cineol (g), AESl: aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* (h), AETv: aceite esencial de *Thymus vulgaris* (i).



**Figura 3.8 (Cont.)** Germinación media acumulada (%) para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas) de semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo), en el control ( $0 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) y con los aceites esenciales en concentraciones crecientes ( $2, 10, 20$  y  $200 \mu\text{l ml}^{-1}$ ). AEAd: aceite esencial de *Acacia dealbata* (a), AECl: aceite esencial de *Cistus ladanifer* (b), AEEg: aceite esencial de *Eucalyptus globulus* (c), AELa: aceite esencial de *Lavandula angustifolia* (d), AELh: aceite esencial de *Lavandula hybrida* (e), AERo-A: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* alcanfor (f), AERo-C: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* cineol (g), AESI: aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* (h), AETv: aceite esencial de *Thymus vulgaris* (i).

**Tabla 3.8** Tiempo medio (días) de germinación para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) de las semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo), en el control ( $0 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) y con los aceites esenciales ensayados en concentraciones (C) crecientes (2, 10, 20 y  $200 \mu\text{l ml}^{-1}$ ). AEAd: aceite esencial de *Acacia dealbata*, AECl: aceite esencial de *Cistus ladanifer*, AEEg: aceite esencial de *Eucalyptus globulus*, AELa: aceite esencial de *Lavandula angustifolia*, AELh: aceite esencial de *Lavandula hybrida*, AERo-A: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* alcanfor, AERo-C: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* cineol, AESl: aceite esencial de *Salvia lavandulifolia*, AETv: aceite esencial de *Thymus vulgaris*.

C ( $\mu\text{l ml}^{-1}$ )	ACEITES ESENCIALES				
	AEAd	AECl	AEEg	AELa	AELh
0.00	4.37 ± 0.14 a	4.37 ± 0.14 a	4.37 ± 0.14 a	4.37 ± 0.14 a	4.37 ± 0.14 a
2.00	5.10 ± 0.13 ac	15.94 ± 0.78 b	5.90 ± 0.25 b	21.86 ± 1.27 b	19.70 ± 0.76 b
10.00	6.03 ± 0.32 bc	19.78 ± 0.79 c	9.34 ± 0.71 c		
20.00	6.88 ± 0.31 b		14.31 ± 0.93 d		
200.00					
	AERo-A	AERo-C	AESl	AETv	
0.00	4.37 ± 0.14 a	4.37 ± 0.14 a	4.37 ± 0.14 a	4.37 ± 0.14 a	
2.00	8.57 ± 0.47 b	8.53 ± 0.19 b	17.35 ± 0.37 b	18.00 ± 0.85 b	
10.00		21.59 ± 0.66 c	20.17 ± 0.44 c		
20.00			21.00 ± 1.53 c		
200.00					

Valores medios ± error estándar y test *post hoc* DMS ( $p < 0.05$ ), o test correspondiente, letras iguales para un mismo producto indican que no hay diferencias significativas entre concentraciones. Los valores medios se corresponden con los datos sin transformar, los resultados de la prueba ANOVA, o la correspondiente en su caso, y comparaciones *post hoc* se han interpretado a partir de datos previamente transformados.

La dinámica de la germinación de las semillas de *P. judaica* apenas se modificó tras el alivio de su exposición en el primer grupo de aceites (Fase II-Recuperación), manteniendo los niveles finales de germinación observados en la fase anterior (Fase I-Inhibición); entre ellos con el *T. vulgaris* linalol<sub>1</sub> se produjo el mayor nivel de recuperación encontrado, incrementándose en un 12% con una concentración de  $0.5 \mu\text{l ml}^{-1}$ .

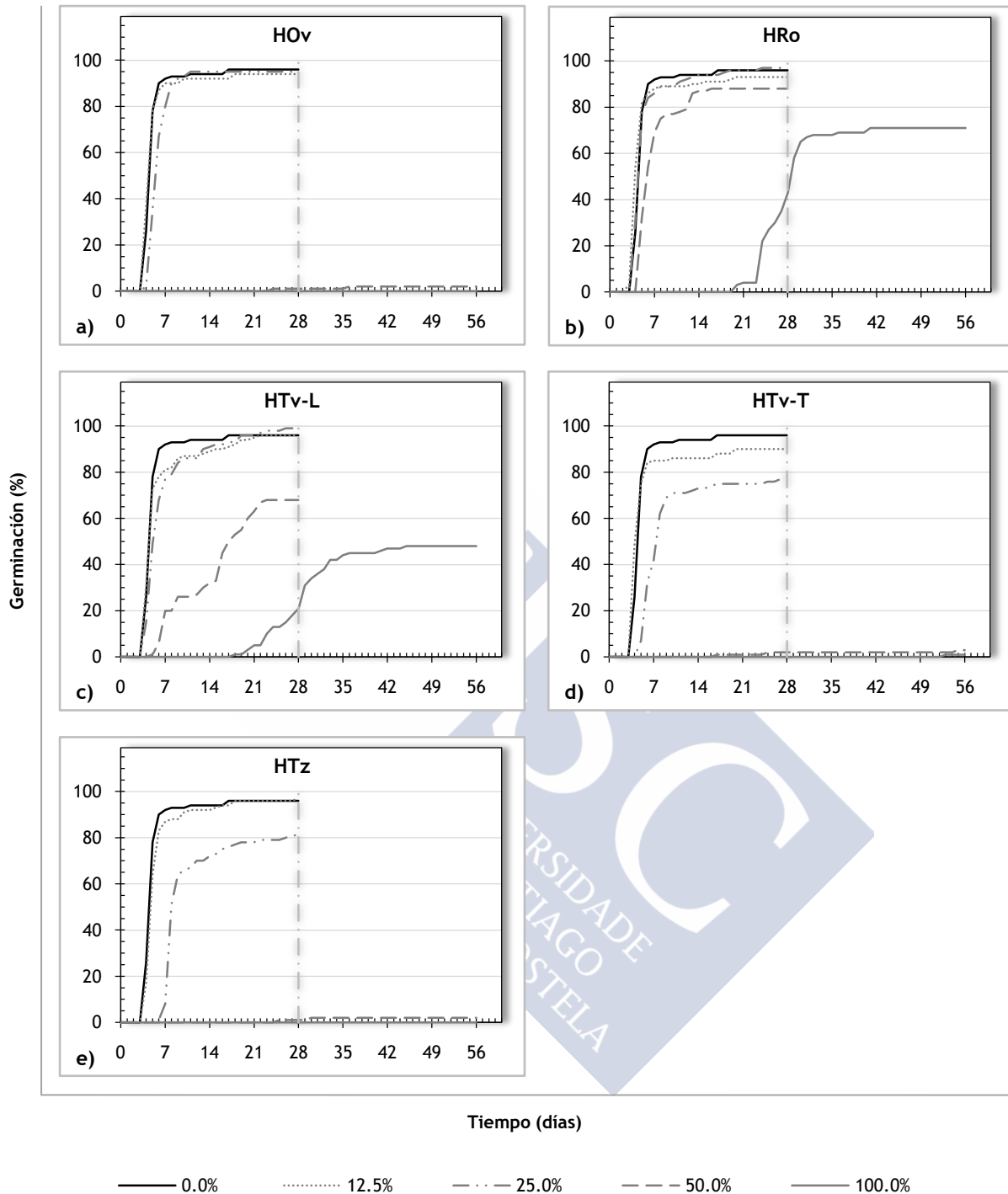
Una tendencia similar se observó en el segundo grupo de aceites, con escasas modificaciones en la germinación; salvo en el aceite de *A. dealbata* con una variación de un 40% ( $200 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) y en los de *L. angustifolia* y *L. hybrida* con una variación de un 50 y 40% respectivamente con una concentración de  $2 \mu\text{l ml}^{-1}$ .

Por lo que se refiere a los hidrolatos (Figura 3.9), los de *O. vulgare*, *T. vulgaris* timol y *T. zygis* (timol) redujeron significativamente el nivel de germinación hasta niveles muy bajos con las dos mayores concentraciones (50, 100%) (Figura 3.9a,d,e), mientras que con el de *R. officinalis* el nivel de germinación se redujo significativamente solamente con la concentración más elevada, hasta valores medios y con el hidrolato de *T. vulgaris* linalol se observó una reducción significativa del nivel de germinación hasta valores bajos con la mayor concentración y hasta valores medios con la tercera (Figura 3.9b,c). Es de señalar que con el hidrolato de *R. officinalis* la germinación se inició tardíamente y se incrementó rápidamente sin llegar a estabilizarse (concentración del 100%).

En cuanto al tiempo medio de germinación, éste se elevó significativamente cuando lo hizo la concentración en todos los casos, pasando de 5 a 24-25 días para los hidrolatos de *T. vulgaris* linalol y *R. officinalis*, respectivamente, teniendo lugar una germinación más lenta (Tabla 3.9).

La dinámica de la germinación de esta especie se modificó escasamente tras el alivio de su exposición a los hidrolatos (Fase II-Recuperación), destacando el incremento de un 30% para los hidrolatos de *R. officinalis* y *T. vulgaris* linalol en la concentración más elevada.

Destacan por presentar una escasa recuperación de la germinación en concentraciones elevadas (en las que los niveles de germinación son muy bajos) los hidrolatos de *O. vulgare*, *T. vulgaris* timol y *T. zygis* (timol), los dos últimos destacan además por reducir moderadamente la germinación con las concentraciones bajas.



**Figura 3.9** Germinación media acumulada (%) para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas) de semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo), en el control (0%) y con los hidrolatos en *Parietaria judaica* en concentraciones decrecientes (100, 50, 25 y 12.5%). HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* (a), HRo: hidrolato de *Rosmarinus officinalis* (b), HTv-L: hidrolato de *Thymus vulgaris* linalol (c), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (d), HTz: hidrolato de *Thymus zygis* (e).

**Tabla 3.9** Tiempo medio (días) de germinación para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) de las semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo), en el control (0%) y con los hidrolatos ensayados en concentraciones (C) decrecientes (100, 50, 25 y 12.5%). HOv: hidrolato de *Origanum vulgare*, HRo: hidrolato de *Rosmarinus officinalis*, HTv-L: hidrolato de *Thymus vulgaris* linalol, HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis*.

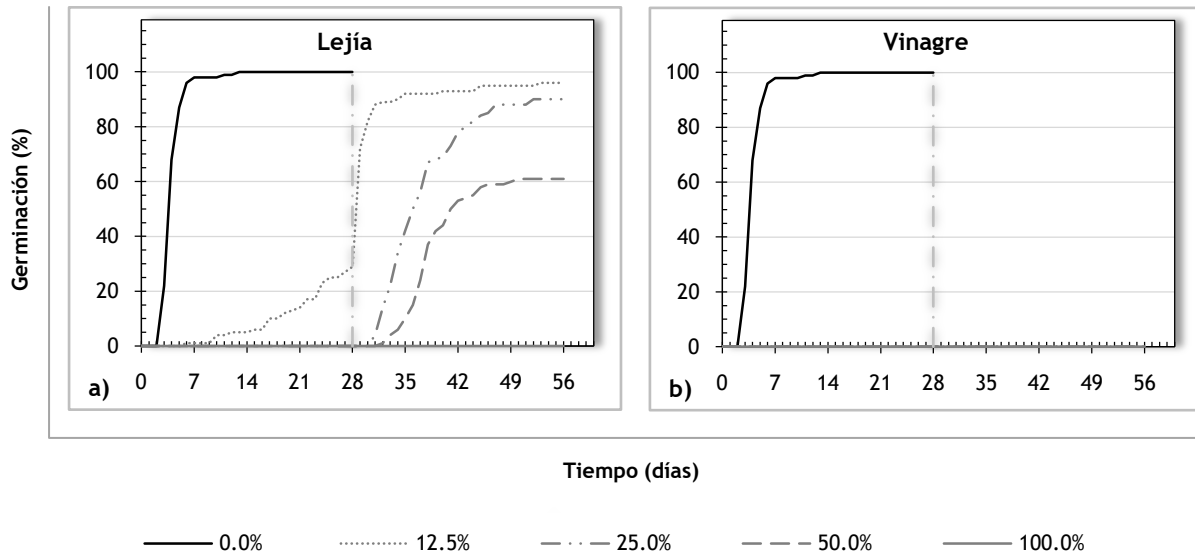
C (%)	HIDROLATOS				
	HOv	HRo	HTv-L	HTv-T	HTz
0.0	5.24 ± 0.08 a	5.24 ± 0.08 a	5.24 ± 0.08 a	5.24 ± 0.08 a	5.24 ± 0.08 a
12.5	5.16 ± 0.24 a	5.01 ± 0.24 a	6.22 ± 0.08 e	5.22 ± 0.31 a	6.05 ± 0.39 a
25.0	6.18 ± 0.16 b	5.77 ± 0.65 a	7.22 ± 0.17 d	7.87 ± 0.54 b	9.64 ± 0.70 b
50.0		6.91 ± 0.43 c	13.66 ± 0.52 c		
100.0		25.03 ± 0.47 b	24.39 ± 1.08 b		

Valores medios ± error estándar y test *post hoc* DMS ( $p < 0.05$ ), o test correspondiente, letras iguales para un mismo producto indican que no hay diferencias significativas entre concentraciones. Los valores medios se corresponden con los datos sin transformar, los resultados de la prueba ANOVA, o la correspondiente en su caso, y comparaciones *post hoc* se han interpretado a partir de datos previamente transformados.

En relación a los productos con propiedades fitocidas (Figura 3.10), la lejía redujo significativamente el nivel de germinación, inhibiéndola totalmente en las tres primeras concentraciones y hasta valores bajos en la cuarta (29%) (Figura 3.10a); con el vinagre se observó una inhibición significativa de la germinación en todas las concentraciones ensayadas (Figura 3.10b).

En cuanto al tiempo medio de germinación, cuando ésta se produjo, se incrementó significativamente con la lejía, pasando de 4 a 20 días, teniendo lugar una germinación más lenta (Tabla 3.10).

La dinámica de la germinación de esta especie únicamente se modificó tras el alivio de su exposición a la lejía (Fase II-Recuperación), incrementándose hasta niveles intermedios, elevados o muy elevados a medida que aumentó la concentración.



**Figura 3.10** Germinación media acumulada (%) para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas) de semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo), en el control (0%) y con los productos con propiedades fitocidas (lejía (a) y vinagre (b)) en concentraciones decrecientes (100, 50, 25 y 12.5%).

**Tabla 3.10** Tiempo medio (días) de germinación para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) de las semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo), en el control (0%) y con los productos con propiedades fitocidas (lejía y vinagre) ensayados en concentraciones (C) decrecientes (100, 50, 25 y 12.5%).

C (%)	PRODUCTOS PROPIEDADES FITOCIDAS	
	Lejía	Vinagre
0.0	4.37 ± 0.14 a	4.37 ± 0.14
12.5	19.89 ± 1.02 b	
25.0		
50.0		
100.0		

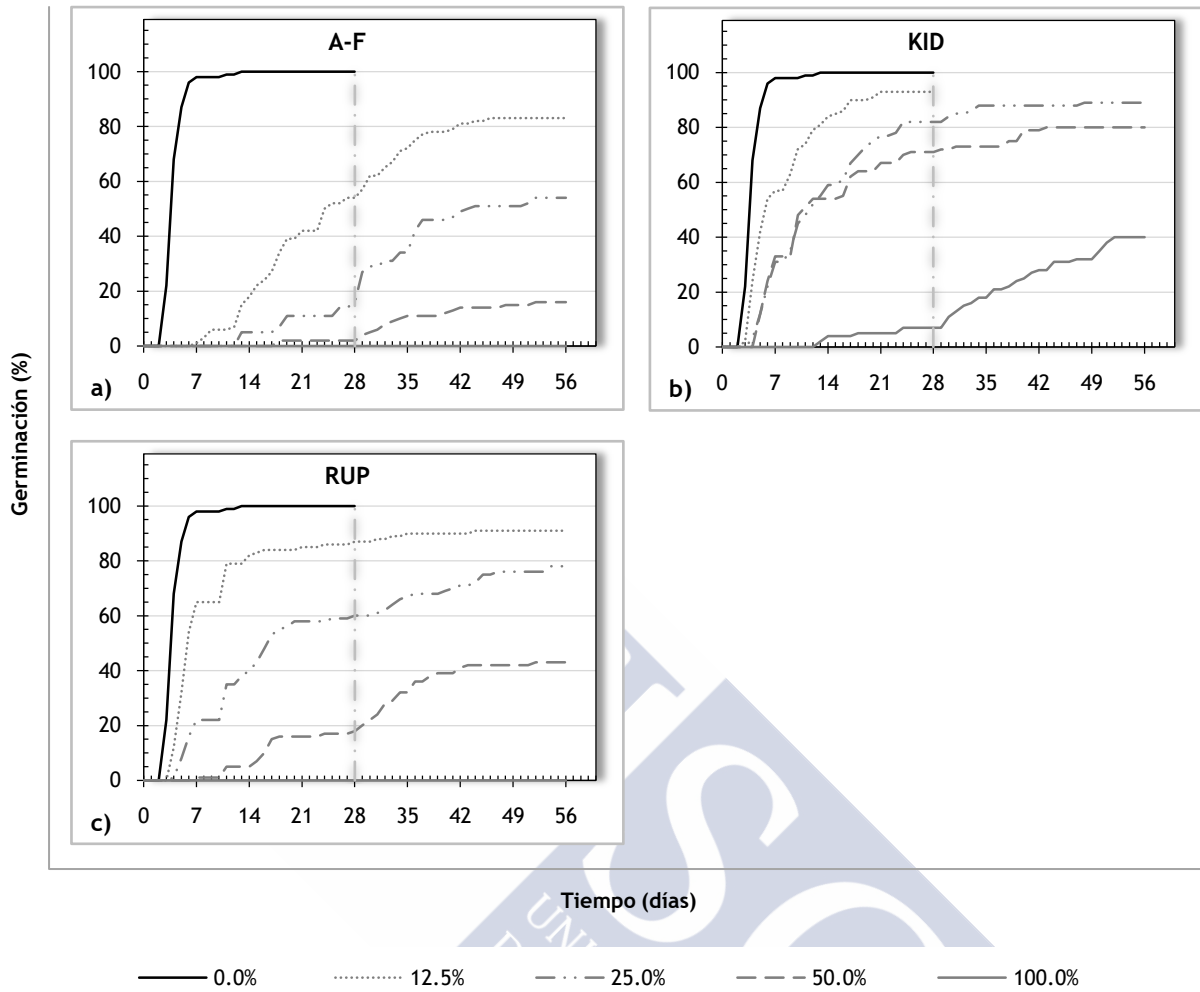
Valores medios ± error estándar, letras iguales para un mismo producto indican que no hay diferencias significativas entre concentraciones. Los valores medios se corresponden con los datos sin transformar, los resultados de la prueba T ( $p < 0.05$ ), o correspondiente, se han interpretado a partir de datos previamente transformados.

En relación con los fitocidas de síntesis química (Figura 3.11), todos redujeron significativamente la germinación con la concentración más elevada (100%) hasta niveles muy bajos o incluso nulos, incrementándose gradualmente la tasa de germinación a medida que la concentración disminuyó (Figura 3.11a,b,c). Destaca la eficacia de Ajax-Finale con niveles muy bajos o bajos de germinación en las concentraciones segunda y tercera (50 y 25%), seguido de Roundup Ultra Plus, con niveles bajos en la segunda.

En cuanto al tiempo medio de germinación, que se produjo más lentamente, de nuevo se incrementó significativamente para estos productos a medida que se lo hizo su concentración, pasando de 4 a 19 días en el Ajax-Finale (Tabla 3.11).

La dinámica de la germinación de esta especie no se modificó únicamente en la concentración más elevada tras el alivio de su exposición al Ajax-Finale y Roundup Ultra Plus (Fase II-Recuperación), y sí lo hizo en mayor o menor medida con las otras concentraciones; mientras que en el Kid lo hizo en todas ellas.

Con el Ajax-Finale se produjo el mayor nivel de recuperación encontrado, incrementándose en un 40%, con la concentración de 25%, y un 30% con la menor (12.5%); lo mismo que se observó para el Kid en su máxima concentración (100%), y en menor medida con el Roundup Ultra Plus al 50%.



**Figura 3.11** Germinación media acumulada (%) para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas) de semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo), en el control (0%) y con fitocidas de síntesis química (Ayax-Finale -A-F- (a), Kid -KID- (b) y Roundup Ultra Plus -RUP- (c) en concentraciones decrecientes (100, 50, 25 y 12.5%).

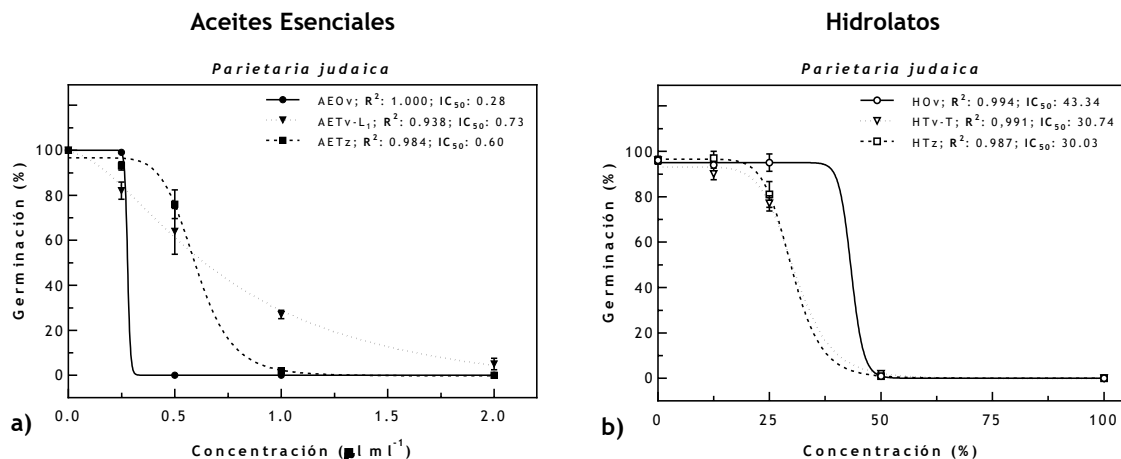
**Tabla 3.11** Tiempo medio (días) de germinación para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) de las semillas de *Parietaria judaica* (sin perianto, en condiciones de fotoperiodo), en el control (0%) y con los fitocidas de síntesis química (Ajax-Finale -A-F-, Kid -KID- y Roundup Ultra Plus -RUP-) ensayados en concentraciones (C) decrecientes (100, 50, 25 y 12.5%).

C (%)	FITOCIDAS DE SÍNTESIS QUÍMICA		
	A-F	KID	RUP
0.0	4.37 ± 0.14 a	4.37 ± 0.14 a	4.37 ± 0.14 a
12.5	17.48 ± 0.89 b	7.91 ± 0.67 d	7.63 ± 0.92 d
25.0	18.87 ± 1.85 b	11.31 ± 0.87 c	11.68 ± 0.64 c
50.0		10.36 ± 0.96 c	15.53 ± 1.38 b
100.0		16.83 ± 1.42 b	

Valores medios ± error estándar y test *post hoc* DMS ( $p < 0.05$ ), o test correspondiente, letras iguales para un mismo producto indican que no hay diferencias significativas entre concentraciones. Los valores medios se corresponden con los datos sin transformar, los resultados de la prueba ANOVA, o la correspondiente en su caso, y comparaciones *post hoc* se han interpretado a partir de datos previamente transformados.

Todos estos bioensayos dosis-respuesta pueden sintetizarse en sus correspondientes curvas sigmoidales (Figura 3.12). En lo que respecta a los aceites esenciales, la reducción de la respuesta germinativa se hizo evidente en su  $IC_{50}$ , con valores muy bajos ( $0.28 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) para el aceite de *O. vulgare* ( $R^2$  1.000), similares al de la mínima concentración ensayada; menos bajos resultaron estos valores para los aceites de *T. zygis* y *T. vulgaris* ( $0.60$  y  $0.73 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) (Figura 3.12a). Por lo que la tendencia del efecto fitotóxico de los aceites estudiados sobre la germinación de las semillas de *P. judaica* es la siguiente: aceite de *O. vulgare* > aceite de *T. zygis* > aceite de *T. vulgaris*.

Respecto a los hidrolatos, el  $IC_{50}$  presentó los valores más bajos para el de *T. zygis* y *T. vulgaris* ( $30.03$  y  $30.74 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) con un ajuste de  $R^2$  0.987 y 0.991, respectivamente, menos bajos para el hidrolato de *O. vulgare* ( $43.34 \mu\text{l ml}^{-1}$ ), con un  $R^2$  0.994 (Figura 3.12b). Por lo que la tendencia del efecto fitotóxico de los hidrolatos estudiados sobre la germinación de las semillas de *P. judaica* es la siguiente: hidrolato de *T. zygis* > hidrolato de *T. vulgaris* > hidrolato de *O. vulgare*.

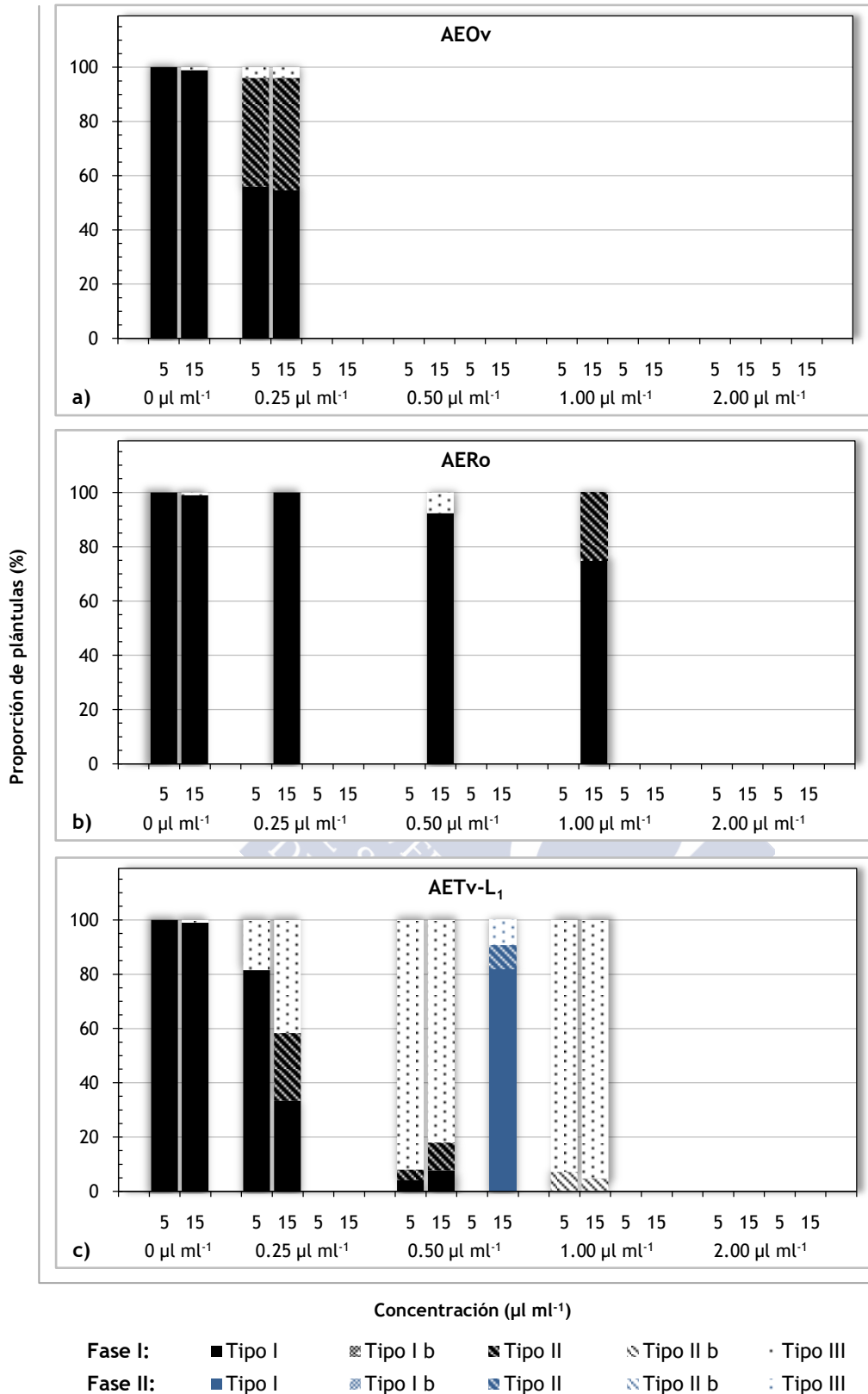


**Figura 3.12** Efecto fitotóxico inhibitor sobre la germinación (%) de las semillas de *Parietaria judaica* de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* (AEOv), *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (AETv-L<sub>1</sub>) y *Thymus zygis* (AETz) (a) y los correspondientes hidrolatos de *Origanum vulgare* (HOv), *Thymus vulgaris* timol (HTv-T) y *Thymus zygis* (HTz) (b), en concentraciones crecientes, evaluado transcurridas cuatro semanas. Los datos fueron analizados mediante una curva sigmoideal dosis-respuesta (pendiente variable), representando el error estándar de la media.  $R^2$ : coeficiente de determinación,  $IC_{50}$ : Concentración Inhibitoria Máxima Media.

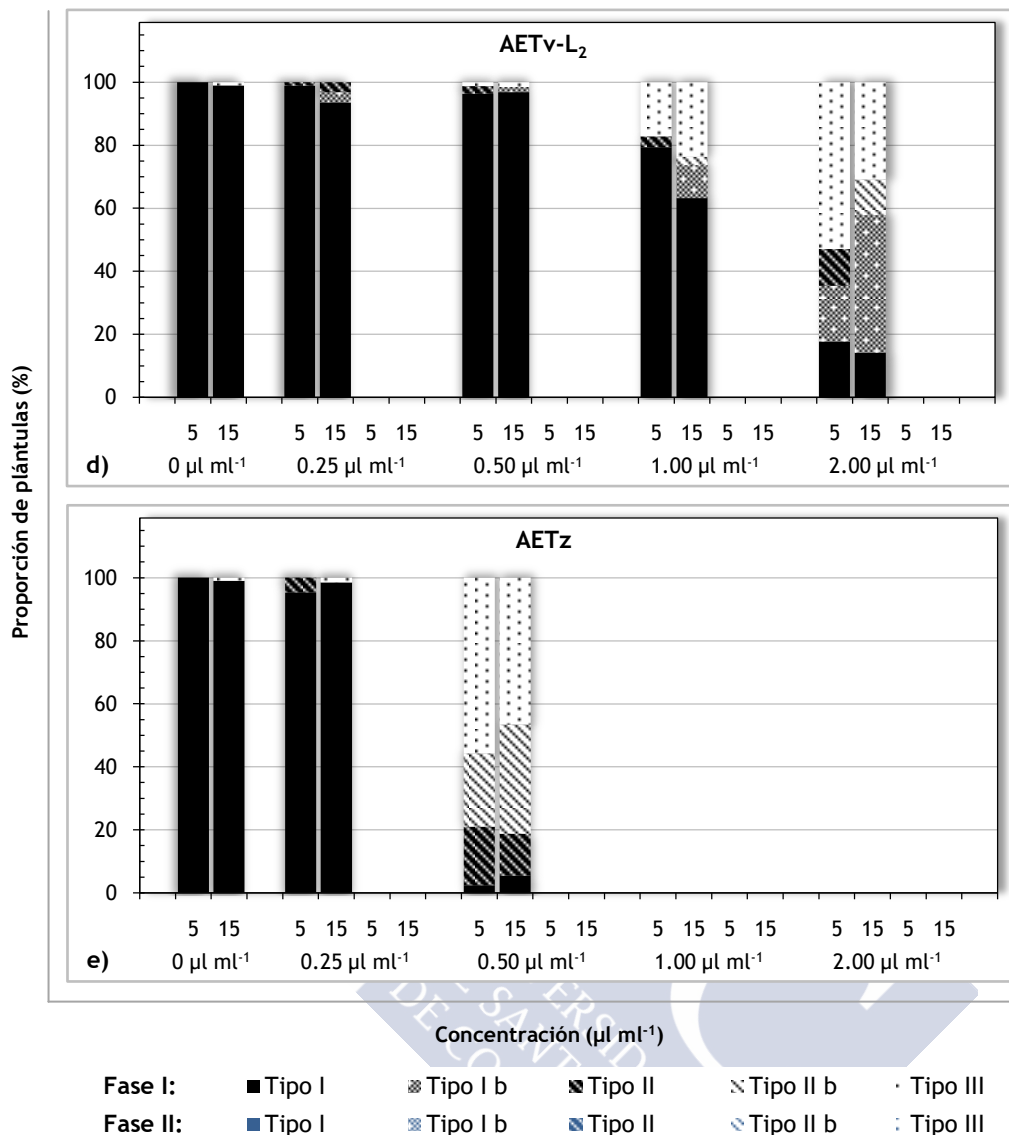
#### 3.4.3.2 Efecto sobre el crecimiento inicial

Además del efecto inhibitor de la germinación anteriormente explicado, cuando ésta se produjo, se detectó un efecto sobre el crecimiento inicial de las plántulas, manifestándose morfológicamente en tipologías diferenciadas.

Las plántulas de aspecto normal predominaron en las concentraciones más bajas de los aceites estudiados, disminuyendo progresivamente su proporción con el incremento de las mismas; en correspondencia, la proporción de plántulas no normales, con diferentes tipologías, se incrementó al aumentar las concentraciones (Figura 3.13). En esta tendencia, los aceites se diferenciaron entre sí en la proporción de los diferentes tipos, con el aceite de *R. officinalis* la proporción de plántulas normales se mantuvo de muy elevada a elevada en todas las concentraciones, como se produjo también con el aceite de *T. vulgaris* linalol<sub>2</sub>, que en la mayor concentración (no analizada en el caso anterior) presentó una proporción muy elevada de plántulas no viables, detectándose toda la gama tipológica (Figura 3.13b,d). Los aceites de *T. vulgaris* linalol<sub>1</sub>, *O. vulgare* y *T. zygis*, presentaron finalmente, en la menor concentración, una proporción de plántulas normales baja, media y muy elevada, respectivamente; que prácticamente no se observaron a partir de dicha concentración, destacando el aceite de *O. vulgare* por la ausencia de germinación (Figura 3.13a,c,e).



**Figura 3.13** Distribución de los tipos de plántulas (%) de *Parietaria judaica* a los 5 y 15 días para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control ( $0 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) y con los aceites esenciales en concentraciones crecientes ( $0.25$ ,  $0.5$ ,  $1$  y  $2 \mu\text{l ml}^{-1}$ ). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (c), AETv-L<sub>2</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>2</sub> (d), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (e).



**Figura 3.13 (Cont.)** Distribución de los tipos de plántulas (%) de *Parietaria judaica* a los 5 y 15 días para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control (0 µl ml<sup>-1</sup>) y con los aceites esenciales en concentraciones crecientes (0.25, 0.5, 1 y 2 µl ml<sup>-1</sup>). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERO: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (c), AETv-L<sub>2</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>2</sub> (d), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (e).

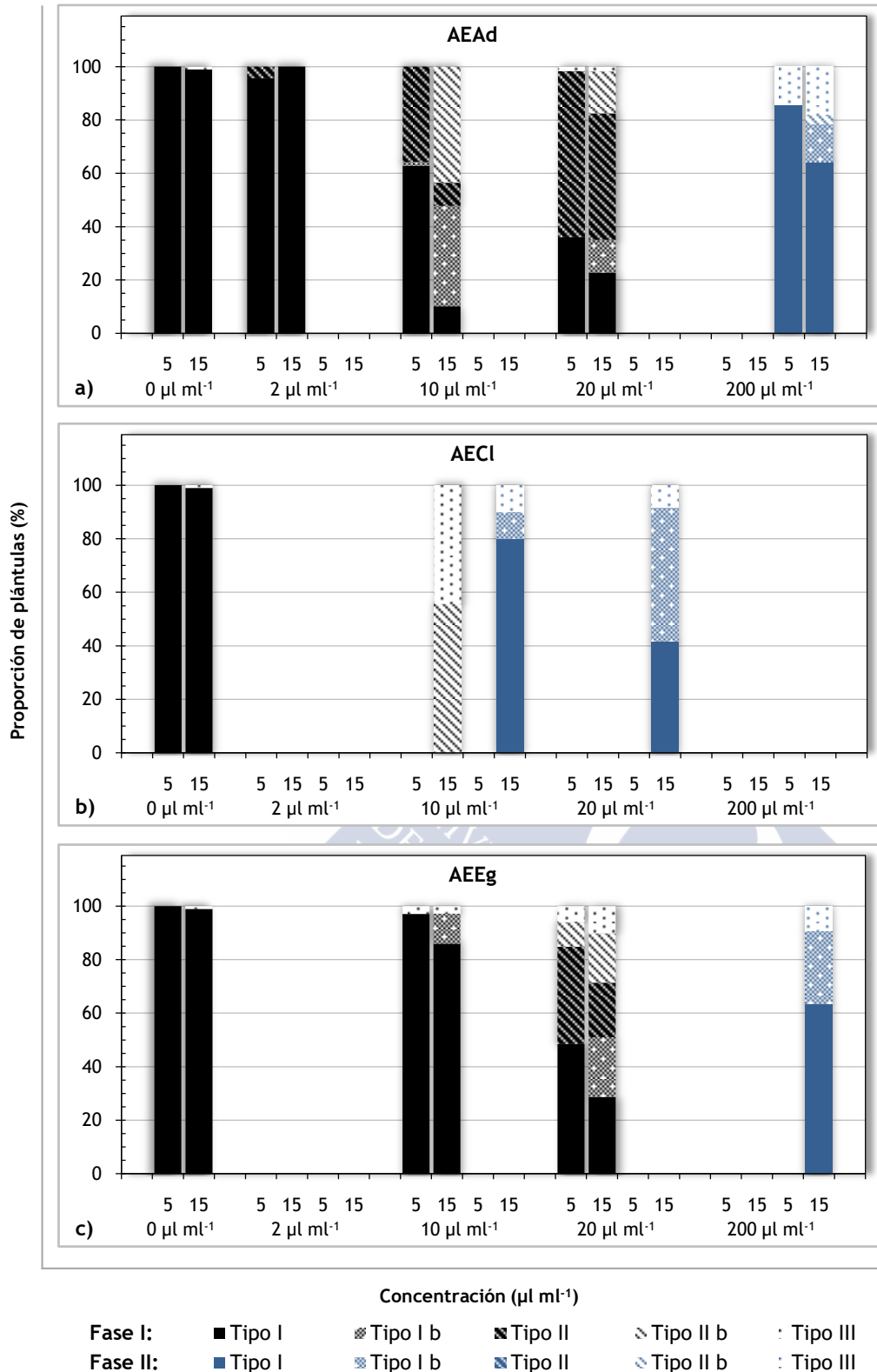
Entre las plántulas no normales el daño fitotóxico de los aceites más eficaces se manifestó en una proporción gradualmente más elevada de ausencia de desarrollo del epicotilo e hipocotilo (Tipo III), con variaciones entre ellos, como se observa claramente en *T. vulgaris* linalol<sub>1</sub>.

Es de señalar que en estos aceites, únicamente con el de *T. vulgaris* linalol<sub>1</sub> (0.5 µl ml<sup>-1</sup>) en una proporción baja de las semillas transferidas a la fase de agua se pudo evaluar su tipología, resultando la mayoría viables.

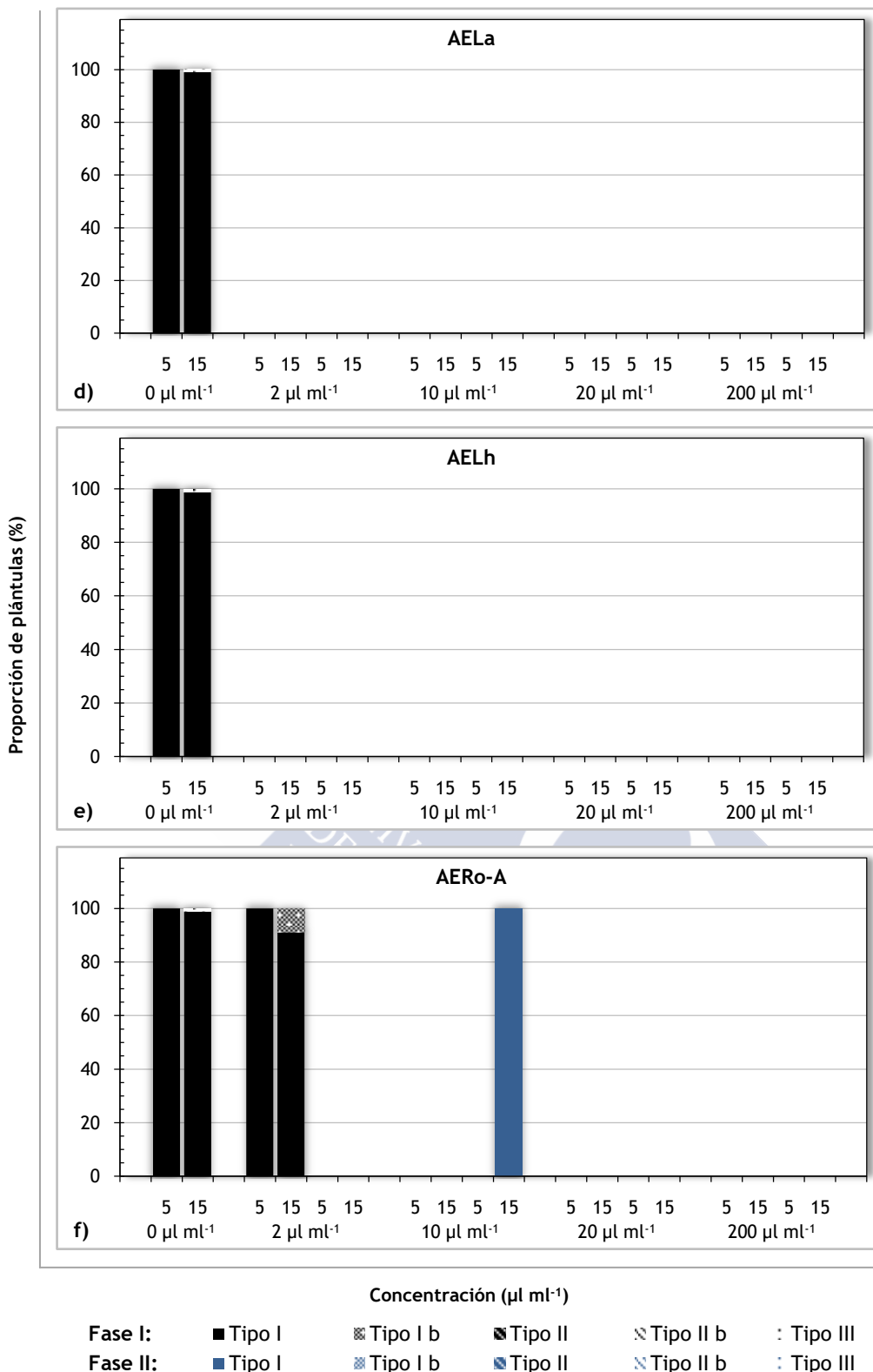
En el segundo grupo de aceites estudiados con concentraciones crecientes (Figura 3.14), de nuevo las plántulas de aspecto normal predominaron principalmente en la concentración más baja ( $2 \mu\text{l ml}^{-1}$ ), disminuyendo acusadamente su proporción con el incremento de la misma; en correspondencia, la proporción de plántulas no normales, con diferentes tipologías, se incrementó considerablemente al aumentar las concentraciones. En esta tendencia, con el aceite de *C. ladanifer* no se observaron plántulas normales, mientras que con los aceites de *A. dealbata* y *R. officinalis* cineol su proporción fue muy baja (Figura 3.14a,b,g). Con el aceite de *E. globulus*, se observó finalmente una proporción de plántulas normales baja, al incrementar su concentración, destacando el aceite de *T. vulgaris*, con una proporción media, observada con rapidez con la concentración más baja (Figura 3.14c,i).

Entre las plántulas no normales el daño fitotóxico de los aceites más eficaces se tradujo en una proporción más elevada de plántulas con ausencia de desarrollo del hipocotilo (Tipo II), con variaciones entre ellos, como se observa claramente en el aceite de *T. vulgaris*.

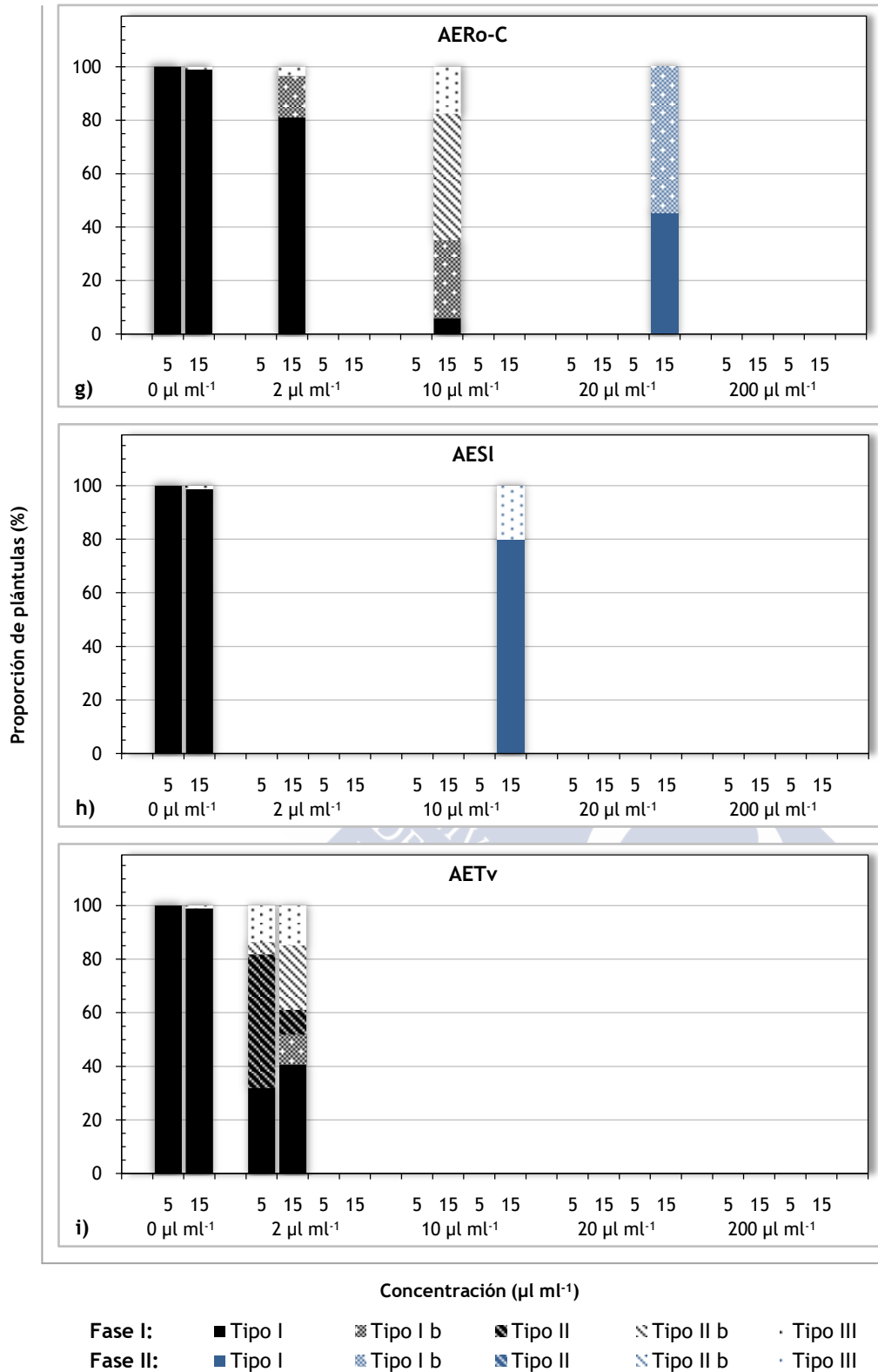
En casi todos los aceites de este grupo se pudo evaluar en alguna concentración la tipología de las plántulas transferidas al agua, observándose en todos los casos una proporción media, elevada o muy elevada de plántulas viables (42-100%); con el aceite de *A. dealbata*, en su máxima concentración ( $200 \mu\text{l ml}^{-1}$ ), se evaluó una proporción media de plántulas, la mayoría viables, mientras que en los otros la proporción de plántulas evaluadas fue baja o muy baja.



**Figura 3.14** Distribución de los tipos de plántulas (%) de *Parietaria judaica* a los 5 y 15 días para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control (0 µl ml<sup>-1</sup>) y con los aceites esenciales en concentraciones crecientes (2, 10, 20 y 200 µl ml<sup>-1</sup>). AEAd: aceite esencial de *Acacia dealbata* (a), AECl: aceite esencial de *Cistus ladanifer* (b), AEEg: aceite esencial de *Eucalyptus globulus* (c), AELa: aceite esencial de *Lavandula angustifolia* (d), AELh: aceite esencial de *Lavandula hybrida* (e), AERo-A: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* alcanfor (f), AERo-C: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* cineol (g), AESl: aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* (h), AETv: aceite esencial de *Thymus vulgaris* (i).



**Figura 3.14 (Cont.)** Distribución de los tipos de plántulas (%) de *Parietaria judaica* a los 5 y 15 días para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control (0 µl ml<sup>-1</sup>) y con los aceites esenciales en concentraciones crecientes (2, 10, 20 y 200 µl ml<sup>-1</sup>). AEAd: aceite esencial de *Acacia dealbata* (a), AECL: aceite esencial de *Cistus ladanifer* (b), AEEg: aceite esencial de *Eucalyptus globulus* (c), AELa: aceite esencial de *Lavandula angustifolia* (d), AELh: aceite esencial de *Lavandula hybrida* (e), AERo-A: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* alcanfor (f), AERo-C: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* cineol (g), AESL: aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* (h), AETv: aceite esencial de *Thymus vulgaris* (i).

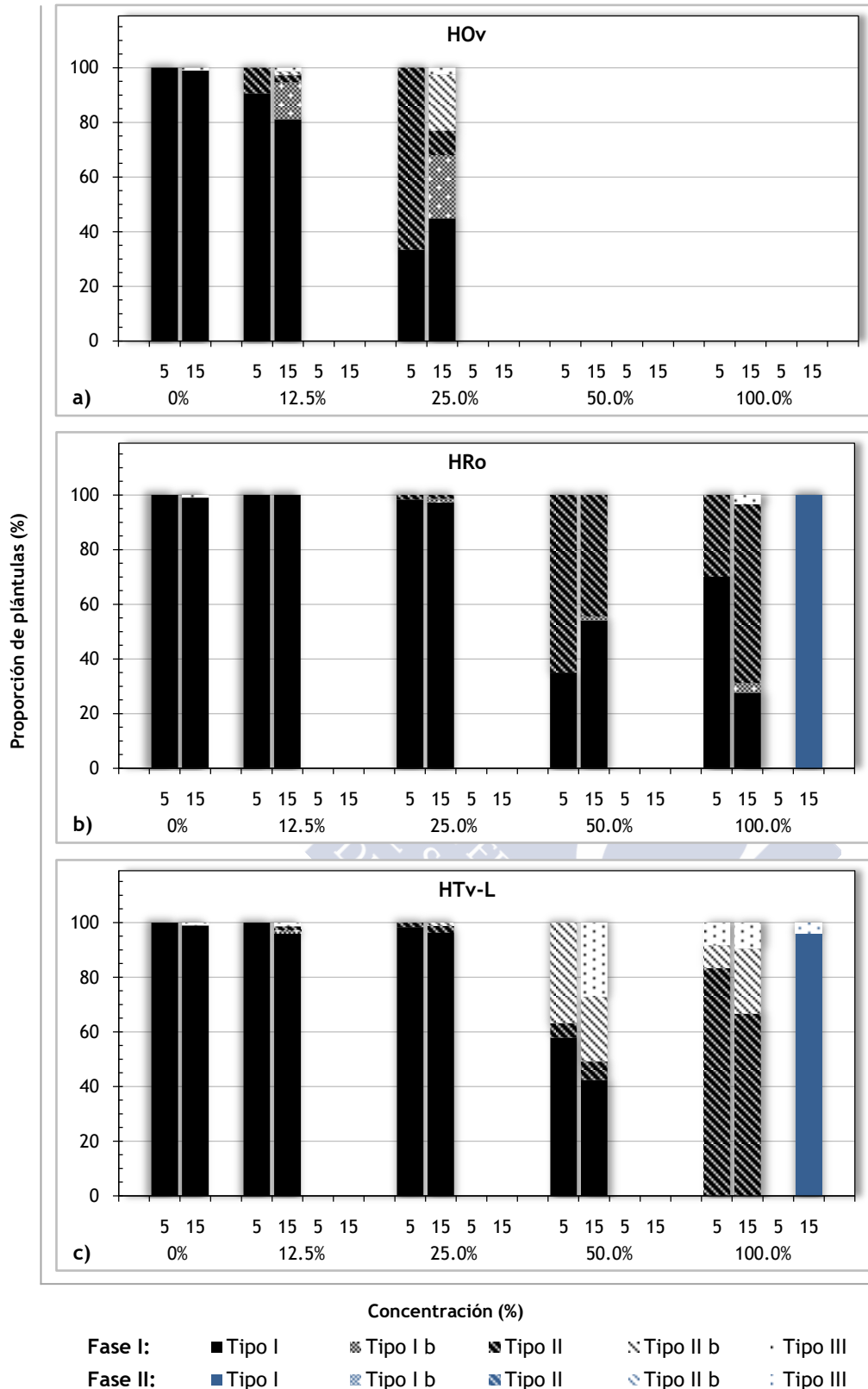


**Figura 3.14 (Cont.)** Distribución de los tipos de plántulas (%) de *Parietaria judaica* a los 5 y 15 días para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control (0 µl ml<sup>-1</sup>) y con los aceites esenciales en concentraciones crecientes (2, 10, 20 y 200 µl ml<sup>-1</sup>). AEAd: aceite esencial de *Acacia dealbata* (a), AECl: aceite esencial de *Cistus ladanifer* (b), AEEg: aceite esencial de *Eucalyptus globulus* (c), AELa: aceite esencial de *Lavandula angustifolia* (d), AELh: aceite esencial de *Lavandula hybrida* (e), AERo-A: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* alcanfor (f), AERo-C: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* cineol (g), AESl: aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* (h), AETv: aceite esencial de *Thymus vulgaris* (i).

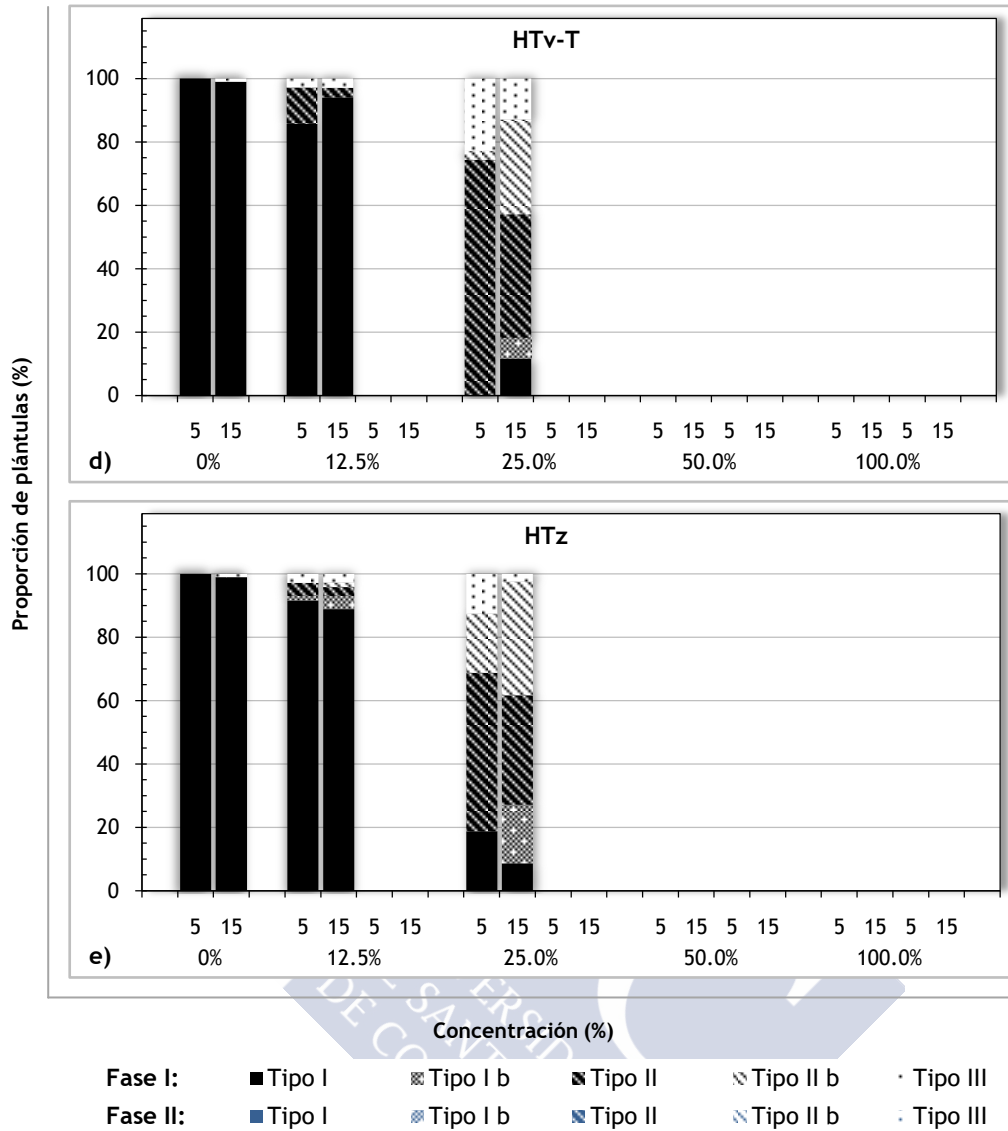
En cuanto a los hidrolatos (Figura 3.15), las plántulas de aspecto normal predominaron en las concentraciones más bajas, disminuyendo progresivamente su proporción con el incremento de las mismas, observándose en consecuencia un incremento de la proporción de plántulas no normales. En esta tendencia, los hidrolatos difirieron entre ellos en la proporción de los diferentes tipos, así con el hidrolato de *R. officinalis* la proporción de plántulas normales se mantuvo muy elevada en las concentraciones más bajas, reduciéndose a valores bajos con la más elevada, y con el hidrolato de *T. vulgaris* linalol no se observaron en esta última concentración plántulas viables, detectándose principalmente plántulas con ausencia de desarrollo del hipocotilo (Tipo II) (Figura 3.15b,c). Los hidrolatos restantes, presentaron finalmente con la concentración más baja (12,5%) una proporción de plántulas normales elevada (*O. vulgare*) y muy elevada (*T. vulgaris* timol y *T. zygis*); que prácticamente no se observaron a partir de dicha concentración para los dos últimos (Figura 3.15a,d,e).

Entre las plántulas no normales, el daño fitotóxico de los hidrolatos más eficaces se manifestó en una proporción más elevada de plántulas con ausencia de desarrollo de su hipocotilo (Tipo II), que presentaron en prácticamente la mitad de los casos síntomas de clorosis (Tipo II<sub>b</sub>).

Únicamente con los hidrolatos de *R. officinalis* y *T. vulgaris* linalol en la máxima concentración (100%), en una proporción baja de las semillas transferidas a la fase de agua se pudo evaluar su tipología, resultando la mayoría viables.



**Figura 3.15** Distribución de los tipos de plántulas (%) de *Parietaria judaica* a los 5 y 15 días para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control (0%) y con los hidrolatos en concentraciones crecientes (12.5, 25, 50 y 100%). HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* (a), HRo: hidrolato de *Rosmarinus officinalis* (b), HTv-L: hidrolato de *Thymus vulgaris* linalol (c), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (d), HTz: hidrolato de *Thymus zygis* (e).



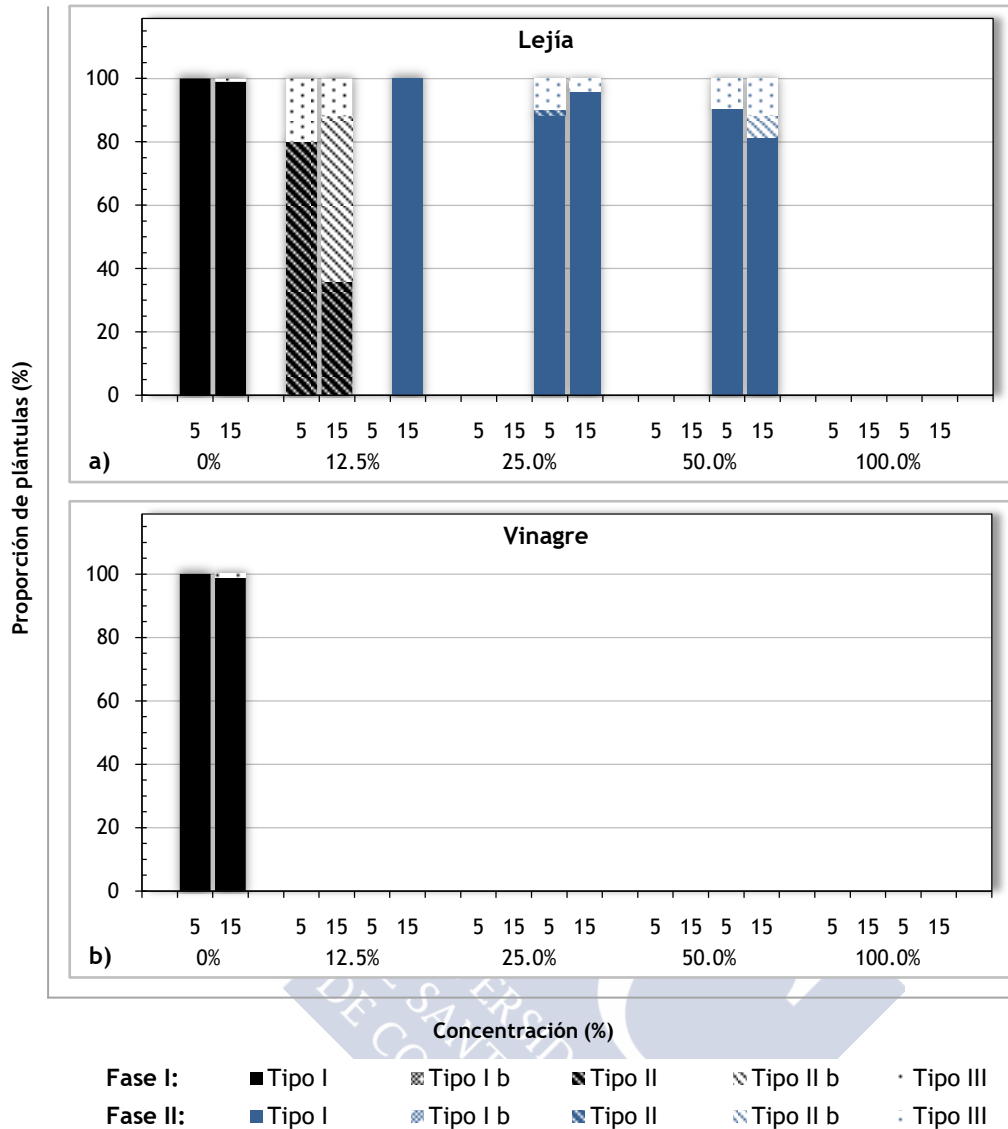
**Figura 3.15 (Cont.)** Distribución de los tipos de plántulas (%) de *Parietaria judaica* a los 5 y 15 días para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control (0%) y con los hidrolatos en concentraciones crecientes (12.5, 25, 50 y 100%). HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* (a), HRo: hidrolato de *Rosmarinus officinalis* (b), HTv-L: hidrolato de *Thymus vulgaris* linalol (c), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (d), HTz: hidrolato de *Thymus zygis* (e).

En relación con los otros productos con propiedades fitocidas (lejía y vinagre) (Figura 3.16), únicamente se pudieron evaluar las plántulas en la concentración más baja en el caso de la lejía, sin observarse plántulas normales, detectándose principalmente plántulas con ausencia de desarrollo del hipocotilo (Tipo II) manifestando sintomatología clorótica (Tipo II<sub>b</sub>) en una proporción media (Figura 3.16a). Destacamos la ausencia de germinación en el vinagre en todas las concentraciones ensayadas (Figura 3.16b).

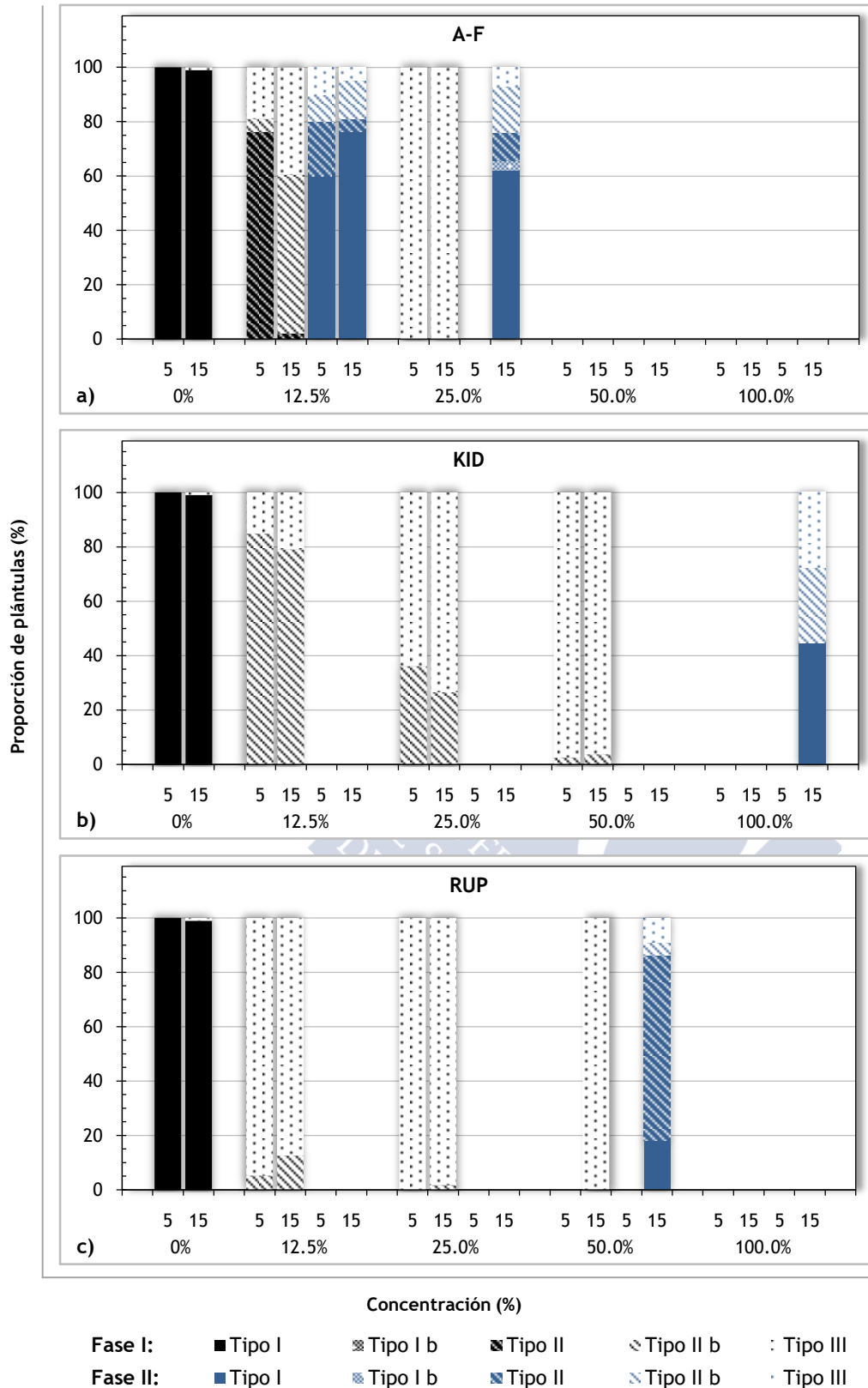
En estos productos, concretamente con la lejía, exceptuando la máxima concentración, en una proporción media de las semillas transferidas a la fase de agua fue posible evaluar su tipología, manteniendo una proporción de plántulas viables de muy elevada a elevada con el incremento de la concentración.

En lo relativo a los productos de síntesis química (Figura 3.17), en ningún caso se observaron plántulas de tipología normal, manifestándose el efecto fitotóxico en plántulas de tipología no normal incluso con concentraciones bajas de todos los productos estudiados, aumentando progresivamente, a medida que lo hace la concentración, la proporción de plántulas que manifiestan el mayor daño fitotóxico (Tipo III), destacando el Roundup Ultra Plus, que mantuvo una proporción muy elevada en la menor concentración (Figura 3.17c).

En todos estos fitocidas sintéticos se pudo evaluar en alguna concentración la tipología de las plántulas en un porcentaje bajo de las semillas transferidas al agua, observándose una proporción media de plántulas normales, o baja (18%) en el caso del Roundup Ultra Plus (concentración del 50%).



**Figura 3.16** Distribución de los tipos de plántulas (%) de *Parietaria judaica* a los 5 y 15 días para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control (0%) y con productos con propiedades fitocidas (lejía (a) y vinagre (b)) en concentraciones crecientes (12.5, 25, 50 y 100%).



**Figura 3.17** Distribución de los tipos de plántulas (%) de *Parietaria judaica* a los 5 y 15 días para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control (0%) y con fitocidas de síntesis química (Ayx-Finale -A-F- (a), Kid -KID- (b) y Roundup Ultra Plus -RUP- (c)) en concentraciones crecientes (12.5, 25, 50 y 100%).

### 3.5 DISCUSIÓN

Las condiciones controladas establecidas han resultado muy adecuadas para la germinación de las semillas de *Parietaria judaica*, tal como se había constatado previamente (Torres *et al.*, 2014), puesto que se ha alcanzado un nivel muy elevado de germinación y con un rápido ritmo, características muy apropiadas para la realización de bioensayos con aceites esenciales, como los que presentamos.

Además, en cuanto a la fenología de la germinación, transcurrido un breve periodo inicial (un mes), las semillas mantienen a corto y medio plazo (hasta dos años de almacenamiento en condiciones naturales) su potencialidad germinativa elevada o muy elevada (nivel y ritmo de germinación), independientemente de la presencia del perianto acrescente, lo que justifica su retirada para facilitar la realización de ensayos de germinación, tanto en condiciones de fotoperiodo como de oscuridad; por lo que se pueden considerar sin dormición (Baskin y Baskin, 1998). Además, dicha fenología de la germinación no contribuye a la formación de un banco de semillas permanente en el suelo (o en la pared de la muralla), sino transitorio, característico de aquellas especies cuyas semillas germinan en otoño (Thompson y Grime, 1979).

#### **Efecto sobre la germinación de las semillas**

Entre los aceites estudiados, se ha producido una reducción/inhibición de la germinación de las semillas de *Parietaria judaica* disminuyendo la concentración inicialmente ensayada ( $2 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) en cinco de ellos; mientras que en los otros nueve dichos efectos se apreciaron incrementándola hasta  $200 \mu\text{l ml}^{-1}$ . Es de señalar que dicha concentración inicial se puede considerar una referencia, puesto que se incluye en el rango ensayado en numerosos estudios del efecto de aceites esenciales sobre la germinación (de Almeida *et al.*, 2010; Verdeguer *et al.*, 2012; Onaran *et al.*, 2014; Fouad *et al.*, 2015).

Entre los del primer grupo (Figura 3.7), el aceite esencial *O. vulgare*, que inhibe totalmente la germinación desde la concentración de  $0.5 \mu\text{l ml}^{-1}$ , ha sido estudiado por Argyropoulos *et al.* (2008), de Almeida *et al.* (2010), encontrando dicho efecto a concentraciones comparables con las nuestras ( $>1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) sobre *Lepidium sativum*, *Raphanus sativus* y *Lactuca sativa*, Onaran *et al.* (2014) sobre *Medicago sativa* y *Lepidium sativum* a una concentración de  $2 \mu\text{l/placa Petri}$  o superior, Fouad *et al.* (2015) sobre *Sinapis arvensis* a partir de una

concentración comparable a la nuestra ( $1 \mu\text{l ml}^{-1}$ ). Por su parte, De Mastro *et al.* (2006) han encontrado un efecto inhibitor del carvacrol (principal compuesto orgánico volátil), a la concentración de  $3 \times 10^{-1} \mu\text{l ml}^{-1}$ , sobre las semillas de *Lolium perenne* y *Amaranthus retroflexus*.

Un efecto similar ha sido encontrado en otras especies de orégano; así Dudai *et al.* (1999) con *Origanum syriacum* encontraron fuerte inhibición de la germinación de varias especies (*Triticum aestivum* y *Amaranthus retroflexus* entre ellas) aplicado a 20-80 ppm, Azirak y Karaman (2008) con *Origanum onites*, Kordali *et al.* (2008) con el aceite esencial de *Origanum acutidens*, que inhibe completamente la germinación de las semillas y el crecimiento de plántulas de *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album* y *Rumex crispus*, atribuyendo al componente carvacrol dicho efecto.

El aceite esencial de *R. officinalis* mostró escasa potencialidad reductora de la germinación, de manera similar al ecotipo analizado por Angelini *et al.* (2003), quienes atribuyen dicha potencialidad a sus componentes cineol y borneol; en todo caso menos eficaz que el aceite esencial de *Thymus vulgaris* a concentraciones más elevadas que las nuestras sobre *Raphanus sativus*, *Capsicum annuum* y *Lactuca sativa*. Este resultado concuerda también con el de Azirak y Karaman (2008), encontrando también menor eficacia de este aceite sobre varias plantas arvenses.

Por su parte, el aceite esencial de *T. vulgaris* linalol<sub>1</sub>, con mayor proporción de linalool, muestra mayor eficacia que el de *T. vulgaris* linalol<sub>2</sub>, como han encontrado también Angelini *et al.* (2003) en diferente quimiotipo. Este es uno de los aceites más estudiados, así Uremis *et al.* (2009) encontraron que es el más eficaz entre cinco aceites, a concentraciones algo más elevadas que las nuestras, sobre la germinación de *Xanthium strumarium*, *Avena sterilis* y *Phalaris brachystachys*, y de Almeida *et al.* (2010) lo incluyen entre los más activos de una docena sobre la germinación de *Raphanus sativus*, *Lactuca sativa* y *Lepidium sativum* a concentraciones similares a las de este estudio; mientras que Grosso *et al.* (2010) destacan su importancia como alternativa a los herbicidas sintéticos por presentar menor efecto sobre las plantas cultivadas. Finalmente, Synowiec *et al.* (2017), lo incluyen en el grupo de los más fitotóxicos entre los 12 estudiados.

Y el aceite esencial de *T. zygis*, que inhibe totalmente la germinación en la concentración inicial ( $2 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) y la reduce hasta valores muy bajos en la concentración de  $1 \mu\text{l ml}^{-1}$ , ha sido menos estudiado en cuanto a su fitotoxicidad; no hemos encontrado referencias, aunque es

bien conocido por su elevada actividad antifúngica, particularmente sobre la botrytis (Wilson *et al.*, 1997), y nematocida (Andrés *et al.*, 2012). Aunque el principal quimiotipo es timol, también se ha descrito linalool (Sáez, 1995).

Entre los del segundo grupo (Figura 3.8), en relación con el aceite esencial de *A. dealbata*, Souza-Alonso *et al.* (2018) han encontrado un efecto desigual de los volátiles de *Acacia longifolia* sobre la germinación de *Trifolium subterraneum* (que no se modifica) y *Lolium multiflorum* (que se reduce).

El aceite esencial *C. ladanifer* ha sido estudiado por Verdeguer *et al.* (2012), encontrando también un efecto desigual sobre la germinación dependiendo de la especie, inhibiendo totalmente la de *Amaranthus hybridus* y casi completamente la de *Conyza canadensis* y *Parietaria judaica*, afectando a *Portulaca oleracea* únicamente a la mayor concentración y sin efecto sobre *Chenopodium album*. En el caso de *Parietaria judaica*, dichos autores han confirmado su efecto inhibitorio de la germinación, menos eficaz en nuestro caso puesto que solamente se inhibe en las concentraciones superiores a  $2 \mu\text{l ml}^{-1}$  (en nuestro caso no se ha detectado *trans*-pinocarveol, monoterpeno oxigenado, principal componente encontrado por Verdeguer *et al.* (2012).

El aceite esencial de *L. angustifolia* ha sido evaluado por Synowiec *et al.* (2017) en concentraciones superiores a las de este estudio, encontrando eficacia intermedia sobre *Avena fatua*, *Bromus secalinus*, *Amaranthus retroflexus* y *Centaurea cyanus*. Nuestros resultados indican una eficacia mayor de este aceite en cuanto al nivel de inhibición de la germinación, incluso con concentraciones más bajas ( $2 \mu\text{l ml}^{-1}$ ).

Por su parte, el aceite esencial de *L. hybrida* ha sido estudiado por Gitsopoulos *et al.* (2013) en concentraciones más bajas que las de este estudio, encontrando eficacia muy escasa sobre *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare* y mayor sobre *Lolium rigidum*; nuestros resultados indican que dicha eficacia puede ser muy elevada al incrementar su concentración ( $10 \mu\text{l ml}^{-1}$  o más).

Los aceites de las dos especies de lavanda muestran una eficacia similar sobre la germinación de *Parietaria judaica* a concentraciones de  $2 \mu\text{l ml}^{-1}$  o mayores, más elevadas que las correspondientes al aceite esencial de *Lavandula stoechas*, muy eficaz sobre *Sinapis arvensis* y *Raphanus raphanistrum* (Azirak y Karaman, 2008). Ambos comparten entre sus principales

constituyentes linalol (monoterpeno oxigenado) y *L. hybrida* presenta geraniol, compuestos que no resultan tan eficaces en el aceite esencial de *Lavandula stoechas*, con linalol y cineol (monoterpeno oxigenado) (Azirak y Karaman, 2008).

En cuanto a los aceites de *R. officinalis* alcanfor y *R. officinalis* cineol, también mostraron eficacia similar, muy elevada con  $10 \mu\text{l ml}^{-1}$  o más. Angelini *et al.* (2003) y Azirak y Karaman (2008) encontraron que este aceite es menos eficaz que el de *Thymus vulgaris*.

En cuanto a la relación entre concentración y efecto fitotóxico, inhibición de la germinación, Cavalieri y Caporali (2010), Dudai *et al.* (1999), muestran en su estudio de 32 aceites de plantas aromáticas que dicha inhibición (sobre semillas de trigo) puede encontrarse, según la concentración, estableciendo un orden que difiere del propuesto

Teniendo en cuenta el nivel de inhibición de la germinación sobre las semillas de *Parietaria judaica*, así como la concentración a la que dicho efecto se produce, nuestra propuesta sobre los aceites resulta ordenada en cuanto a su mayor eficacia: *O. vulgare*, *T. zygis*, *T. vulgaris* linalol<sub>1</sub>, *T. vulgaris* linalol<sub>2</sub>, *R. officinalis*, y *L. angustifolia*, *L. hybrida*, *T. vulgaris*, *S. lavandulifolia*, *R. officinalis* alcanfor, *R. officinalis* cineol, *C. ladanifer*, *E. globulus*, *A. dealbata*.

Entre los hidrolatos estudiados (Figura 3.9), los de *O. vulgare*, *T. vulgaris* timol y *T. zygis* también han mostrado capacidad inhibitoria de la germinación, que puede ser atribuida a la potencial solubilidad en agua de compuestos terpenoides volátiles característicos de los aceites esenciales (Fischer *et al.*, 1994), pudiendo ser fitotóxicos a las bajísimas concentraciones en las que se encuentran en el hidrolato.

Teniendo en cuenta el nivel de inhibición de la germinación sobre las semillas de *Parietaria judaica*, así como la concentración a la que dicho efecto se produce, nuestra propuesta sobre los hidrolatos resulta ordenada en cuanto a su mayor eficacia: *T. vulgaris* timol, *T. zygis*, *O. vulgare*, *T. vulgaris* linalol, *R. officinalis*.

No se ha encontrado eficacia entre los extractos acuosos analizados, al contrario que diferentes estudios como los de Araniti *et al.* (2012) que mostraron el efecto inhibitorio de la germinación de los extractos de 17 plantas sobre *Chenopodium album*, *Sinapis alba* y *Echinochloa crus-galli*, Ali *et al.* (2014) que encontraron efecto reductor del extracto de

*Thymus numidicus* sobre el crecimiento de plántulas de *Medicago sativa* y *Triticum aestivum*, Puig *et al.* (2018) que encontraron efecto inhibitorio de preemergencia del *Eucalyptus globulus* sobre *Lactuca sativa* y *Agrostis stolonifera*. Posiblemente debamos revisar y mejorar la técnica de obtención de dichos extractos, para conseguir una mayor eficacia.

Y entre los otros productos estudiados, la lejía y el vinagre resultaron eficaces como inhibidores de la germinación, y en menor medida lo fueron los productos químicos de síntesis.

La presentación del efecto inhibitor sobre la germinación de las semillas de *Parietaria judaica* de los aceites esenciales e hidrolatos más eficaces en las correspondientes curvas sigmoidales (Figura 3.12), permite realizar su análisis comparativo y establecer su orden de eficacia a partir de la concentración inhibitoria máxima media, tal como han propuesto Fagodia *et al.* (2017) en su estudio sobre la citotoxicidad del aceite de *Citrus aurantiifolia* y otros compuestos. Por lo que permite establecer la siguiente tendencia del efecto fitotóxico de los aceites: *O. vulgare* > *T. zygis* > *T. vulgaris* linalol<sub>1</sub> e hidrolatos: *T. zygis* > *T. vulgaris* timol > *O. vulgare*.

### **Efecto sobre el ritmo de germinación**

El efecto fitotóxico de los aceites estudiados se evidencia, no solamente por la mayor o menor inhibición de la germinación de las semillas de *Parietaria judaica*, sino también porque el tiempo medio de germinación se incrementa (germinación más lenta) a medida que lo hace la concentración (especialmente si con ésta se reduce el nivel) tanto en los que se estudiaron a las concentraciones más bajas (entre los que destaca el aceite de *T. vulgaris* linalol<sub>1</sub> de 4 a 15 días) como a las más elevadas (segundo grupo) (destacando el aceite de *L. angustifolia* con un  $t_m$  que pasa de 4 a 22 días con la concentración inicial); y tanto en los menos eficaces, como el aceite de *R. officinalis* (de 4 a 14 días con la misma concentración) con el que los niveles de germinación se mantuvieron muy elevados, o el aceite de *A. dealbata* (de 4 a 7 días) y *E. globulus* (de 4 a 14 días, ambos con la concentración de 20  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ), como en los de eficacia mayor entre los que destaca el aceite de *T. vulgaris*, (de 4 a 18 días, con la concentración de 2  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ).

Este efecto sobre la disminución del ritmo de germinación significa que, con el incremento de la concentración de compuestos activos, se retrasa el inicio de dicho proceso en una menor o

mayor proporción de semillas, que de este modo pueden escapar/superar al efecto de dichos compuestos, destacando el aceite de *T. vulgaris* linalol<sub>1</sub> en el que alcanzan un nivel muy elevado (0.25  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) y *E. globulus* en el que lo alcanzan medio o elevado (1 y 0.5  $\mu\text{l ml}^{-1}$ , respectivamente); a lo que contribuye también su volatilidad (Dayan *et al.*, 2009). En el caso de los aceites más eficaces (*O. vulgare*, *T. zygis*, *R. officinalis* alcanfor) dicho efecto resulta menos apreciable.

En la mayoría de los estudios sobre el efecto fitotóxico/inhibitorio de aceites esenciales sobre la germinación de las semillas, tanto de especies arvenses como cultivadas, se compara el nivel final encontrado de la misma como indicador de su sensibilidad (Angelini *et al.*, 2003; Gitsopoulos *et al.*, 2013), siendo muy escasos los estudios en los que se analiza el efecto sobre el ritmo de germinación; entre ellos los de Angelini *et al.* (2003), quienes encontraron un incremento del tiempo medio de germinación de las semillas *Lactuca sativa* y *Echinochloa crus-galli* con el aceite de romero, así como de las de *Raphanus sativus*, *Capsicum annum* y *Lactuca sativa* con los monoterpenos carvacrol y cineol.

En este sentido, cuando se observa en un determinado rango de concentraciones que se retrasa considerablemente la germinación puede ocurrir que ésta se produzca en un nivel elevado con posterioridad, cuando se volatilicen los compuestos orgánicos activos, como podría ser el caso del aceite de *L. angustifolia* y *L. hybrida*. De este efecto sobre el ritmo de germinación se deduce la necesidad de realizar este tipo de ensayos con una duración suficiente para que se establezca la dinámica de la germinación, puesto que de no ser así podría sobrevalorarse el efecto del compuesto sobre la germinación, al dejar de evaluarlas.

En nuestro caso, el estudio del efecto sobre la germinación de *Parietaria judaica* realizado con un seguimiento de un mes ha resultado suficiente en la casi totalidad de los compuestos ensayados, en los que se ha estabilizado la dinámica de la germinación, excepto en los casos de las lavandas.

### **Capacidad de recuperación**

El efecto fitotóxico de los aceites esenciales se ha encontrado en numerosas especies, produciendo un retraso o una inhibición de la germinación. Puesto que actúan muy rápido y su actividad es limitada porque la mayoría de sus compuestos activos se volatilizan rápidamente (Dayan *et al.*, 2009), cabe esperar un mayor efecto sobre las plantas con

germinación rápida y concentrada, planteándose la posibilidad de que una proporción de semillas cuya germinación resulta inicialmente inhibida por dicho efecto, variable según el tipo de producto y su concentración, puedan recuperar su potencialidad germinativa cuando cesa su actividad.

Para analizar esta capacidad de recuperación, hemos realizado una aportación metodológica, inédita en este tipo de estudios, al incorporar a los bioensayos, tras una primera fase en la que las semillas están en contacto con el producto a la correspondiente concentración, una segunda fase de transferencia, de las que finalmente presentaron apariencia viable, al agua, para evaluar la recuperación de su capacidad germinativa, de manera similar a los estudios del efecto de la salinidad o el estrés hídrico sobre la germinación de las semillas (Martínez *et al.*, 1992; Guja *et al.*, 2010).

Entre los aceites estudiados, de modo general, el efecto sobre la recuperación de la germinación confirma los resultados de la fase anterior (inhibición). Así, entre los aceites más eficaces (*O. vulgare*, *T. zygis* en el rango de las concentraciones más bajas estudiadas) no se produce recuperación de la germinación, puesto que las semillas han perdido la viabilidad en contacto con los componentes activos de cada aceite. Entre los de eficacia intermedia sí se puede producir recuperación, destacando los aceites de *L. angustifolia* y *L. hybrida* en la concentración más baja analizada ( $2 \mu\text{l ml}^{-1}$ ), con un 50 y 40% respectivamente; y los aceites de *R. officinalis* alcanfor y *R. officinalis* cineol en las concentraciones más elevadas ( $10, 20 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) con un 10 y 15% respectivamente en la mayor de ellas. Y entre los menos eficaces el aceite de *A. dealbata* en la mayor concentración ( $200 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) presenta un nivel de recuperación medio (43%); de modo que este aceite esencial, junto con el aceite de *E. globulus*, son los únicos en los que las semillas han mantenido su capacidad de germinar a máxima concentración. La recuperación, cuando ocurre, lo hace en relación con la concentración de los compuestos activos, como una manifestación de su efecto gradual.

Teniendo en cuenta el efecto conjunto sobre la germinación de las semillas de *Parietaria judaica* (inhibición y recuperación), entre los cuatro aceites mencionados, los de *L. angustifolia* y *L. hybrida*, resultan menos eficaces que *T. vulgaris*, y los de *R. officinalis* alcanfor y *R. officinalis* cineol pasan de tener un efecto inhibitorio total o muy elevado, a elevado ( $20 \mu\text{l ml}^{-1}$ ), modificándose así el orden inicialmente propuesto; y el aceite de *A. dealbata* seguirá siendo el menos eficaz.

## Viabilidad de las plántulas

El efecto fitotóxico de los aceites esenciales, 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 (Setia *et al.*, 2007; Ramezani *et al.*, 2008; Bisio *et al.*, 2010; de Almeida *et al.*, 2010; Verdeguer *et al.*, 2012; Miranda *et al.*, 2015; Pinheiro *et al.*, 2015), asumiendo que las más pequeñas presentan menor capacidad de desarrollar una planta adulta.

Son muy escasos los estudios en los que el efecto fitotóxico sobre el desarrollo inicial de las plántulas se realiza cuantificando dicha capacidad, de desarrollar una nueva planta, mediante el análisis de su morfología. Dudai *et al.* (1999) ya constataron que las semillas germinadas en presencia de aceites esenciales no desarrollaban plántulas normales, reduciéndose el crecimiento sobre todo de su radícula y también del coleoptilo; Angelini *et al.* (2003) han encontrado plántulas anormales (con escasa capacidad de supervivencia, a veces de la misma longitud que las normales), tomando como referencia los criterios de ISTA (2003), de flora arvense y plantas cultivadas en presencia de aceites de tomillo y romero.

En nuestro caso las plántulas de aspecto normal predominaron en las concentraciones más bajas de los aceites estudiados, disminuyendo progresivamente su proporción con el incremento de la misma; en correspondencia, la proporción de plántulas no normales, con diferentes tipologías, se incrementó (Figuras 3.13 y Figura 3.14).

Entre las plántulas no normales el daño fitotóxico de los aceites más eficaces se manifestó en una proporción gradualmente más elevada de ausencia de desarrollo del epicotilo e hipocotilo (Tipo III), variable entre ellos, como se observa claramente en *T. vulgaris* linalol<sub>1</sub>.

Angelini *et al.* (2003) encontraron que el daño más frecuente en plantas anormales de *Echinochloa crus-galli* y *Chenopodium album* es el producido en el desarrollo de la raíz, lo que Gouda *et al.* (2016) relacionan con los monoterpenos como compuestos activos responsables además de los síntomas de clorosis, consecuencia de su efecto sobre la fotosíntesis y el metabolismo.

En cuanto a los hidrolatos (Figura 3.15), nuevamente las plántulas de aspecto normal predominaron en las concentraciones más bajas, disminuyendo progresivamente su proporción con el incremento de las mismas, observándose en consecuencia un incremento de

la proporción de plántulas no normales. Entre las plántulas no normales, el daño fitotóxico de los hidrolatos más eficaces se manifestó en una proporción más elevada de plántulas con ausencia de desarrollo de su hipocotilo (Tipo II), que presentaron en prácticamente la mitad de los casos síntomas de clorosis (Tipo II<sub>b</sub>).

Cuando se produce recuperación de la germinación, en los aceites se desarrolla una proporción media o elevada de plántulas normales; más elevada en el caso de los hidrolatos.

El efecto conjunto sobre la germinación de las semillas de *Parietaria judaica* y la viabilidad de plántulas (inhibición y recuperación) para el grupo de aceites esenciales e hidrolatos se resume en las Tabla 3.18 y Tabla 3.19, respectivamente.



**Tabla 3.18** Síntesis cualitativa del efecto fitotóxico inhibitor de los aceites esenciales ensayados en concentraciones decrecientes (2, 1, 0.5 y 0.25  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) y crecientes (2, 10, 20 y 200  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) sobre la germinación (G) de semillas de *Parietaria judaica*, evaluada al final de la Fase I-Inhibición (FI-cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (FII-cuatro semanas) de modo independiente, y la proporción de plántulas viables (P) en ambas fases. Co: control, AEAd: aceite esencial de *Acacia dealbata* Link, AECl: aceite esencial de *Cistus ladanifer* L., AEEg: aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill., AELa: aceite esencial de *Lavandula angustifolia* Mill., AELh: aceite esencial de *Lavandula hybrida* É. Rev. ex Briq., AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* L., AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L., AERo-A: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* alcanfor L., AERo-C: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* cineol L., AESl: aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* Vahl, AETv: aceite esencial de *Thymus vulgaris* L., AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. linalol (1), AETv-L<sub>2</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. linalol (2), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* Loefl. ex L.

		Co	AEOv				AERo			AETv-L <sub>1</sub>			AETv-L <sub>2</sub>			AETz			
C	( $\mu\text{l ml}^{-1}$ )	0.00	2.00	1.00	0.50	0.25	2.00	1.00	0.50	0.25	2.00	1.00	0.50	0.25	2.00	1.00	0.50	0.25	
F I	G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
	P	●				●	●	●	●		●	●	●	●				●	
F II	G		●	●	●					●	●	●	●		●	●			
	P												●						

		Co	AEAd				AECl			AEEg			AELa			AELh			AERo-A			AERo-C			AESl			AETv		
C	( $\mu\text{l ml}^{-1}$ )	0	2	10	20	200	2	10	20	200	2	10	20	200	2	10	20	200	2	10	20	200	2	10	20	200	2	10	20	200
F I	G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	P	●	●	●	●						●	●	●						●				●							●
F II	G					●	●	●	●					●	●	●	●					●	●	●	●	●	●	●	●	●
	P					●	●	●					●	●				●				●	●	●	●	●	●	●	●	

Fase I-Inhibición a) Germinación (%) ● Elevada ● Media ● Baja b) Proporción de plántulas viables (%) ● Elevada ● Media ● Baja; Fase II-Recuperación a) Germinación (%) ● Elevada ● Media ● Baja b) Proporción de plántulas viables (%) ● Elevada ● Media ● Baja; Concentración de producto eficaz (inhibición de la germinación) ● Concentración de producto eficaz (plántulas no viables)

**Tabla 3.19** Síntesis cualitativa del efecto fitotóxico inhibitor de los hidrolatos ensayados en concentraciones decrecientes (100, 50, 25 y 12.5%) sobre la germinación (G) de semillas de *Parietaria judaica*, evaluada al final de la Fase I-Inhibición (FI-cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (FII-cuatro semanas) de modo independiente, y la proporción de plántulas viables (P) en ambas fases. Co: control, HOv: hidrolato de *Origanum vulgare*, HRo: hidrolato de *Rosmarinus officinalis*, HTv-L: hidrolato de *Thymus vulgaris* linalol, HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis*.

C	C (%)	Co	HOv				HRo				HTv-L				HTv-T				HTz				
		0.0	100.0	50.0	25.0	12.5	100.0	50.0	25.0	12.5	100.0	50.0	25.0	12.5	100.0	50.0	25.0	12.5	100.0	50.0	25.0	12.5	
F I	G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	P	●			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●			●	●			●	●	●
F II	G		●	●			●			●				●	●			●	●				
	P					●				●													

Fase I-Inhibición a) Germinación (%) ● Elevada ● Media ● Baja b) Proporción de plántulas viables (%) ● Elevada ● Media ● Baja; Fase II-Recuperación a) Germinación (%) ● Elevada ● Media ● Baja b) Proporción de plántulas viables (%) ● Elevada ● Media ● Baja □ Concentración de producto eficaz (inhibición de la germinación) ■ Concentración de producto eficaz (plántulas no viables)



### 3.6 CONCLUSIONES

1. El estudio de la germinación de *Parietaria judaica*, que resultó muy elevada y rápida, pone de manifiesto su idoneidad para la realización de bioensayos de toxicidad. Su fenología germinativa muestra que se trata de una planta que forma un banco transitorio de semillas, germinadora de otoño, época del año en la que resultaría posible realizar tratamientos de control eficaces sobre dicho proceso.
2. Los productos estudiados (aceites esenciales, hidrolatos u otros con propiedades fitocidas) han mostrado actividad herbicida en bioensayos *in vitro* sobre la germinación de las semillas de *Parietaria judaica*, inhibiendo o reduciendo su nivel e incrementando su ritmo. En todos ellos existe una relación entre concentración y efecto fitotóxico (nivel de reducción), que nos permite realizar nuestra propuesta inicial, en cuanto a su mayor eficacia, para los aceites: *O. vulgare*, *T. zygis*, *T. vulgaris* linalol<sub>1</sub>, *T. vulgaris* linalol<sub>2</sub>, *R. officinalis*; e hidrolatos: *T. vulgaris* timol, *T. zygis*, *O. vulgare*, *T. vulgaris* linalol, *R. officinalis*.
3. Desde el punto de vista metodológico, se ha realizado una aportación inédita en este tipo de estudios, al incorporar a los bioensayos, tras una primera fase de inhibición, una segunda fase de recuperación de la capacidad germinativa que contribuye a evaluar la eficacia sobre la germinación; y se ha propuesto además, para la evaluación de la eficacia sobre el crecimiento inicial, una clasificación tipológica de las plántulas.
4. En relación con dicha tipología, en general, las plántulas de aspecto normal predominan en las concentraciones más bajas, disminuyendo progresivamente su proporción con el incremento de la misma. En los aceites, entre las plántulas de morfología no normal se obtiene una proporción gradualmente más elevada de aquéllas con ausencia de desarrollo del epicotilo e hipocotilo (Tipo III), y en los hidrolatos, una proporción más elevada de plántulas con ausencia de desarrollo de su hipocotilo (Tipo II), cloróticas en prácticamente la mitad de los casos (Tipo II<sub>b</sub>).





# 4

Control *in situ* de la germinación y del crecimiento inicial de *Parietaria judaica* L.



## **4 Control *in situ* de la germinación y del crecimiento inicial de *Parietaria judaica* L.**

### **4.1 INTRODUCCIÓN**

La investigación relacionada con herbicidas naturales que se recoge en este capítulo forma parte del trabajo que nuestro grupo de investigación propuso en el marco de un Plan de Mantenimiento de la Muralla Romana de Lugo, que persigue una gestión multidisciplinar del monumento, con un apartado específico de control de la flora vascular, encargado a nuestro equipo.

Desde el año 2013 hasta el año 2014, con la finalidad de explorar la posibilidad de ir sustituyendo los productos fitocidas de síntesis química de eficacia conocida (Baylis, 2000; Duke y Powles, 2008) por otros más respetuosos con el medio ambiente y con la salud de la ciudadanía, se realizaron en una primera fase de investigación ensayos *in vitro*, estudiando el efecto, entre otras, de sustancias naturales sobre la germinación de *Parietaria judaica* L.

La propuesta de realización de dichos ensayos se realizó tras el análisis de los resultados correspondientes al seguimiento y control de la vegetación de la muralla en el periodo 2012-14, presentados en esta tesis, que mostraron que *Parietaria judaica* es la planta más abundante, sobre todo en el exterior, pudiendo representar la mitad de la cobertura de la vegetación o incluso más. Además, dichos resultados permitieron conocer la dinámica del crecimiento de esta planta y su recuperación tras los tratamientos integrados de control realizados, que mostraron como, a pesar de la elevada eficacia de los fitocidas aplicados, recuperaba rápidamente su cobertura mediante germinación y crecimiento de nuevas plantas.

Puesto que, como se ha comentado, la eficacia de los tratamientos integrados de control llegó a ser muy elevada, no parecía posible mejorarla para conseguir reducir la cobertura de esta planta en la muralla; resultando evidente la necesidad de complementar dichos tratamientos con otros que actuaran más específicamente sobre la germinación de las semillas, integrando así en su control el funcionamiento biológico y ecológico de la planta (Mortensen *et al.*, 2000).

En este sentido, nuestra atención se ha centrado en productos naturales, puesto que ya desde finales del siglo pasado se están desarrollando nuevas técnicas de control, basadas en dichos productos (Dayan *et al.*, 1999), con especial atención a los alelóquímicos como potenciales herbicidas selectivos (Duke *et al.*, 2000), liberados por volatilización, exudación o descomposición de material vegetal (Vyviyan, 2002), presentes en extractos y aceites esenciales de numerosas plantas de interés etnobotánico.

Para ello, en una primera fase, cuyos resultados se presentaron en el capítulo anterior (Control de la germinación y del crecimiento inicial de *Parietaria judaica* L.), mediante la realización de ensayos *in vitro*, se ha evaluado el efecto sobre la germinación de las semillas de *Parietaria judaica* de cerca de una treintena de productos, la mayoría sustancias naturales, entre las cuales cinco resultaron muy eficaces en las concentraciones más bajas estudiadas.

Estos resultados satisfactorios obtenidos en la fase *in vitro* con algunos de los productos naturales y otros ensayados (primera fase), conducen a una secuencia de fases de transferencia tecnológica para verificar la eficacia *in situ* de aquéllos (aceites esenciales/hidrolatos y fitocidas de síntesis química) cuya actividad fitotóxica sobre las semillas y/o plántulas de *Parietaria judaica* había sido constatada previamente.

Son muy escasos los estudios en los que se realiza dicha verificación, bien en invernadero o directamente en el campo, entre ellos los de Verdeguer (2011) que no ha podido verificar el efecto de extractos y aceites sobre cultivos, Singh *et al.* (2005), quienes comprueban en invernadero la eficacia del aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* sobre el crecimiento de *Parthenium hysterophorus*, Benchaa *et al.* (2018), quienes comprueban en invernadero la eficacia de dicho aceite sobre el crecimiento de cuatro especies de plantas arvenses.

En nuestro caso, consideramos que dichos estudios deben ser realizados con carácter preliminar a la utilización directa en el campo de productos con potencialidad bioherbicida, como es el caso de los extractos y aceites, cuyos compuestos activos son en gran parte volátiles (Dayan, 2009), por lo que su efecto puede modificarse en condiciones semicontroladas.

No obstante, nuestra hipótesis es que los productos mantienen su eficacia sobre las semillas en las condiciones ambientales naturales, desde la producción de las semillas (otoño-octubre/noviembre), hasta su germinación (invierno-diciembre/enero), e incluso en primavera,

considerando que la germinación puede ocurrir más allá del primer mes observado en los ensayos *in vitro*.



## 4.2 OBJETIVOS

Verificar el efecto y la duración en condiciones ambientales naturales de los aceites esenciales/hidrolatos y fitocidas de síntesis química, con eficacia comprobada en su evaluación *in vitro*, sobre la germinación de las semillas de *Parietaria judaica* L.

Evaluar *in situ* en condiciones ambientales naturales el efecto y la duración de los tres herbicidas naturales más eficaces sobre la emergencia de plántulas de *Parietaria judaica* L.



## 4.3 MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.3.1 Especies estudiadas

El estudio del control de la flora vascular de la muralla se ha centrado en *Parietaria judaica*, la especie más abundante en los dos paramentos (exterior e interior) y en todas las partes analizadas de éstos. Los tratamientos convencionales aplicados con periodicidad controlan su crecimiento, pudiendo afectarlas totalmente, mientras que se incorporan nuevas plantas que contribuyen a la cobertura, procedentes de germinación de semillas, que emergen a finales del otoño, como se ha evidenciado en el capítulo 2 de esta tesis (Control de la flora de la Muralla Romana de Lugo).

También se ha estudiado *Cymbalaria muralis*, menos abundante en la muralla, puesto que, al estudiar cuantitativamente la emergencia de plántulas *in situ*, en la fase inicial del crecimiento (plántulas solamente con cotiledones) no resultó posible su distinción de *parietaria*, ya que el desarrollo de la primera hoja normal diferenciadora transcurre en su primer mes de crecimiento.

*Parietaria judaica* L. es una especie perteneciente a la familia Urticaceae, se trata de una planta perenne de hojas simples, alternas, pecioladas, de borde entero, con tres nervios basales; sin estípulas, de 1-5x0.5-3 cm, de forma oval -lanceolada u oblongo- lanceolada, con el ápice agudo (Figura 4.1a,b). Las flores se reúnen en fascículos de 3-8(10) flores en las axilas de las hojas; hay flores masculinas, bisexuales y femeninas. Las bisexuales y masculinas tienen el perianto de 3 o 4 lóbulos, acrescente, de hasta 3.5 mm, con pelos delgados, llevan 3 o 4 estambres opuestos a los lóbulos y un ovario rudimentario. Las flores femeninas tienen el perianto formado por 3 o 4 lóbulos, de hasta 2.5 mm, lanceolados, agudos, conniventes y muy pubescentes, el ovario es elipsoidal con estigma sésil o con un estilo linear muy corto. Florece casi todo el año y su polen es un alérgeno importante. Aquenios ovoideo o comprimidos, negruzcos, de hasta 1.3 mm, incluidos en el perianto persistente (Paiva, 2005).



**Figura 4.1** Plantas de *Parietaria judaica* (a y b) y *Cymbalaria muralis* (c y d) en el paramento exterior de la muralla de Lugo.

Se trata de una planta ruderal y viaria, de hábitat saxícola y riparia de ambientes urbanos, hallándose con frecuencia adosada a paredes y muros, y en suelos nitrificados. Se encuentra ampliamente distribuida en el sudoeste de Asia, el sur y oeste de Europa y en la región Mediterránea, introducida en Norteamérica (Tutin, 2006).

Una descripción más detallada se ofrece en el capítulo 3 de esta tesis (Control de la germinación y del crecimiento inicial de *Parietaria judaica* L.).

*Cymbalaria muralis* G. Gaertn., B. Mey. & Scherb., Oekon. es una especie perteneciente a la familia Scrophulariaceae, se trata de una hierba perenne, rastrera, los tallos pueden alcanzar 70 cm de longitud y elevarse 5-30 cm, glabra, sólo excepcionalmente levemente pelosa en los brotes jóvenes (Figura 4.1c,d). Tallos delgados, flexuosos, no volubles, con frecuencia rojizos, lustrosos, glabros. Hojas con limbo de 5-57x6-68 mm, generalmente alternas,

excepcionalmente las inferiores opuestas, de reniformes a suborbiculares, con 5-9 lóbulos (los centrales mayores que los laterales), normalmente tan anchos como largos, de anchamente ovados a triangulares. Las flores son zigomorfas, pentámeras y se disponen solitarias o por pares; cáliz con 5 sépalos soldados en la base, corola bilabiada de color violeta y blanquecino, con venas oscuras, raramente enteramente blancas con un espolón del tamaño del cáliz. El fruto es una cápsula 2,3-4,2 mm de diámetro, largamente pedicelada (hasta 90 mm) y las semillas de 0,9-1,3x0,8-1,2 mm, de anchamente ovoides a subesferoidales, crestadas, con costillas prominentes, estrechas, cortas, raramente levemente anastomosadas, en ocasiones también con tubérculos aislados, de color pardo oscuro a negras (Güemes, 2009).

Crece en muros, huertas, praderas, bordes de caminos, en general en lugares frescos, sombreados o no, aunque también aparece en exposiciones secas y soleadas si tiene cierta humedad edáfica, entre el nivel del mar y 1.200 m de altitud. Originaria, al parecer, del S de los Alpes, E de la antigua Yugoslavia, y C y S de Italia, hasta Sicilia; cultivada desde antiguo como ornamental y ampliamente naturalizada en el Mediterráneo, en toda Europa, desde Suecia y Gran Bretaña hasta Rusia, en las islas atlánticas macaronésicas y caribeñas, en América y en Australia. Distribuida por toda la Península Ibérica y Baleares, siempre en el entorno de poblamientos humanos, donde se considera naturalizada (Güemes, 2009).

#### **4.3.2 Ensayos en condiciones ambientales naturales**

Se realizaron ensayos de germinación para verificar el efecto, en condiciones ambientales naturales, de aceites esenciales (*Rosmarinus officinalis* cineol, *Thymus vulgaris* linalol), aquéllos de los estudiados inicialmente que demostraron mayor eficacia en bioensayos de fitotoxicidad *in vitro* sobre *P. judaica*, y fitocidas de síntesis (Ajax-Finale, Kid, Roundup Ultra Plus) que también lo fueron.

Se emplearon frutos recién producidos de *Parietaria judaica* (en adelante semillas) seleccionados con su perianto (persistente), ya que éste permitió confirmar el color de su madurez por transparencia, previamente almacenados en condiciones interiores de laboratorio (20°C) y oscuridad hasta el momento de inicio de los ensayos.

Para evaluar la germinación de las semillas en cada tratamiento, se prepararon cuatro réplicas de 25 semillas, frutos provistos de perianto, colocando cada una dentro de una compresa de celulosa Pur-Zellin precortada en porciones 4x5 cm<sup>2</sup>, que se dobló a la mitad para conseguir

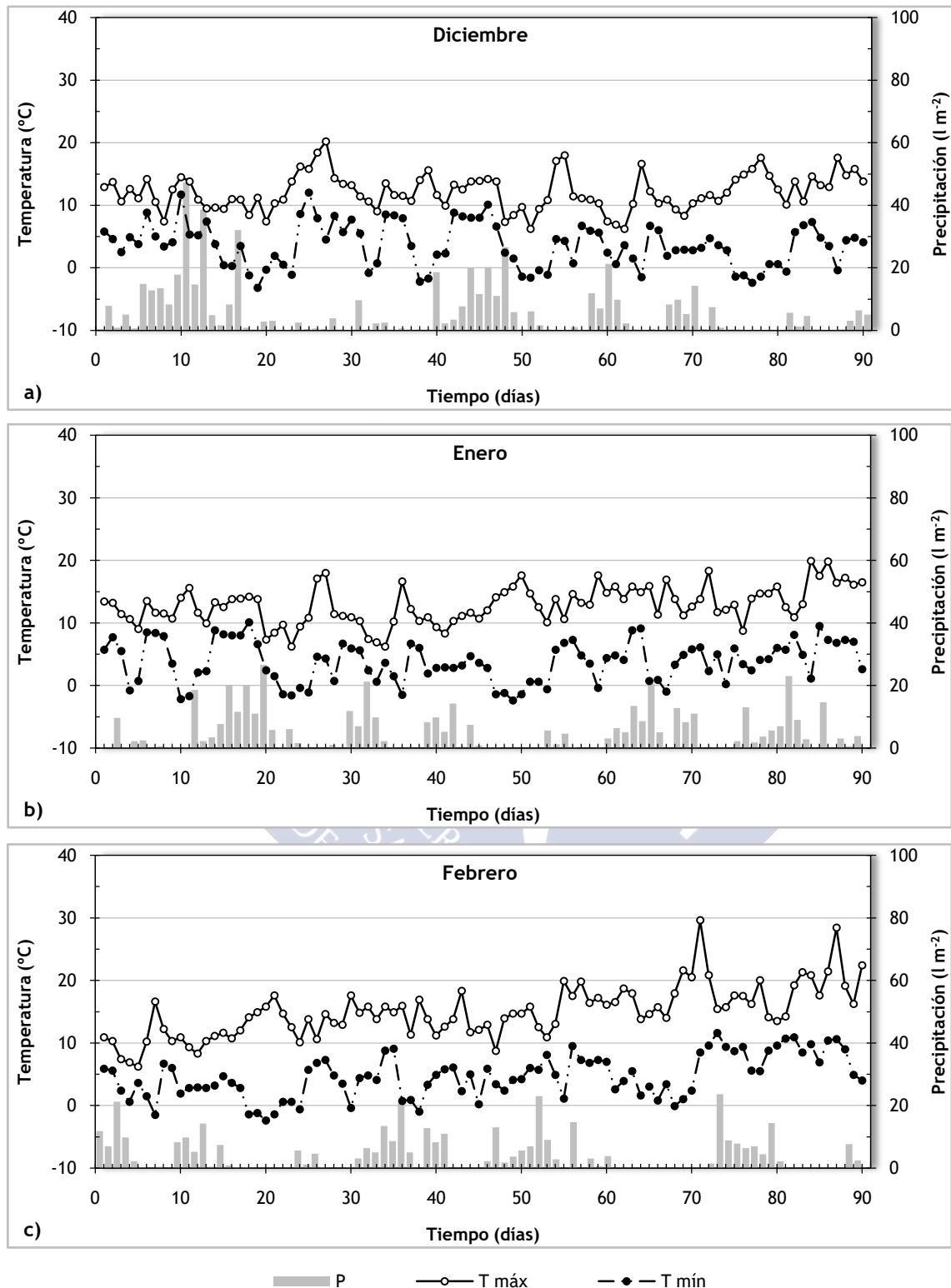
un sobre que albergara los frutos de *Parietaria*, sellándolo por sus márgenes laterales con cinta de carrocero para evitar la pérdida de semillas.

Estos sobres fueron introducidos en una malla plástica de luz 2.0x1.5 mm, ideada para un diseño en bloques aleatorios, con divisiones para albergar las 6 réplicas de los tratamientos (cinco y un control) separadas entre sí para evitar la contaminación entre productos en una misma malla.

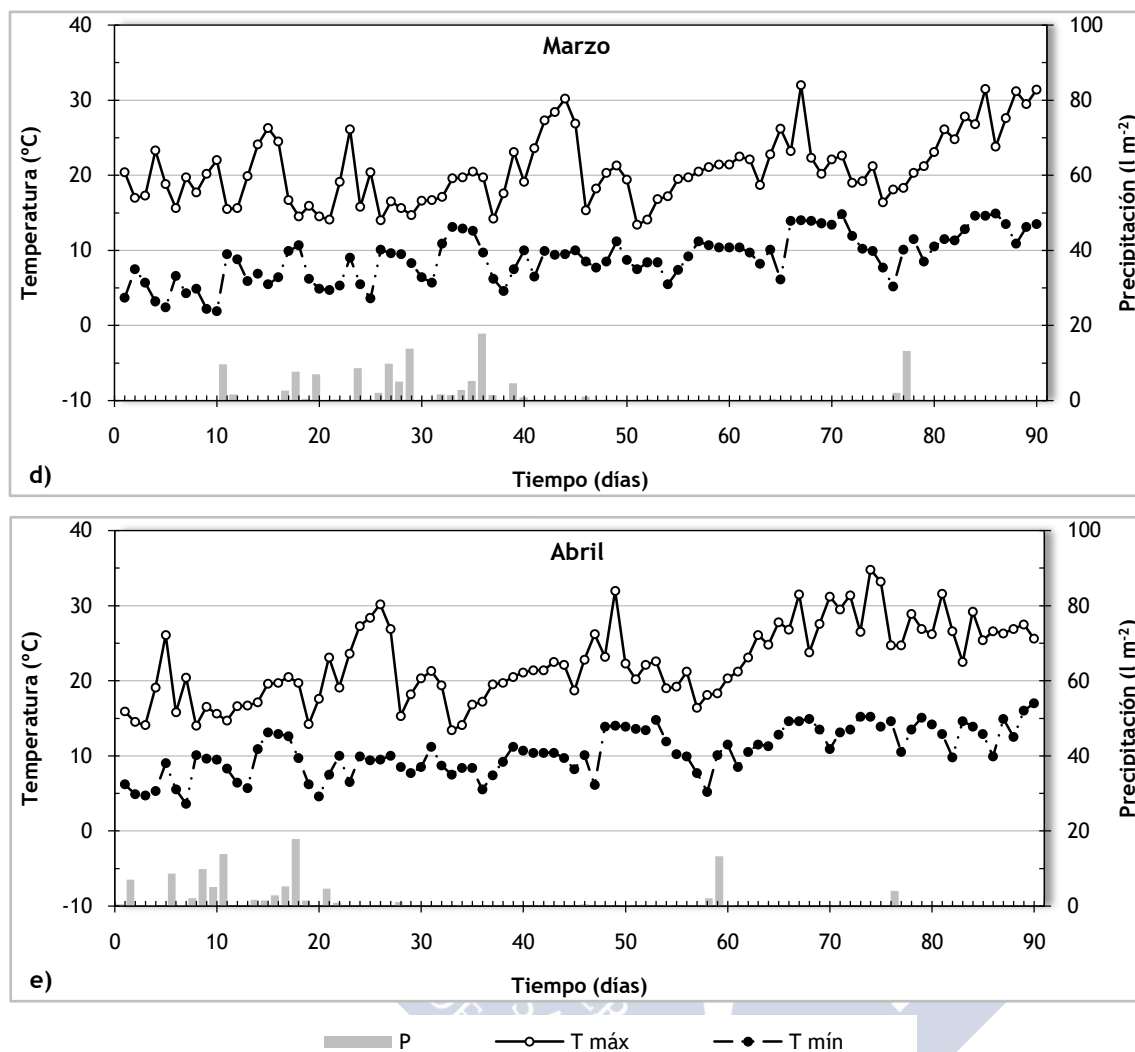
Una vez dispuestos los sobres en la malla, se practicó una pequeña incisión en ella para facilitar la aplicación de los productos (aceites esenciales y fitocidas de síntesis en concentraciones elevadas) directamente sobre la celulosa; se añadió 1 ml de producto, en el caso de los aceites puros (100%), mientras que en el caso de los fitocidas de síntesis se emplearon concentraciones de producto equivalentes a las utilizadas en su aplicación directa en las paredes de la muralla en los tratamientos de control de la vegetación: Ajax-Finale (Ajax: 2 l/ha, Finale: 4 l/ha); Kid (1 kg/ha); Roundup Ultra Plus (10 l/ha), 400 l/ha de caldo; para lo cual se prepararon disoluciones de volumen 40 ml con concentración equivalente: Ajax-Finale: (0.2 ml Ajax + 0.4 ml Finale)/40 ml agua; Kid: 1 g Kid/40 ml agua; Roundup Ultra Plus: 1 ml RUP/40 ml agua).

Las mallas (bloques) se dispusieron colgadas en una pared al exterior en una de las escaleras de la Escuela Politécnica Superior de Ingeniería de Lugo (EPSE), tratando de reproducir la ubicación de las semillas en la muralla, distribuidas en dos alturas y orientaciones diferenciadas, durante uno y dos meses para evaluar la duración de la eficacia de los productos ensayados, periodo en el que estuvieron sometidas a las condiciones ambientales naturales. La caracterización de las condiciones meteorológicas a las que han estado expuestos los ensayos se presenta en la Figura 4.2.

La germinación se evaluó descolgando los bloques correspondientes al primer y segundo mes, recuperando las réplicas correspondientes a cada tratamiento, y revisándolas con ayuda de una lupa binocular Olympus SZ30, retirando las germinadas entendiendo como tales aquéllas en las que la radícula se observaba claramente, como proponen Boojh y Ramakrishnan (1982), Vigna *et al.* (1983), y como se ha realizado habitualmente en estudios ecológicos de la germinación.



**Figura 4.2** Temperatura máxima (T máx), temperatura mínima (T mín) (°C) y precipitación (P) (l m<sup>-2</sup>) diaria registradas durante los ensayos de germinación de las semillas de *Parietaria judaica* (con perianto, en condiciones naturales) durante la Fase I-Producto (uno o dos meses) y la Fase II-Producto+Agua (un mes más), con los aceites esenciales o fitocidas de síntesis, en intervalos temporales desde su producción (otoño) hasta la primavera siguiente, para los meses de diciembre (a), enero (b), febrero (c), marzo (d) y abril (e) (2015-2016). Datos registrados en la estación meteorológica Campus Lugo (Lugo) (Meteogalicia, 2016).



**Figura 4.2 (Cont.)** Temperatura máxima (T máx), temperatura mínima (T mín) (°C) y precipitación (P) (l m<sup>-2</sup>) diaria registradas durante los ensayos de germinación de las semillas de *Parietaria judaica* (con perianto, en condiciones naturales) durante la Fase I-Producto (uno o dos meses) y la Fase II-Producto+Agua (un mes más), con los aceites esenciales o fitocidas de síntesis, en intervalos temporales desde su producción (otoño) hasta la primavera siguiente, para los meses de diciembre (a), enero (b), febrero (c), marzo (d) y abril (e) (2015-2016). Datos registrados en la estación meteorológica Campus Lugo (Lugo) (Meteogalicia, 2016).

Las semillas no germinadas se pasaron a una nueva fase en la que, manteniéndolas en su propio sobre, éstos se colocaron en placas sobre doble capa de papel de filtro, a las que se añadieron 2 ml de agua destilada por réplica, garantizando así las condiciones idóneas para su germinación, sellándolas posteriormente con papel flexible Parafilm, de esta forma se propiciaba su germinación permitiendo así una evaluación completa de la eficacia de cada producto.

En esta fase se realizaron recuentos semanales de las semillas germinadas durante cuatro semanas, retirándolas en su caso.

Esta metodología de verificación en condiciones naturales del efecto de los productos eficaces *in vitro*, se repitió con regularidad en cinco intervalos temporales, desde la producción de las semillas (otoño) hasta la primavera del año siguiente (tres, cuatro, cinco, seis y siete meses) (2015-2016). De esta forma, se trató de comprobar si la eficacia se mantenía con el cambio en las condiciones naturales y en la edad de las semillas; lo que contribuiría al diseño de un protocolo preciso de su posible aplicación.

Se realizaron ensayos de germinación para verificar el efecto, en condiciones ambientales naturales, de aceites esenciales (*Rosmarinus officinalis* cineol, *Thymus vulgaris* linalol, *Origanum vulgare*, *Thymus zygis* timol) e hidrolato (*Thymus vulgaris* timol) que resultaron eficaces en los estudios *in vitro*, evaluando su comportamiento cuando se limitan las variables que pueden ser controladas (luz, temperatura). Esta metodología se presenta como una variante de la anteriormente expuesta, establecida tras la observación de sus resultados, que evidenciaron la dificultad de verificar la eficacia de los productos sin garantizar la hidratación de las semillas; además, se incorporaron nuevos productos (aceites/hidrolatos) de eficacia demostrada y no se continuaron evaluando los fitocidas de síntesis química ya que nuestras propuestas de control de la vegetación en el monumento romano iban en la dirección de abandonar su uso.

Se realizó un ensayo previo para definir concentraciones, puesto que son muy escasas las publicaciones de referencia de ensayos *ex situ*, repitiendo las mismas dosificaciones que en el ensayo previamente comentado en el caso de los aceites, y manteniendo la mínima dosis eficaz observada *in vitro* en el caso de los hidrolatos. Estos últimos no mantuvieron la eficacia, por lo que la decisión adoptada fue pasar a la máxima dosis eficaz *in vitro*; los aceites sí mantuvieron la eficacia, por lo que se decidió rebajar su dosis (manteniéndola por encima de la máxima eficaz *in vitro*).

Se emplearon nuevamente frutos recién producidos de *Parietaria judaica* (en adelante semillas) con su perianto persistente, aplicando los criterios descritos en el apartado anterior.

Para evaluar la germinación de las semillas en cada tratamiento, los frutos provistos de perianto se colocaron en 4 réplicas de 25 semillas, dentro de una compresa de celulosa Pur-Zellin precortada en porciones 4x5 cm<sup>2</sup>, doblada y sellada lateralmente, procediendo como en el ensayo anteriormente descrito, y además en su parte superior; a cada sobre se le añadió la dosis del producto correspondiente (0.2 ml de aceite o 2 ml de hidrolato), protegiendo la

celulosa con una envoltura de malla térmica permeable para evitar la pérdida de semillas en caso de degradación de la celulosa.

Se colocaron los sobres en bandejas de alveolos (6x6x5cm), dispuestos en portadoras, en exterior en las mismas escaleras de la EPSE durante uno y dos meses para evaluar la duración de la eficacia de los productos ensayados, periodo en el que estuvieron sometidas a las condiciones ambientales naturales. En la Figura 4.3 se observan las condiciones meteorológicas a las que han estado expuestos estos ensayos.

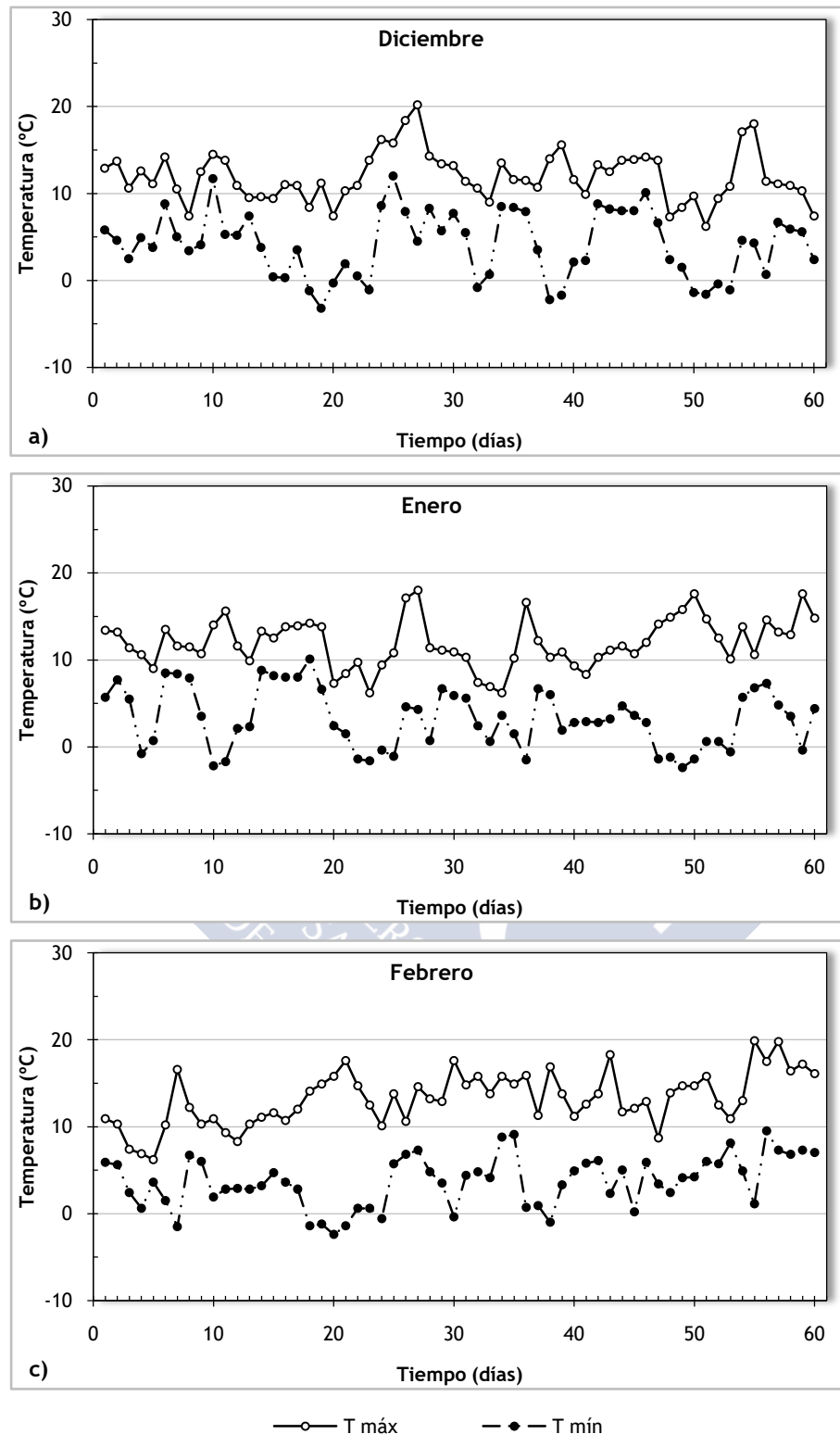
El diseño experimental consistió en el establecimiento de cuatro bloques cada uno formado por seis alveolos, en los cuales se dispuso una réplica de cada producto (5) y un control, etiquetados y ordenados según el resultado de un sorteo aleatorio de bloqueo de variables, que identificó la posición a ocupar la réplica de cada tratamiento en el bloque.

Cada alveolo se rellenó con un volumen de 50 ml (medidos en semihúmedo) de una mezcla, homogeneizada manualmente, de sustrato comercial Pindstrup Universal (turba rubia de *Sphagnum* con estructura fina y gruesa, corteza de pino compostada y perlita; con 1,2 g de NPK y 0.05 ml de humectante por litro de sustrato), perlita y vermiculita (3:1:1), muy adecuada para la realización de ensayos de crecimiento de planta. Cada alveolo se colocó sobre un plato de riego individual, para evitar la transferencia de productos entre alveolos, hidratando el sustrato antes de la siembra.

Una vez hidratado el sustrato, se procedió, según el identificativo de cada alveolo, a la colocación de los sobres tratados sobre el sustrato, y se adicionaron otros 50 ml de sustrato para cubrirlos, de acuerdo con las observaciones previas sobre la potencialidad germinativa de las semillas que pueden germinar en las condiciones de luz y de sombra.

El riego de los alveolos se efectuó a demanda, realizando un control exhaustivo diario de la hidratación del sustrato, asegurando las condiciones óptimas para la germinación y una absorción del agua que evitase la transferencia de producto a la placa y pérdidas del mismo por evaporación.

La germinación se evaluó recuperando los bloques correspondientes al primer y segundo mes, evaluando las réplicas correspondientes a cada tratamiento, y revisándolas con ayuda de una lupa binocular Olympus SZ30, contabilizando las semillas germinadas.



**Figura 4.3** Temperatura máxima (T máx) y temperatura mínima (T mín) diaria (°C) registradas durante los ensayos de germinación de las semillas de *Parietaria judaica* (con perianto, en condiciones naturales) (dos meses), con los aceites esenciales e hidrolato, en intervalos temporales desde su producción, para los meses de diciembre (a), enero (b) y febrero (c) (2015-2016). Datos registrados en la estación meteorológica Campus Lugo (Lugo) (Meteogalicia, 2016).

Esta metodología de verificación en condiciones naturales del efecto de los productos eficaces *in vitro*, se repitió con regularidad en tres intervalos temporales, desde la producción de las semillas (otoño) a invierno (tres, cuatro y cinco meses) (2015-2016). De esta forma, se trató de comprobar, garantizando la hidratación de las semillas, si la eficacia se mantenía con el cambio en las condiciones naturales y en la edad de éstas; lo que contribuiría al diseño de un protocolo preciso de su posible aplicación.

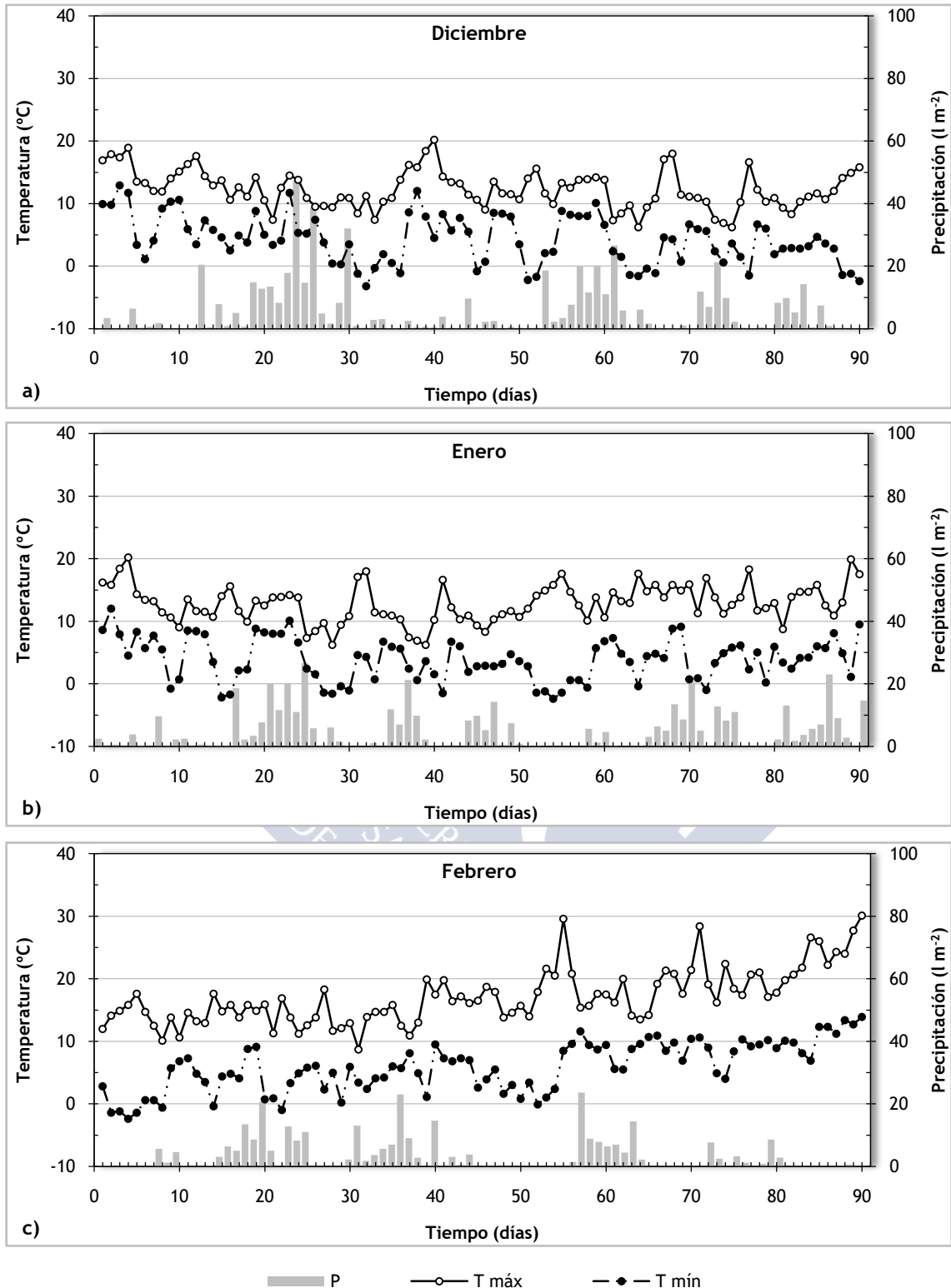
#### 4.3.3 Ensayos de germinación y emergencia *in situ*

Se realizaron también ensayos de germinación *in situ* en la muralla para verificar el efecto, en condiciones ambientales naturales (no controladas), de los mismos aceites esenciales (*Rosmarinus officinalis* cineol, *Thymus vulgaris* linalol, *Origanum vulgare*, *Thymus zygis* timol) e hidrolato (*Thymus vulgaris* timol) que se emplearon en el ensayo anterior.

La selección de semillas y preparación de sobres se realizó siguiendo la metodología del apartado anterior, en el laboratorio, empleando frutos recién producidos (provistos de su perianto), que fueron colocados en 4 réplicas de 25 semillas dentro de sobres de celulosa convenientemente sellados, al que se añadió el producto en la dosificación correspondiente (0.2 ml de aceite o 2 ml de hidrolato) y posteriormente se envolvieron con malla térmica permeable.

Los sobres envueltos tratados individualmente se coloraron en bloques de 6 (una réplica de cada producto y un control), según el resultado de un sorteo aleatorio de bloqueo de variables, entre las lajas de la muralla en aquellas zonas donde se observaron más germinaciones y por lo tanto condiciones favorables para la germinación de las semillas de *Parietaria*. En la Figura 4.4 se observan las condiciones meteorológicas imperantes durante el transcurso de estos ensayos.

La germinación se evaluó retirando los bloques correspondientes al primer y segundo mes, revisando las réplicas correspondientes a cada tratamiento y retirando las semillas germinadas.



**Figura 4.4** Temperatura máxima (T máx), temperatura mínima (T mín) (°C) y precipitación (P) (l m<sup>-2</sup>) diaria registradas durante los ensayos de germinación *in situ* de las semillas de *Parietaria judaica* (con perianto, en condiciones naturales) durante la Fase I-Producto (uno o dos meses) y la Fase II-Producto+Agua (un mes más), con los aceites esenciales e hidrolato, en intervalos temporales desde su producción, para los meses de diciembre (a), enero (b) y febrero (c) (2015-2016). Datos registrados en la estación meteorológica Campus Lugo (Lugo) (Meteogalicia, 2016).

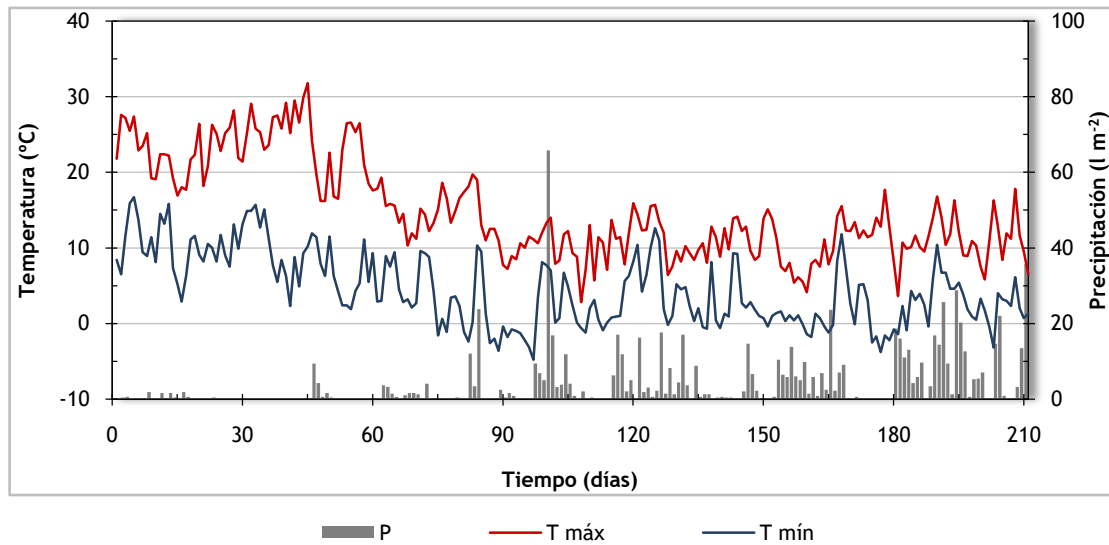
De forma análoga a los ensayos realizados previamente, las semillas no germinadas se pasaron a una nueva fase, manteniéndolas en sus propios sobres, que fueron colocados en placas sobre doble capa de papel de filtro a las que se añadieron 2 ml de agua destilada por réplica, sellándolas posteriormente con papel flexible Parafilm. De esta forma se propició su germinación permitiendo así una evaluación completa de la eficacia de cada producto.

En esta fase se realizaron recuentos de las semillas germinadas con periodicidad de dos veces semanales durante cuatro semanas.

Esta metodología de verificación en condiciones naturales del efecto de los productos eficaces *in vitro*, se repitió con regularidad en tres intervalos temporales, desde la producción de las semillas (otoño) a invierno (tres, cuatro y cinco meses) (2015-2016), tratando de comprobar, como en los supuestos anteriores, si la eficacia se mantenía con el cambio en las condiciones naturales y en la edad de las semillas cuando la aplicación de los productos se realiza *in situ*; complementando la información que contribuyese al diseño de un protocolo preciso para su posible aplicación.

Observados los resultados de los ensayos anteriores y verificada la eficacia de los productos, se planteó la realización de ensayos de aplicación directa *in situ* en las paredes de la muralla romana de Lugo, para lo cual se seleccionaron cuatro lienzos concretos de su paramento exterior (L 04-05, L 05-06, L 06-07, L 08-09), situados entre la Puerta de la Rúa Nova y la Puerta Bispo Odoario, en base a criterios de cobertura de la vegetación (seleccionando aquéllos en los que se observó una mayor cobertura de *P. judaica* y donde cabía esperar una mayor producción y banco de semillas).

Se aplicaron tres tratamientos con aceites esenciales de eficacia verificada en ensayos anteriores (*Thymus vulgaris* linalol, *Origanum vulgare* y *Thymus zygis* timol), en dos épocas diferentes, la primera tras el inicio de las precipitaciones de otoño (mediados de diciembre de 2017), condiciones favorables para la germinación de las semillas de *P. judaica*, y la segunda posteriormente (mediados de enero de 2018), suponiendo un ligero retraso de la misma, siguiendo un diseño experimental que contempló cuatro repeticiones (en los cuatro lienzos), incluyendo un control. En la Figura 4.5 se observan las condiciones meteorológicas registradas durante el transcurso de estos ensayos.



**Figura 4.5** Temperatura máxima (T máx), temperatura mínima (T mín) (°C) y precipitación (P) ( $\text{l m}^{-2}$ ) diaria registradas durante los meses previos y posteriores a la aplicación de los tratamientos con aceites esenciales en la muralla, de seguimiento de su eficacia (septiembre 2017-marzo 2018). Datos registrados en la estación meteorológica Campus Lugo (Lugo) (Meteogalicia, 2018).

Por lo tanto, en cada lienzo, se establecieron un total de ocho parcelas de aplicación, auxiliados por el montaje de un andamio (permanente para el periodo de actividades), una para cada producto y un control, y para dos aplicaciones. Las dimensiones de estas parcelas experimentales de aplicación fueron de 1.2 m (ancho) x 7.5 m (alto),  $9 \text{ m}^2$ , delimitadas evitando las zonas de mayor altura (zonas de menor cobertura de la vegetación), y dejando libre una zona intermedia entre las parcelas en su alineación horizontal de un mínimo de 20 cm para evitar contaminaciones por deriva del producto en el momento de realizar la aplicación.

Los tratamientos de las parcelas dentro de cada lienzo fueron distribuidos siguiendo un diseño experimental de bloques con disposición sistemática de las parcelas, aplicándose los aceites en preparación con base acuosa (agua destilada), a una dosis de  $5 \text{ g m}^{-2}$  ( $50 \text{ kg ha}^{-1}$ ), 250 ml de caldo por cada  $\text{m}^2$ , concentración obtenida a partir de la dosis mínima eficaz observada previamente en laboratorio que fue multiplicada por diez.

A la preparación se le añadió un coadyuvante autorizado para parques y jardines públicos, según el Registro de Productos Fitosanitarios del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Insecticida Key (aceite de parafina al 83%), a una dosis del 2%.

La aplicación en la muralla fue realizada por una empresa especializada en este tipo de trabajos, empleando mochilas manuales, de uso habitual en tratamientos fitosanitarios. Se ejecutó de modo rigurosamente perpendicular a las paredes de la muralla, facilitando la llegada de los productos de control natural hasta las grietas del monumento donde se encuentran las semillas de *P. judaica.*, procurando que se impregnase bien en el sustrato existente entre las piedras.

Para evaluar la eficacia de los tratamientos de control natural, se realizó un seguimiento periódico de cada parcela de aplicación y de las parcelas control, estableciendo inicialmente unidades de muestreo permanente con una superficie de 25x25 cm, incluidas dentro de un cuadrado de 50x50 cm, cuatro réplicas situadas en la zona alta y otras cuatro en la zona media de la muralla, que se fotografiaron con periodicidad quincenal a lo largo de dos meses (con un muestreo inicial en el momento de la aplicación), realizando en laboratorio un recuento de plántulas por réplica (Figura 4.6 y Figura 4.7).

El recuento de plántulas por unidad de muestra se realizó en el momento en que cada plántula presentó sus dos primeras hojas (cotiledones) bien desarrollados, identificando inicialmente *Parietaria* por su morfología ya conocida; con posterioridad, y a medida que las plantas desarrollaban sus hojas, se detectó también la presencia de plántulas de *Cymbalaria* en una proporción menor, con una morfología muy similar, por lo que la evaluación de la emergencia de plántulas se presentó globalmente para ambas especies (*Parietaria* y *Cymbalaria*).

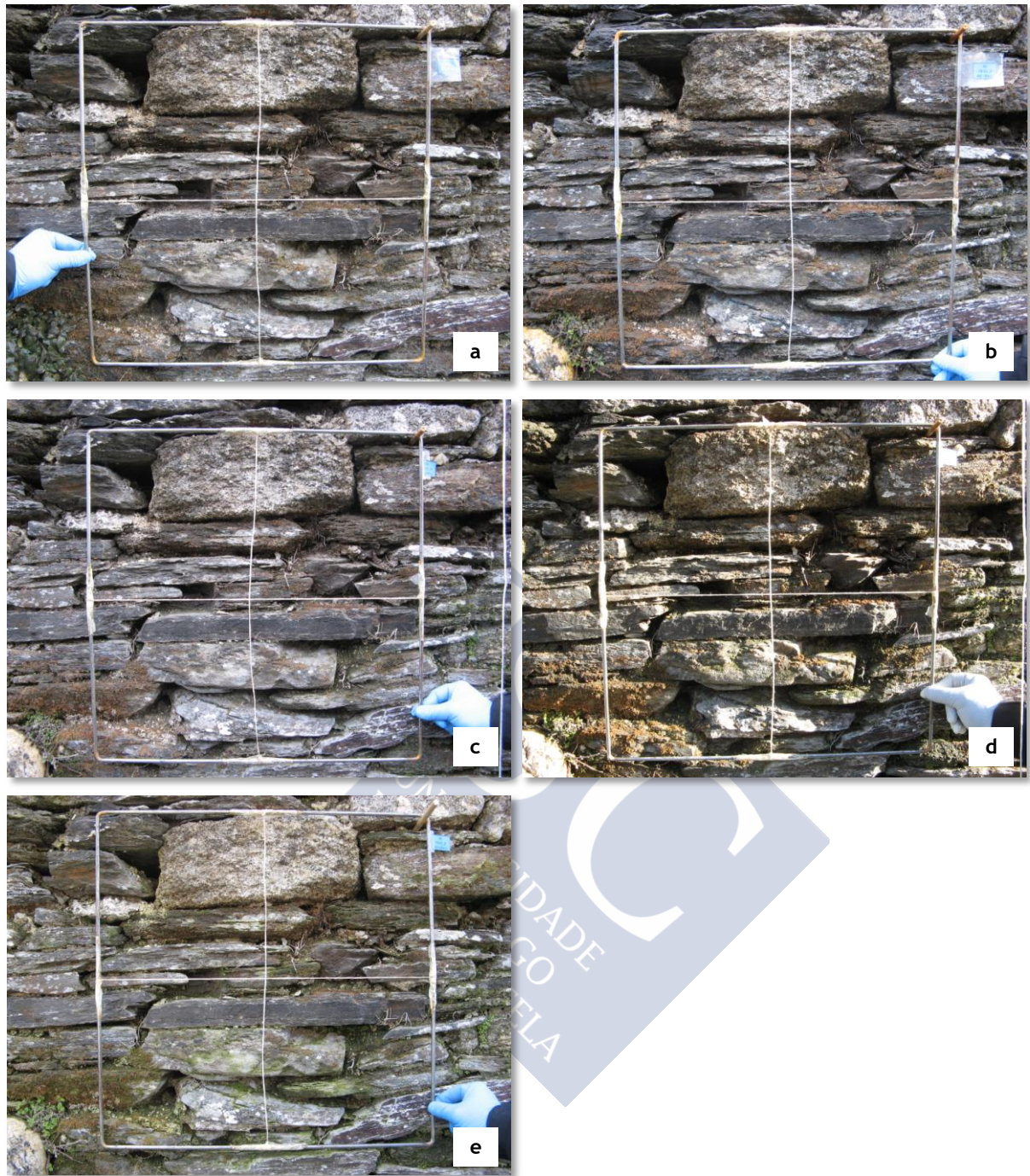


Figura 4.6 Muestreos periódicos en la muralla para 0 (a), 15 (b), 30 (c), 45 (d) y 60 (e) días en una parcela (3) tratada (primera aplicación) con aceite de *Origanum vulgare* en el bloque 1 (lienzo 04-05).



Figura 4.7 Muestreos periódicos en la muralla para 0 (a), 15 (b), 30 (c), 45 (d) y 60 (e) días en una parcela (6) tratada (segunda aplicación) con aceite de *Thymus vulgaris* en el bloque 5 (lienzo 04-05).

#### 4.3.4 Análisis estadístico y representación gráfica

La fase de elaboración, representación y análisis de datos obtenidos se realizó con Microsoft Excel 2010 y el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 27 para Windows, con licencia de la Universidad de Santiago de Compostela.

##### 4.3.4.1 Elaboración de datos

Las variables analizadas de germinación/emergencia, así como la transformación que se aplicó para su posterior análisis se describen a continuación:

- **Variables de germinación/emergencia.** Las variables de germinación/emergencia que se estudiaron fueron las que a continuación se detallan:

- Porcentaje final acumulado de germinación. Para cada uno de los ensayos se recogieron, con la periodicidad determinada, datos de cuantificación de semillas germinadas por réplica, calculando el porcentaje de germinación final acumulado, para la Fase I (inhibición) y globalmente al término de la Fase II (inhibición+agua), si procedió ésta.

Para evaluar comparativamente el efecto de los tratamientos sobre esta variable se han establecido nuevamente cinco niveles cualitativos de germinación de las semillas: muy bajo ( $\leq 10\%$ ), bajo (11-30%), medio (31-70%), elevado (71-89%) y muy elevado ( $\geq 90$ ).

- Número de plántulas emergidas. Para cada uno de los tratamientos aplicados *in situ* se recogieron datos, con periodicidad quincenal, de cuantificación de plántulas emergidas (*Parietaria* y *Cymbalaria*), calculando el número medio por unidad de muestreo, para cada zona de estudio de la muralla (alta o media) y aplicación (primera o segunda).
- **Datos transformados.** Para el análisis de los datos se consideró necesario realizar también una transformación de los valores obtenidos para estas dos variables,

aplicando la transformación habitualmente utilizada en cada caso (Montgomery, 2017).

- Porcentaje final acumulado de germinación. Se calculó el valor de los porcentajes finales de germinación en cada uno de los tratamientos como “ $\arcsin(\sqrt{p})$ ”, donde: arcsin: arcoseno de la función; p: valor de germinación en tanto por uno.
- Número de plántulas emergidas. Se calculó como “ $\log(N + 1)$ ”, donde: log: logaritmo en base 10 de la función; N: número de plántulas emergidas.

#### 4.3.4.2 Análisis y representaciones

El estudio de la germinación de las semillas/emergencia de las plántulas se realizó en tres campos de análisis:

- Representaciones gráficas mediante
  - Diagramas de barras agrupados, representando la germinación final de las semillas con los meses de almacenamiento considerados, relativa a la duración temporal del ensayo y, en su caso, ambas fases analizadas (Fase I-Inhibición, Fase II-Agua), para cada uno de los productos estudiados (pudiendo tratarse del grupo de aceites esenciales/hidrolatos o productos fitocidas de síntesis química).
  - Diagramas de barras agrupados, representando las plántulas emergidas a lo largo del periodo de seguimiento para cada uno de los productos, aplicados en las dos zonas diferenciadas de la muralla en dos momentos temporales distintos.
- Estudio de la distribución y dispersión de los datos mediante estadísticos descriptivos básicos y representaciones gráficas.

- Comparación de medias realizando pruebas ANOVA o pruebas T, en su caso, para detectar diferencias significativas en el porcentaje final de germinación o número de plántulas emergidas correspondiente a cada tratamiento, cuando se cumple la normalidad de los datos (analizada mediante el test Shapiro-Wilk); y análisis Tukey/DMS (Mínima Diferencia Significativa) *a posteriori* ( $p < 0.05$ ), previa verificación de la homogeneidad de su varianza mediante la prueba de Levene, o Games Howell para una asunción de varianzas diferentes (Pardo y Ruíz, 2002; Montgomery, 2017). Cuando los datos no se ajustaron a la normalidad, se compararon las medias con la prueba de Kruskal-Wallis, o U de Mann-Whitney en su caso.



## 4.4 RESULTADOS

### 4.4.1 Germinación en condiciones ambientales naturales

En cuanto al efecto de los aceites y productos fitocidas (de síntesis) estudiados sobre la germinación de las semillas de *Parietaria*, éste no se pudo evaluar inicialmente, transcurridos uno o dos meses, debido a la ausencia de germinación, incluso en el control, pero sí posteriormente tras la hidratación.

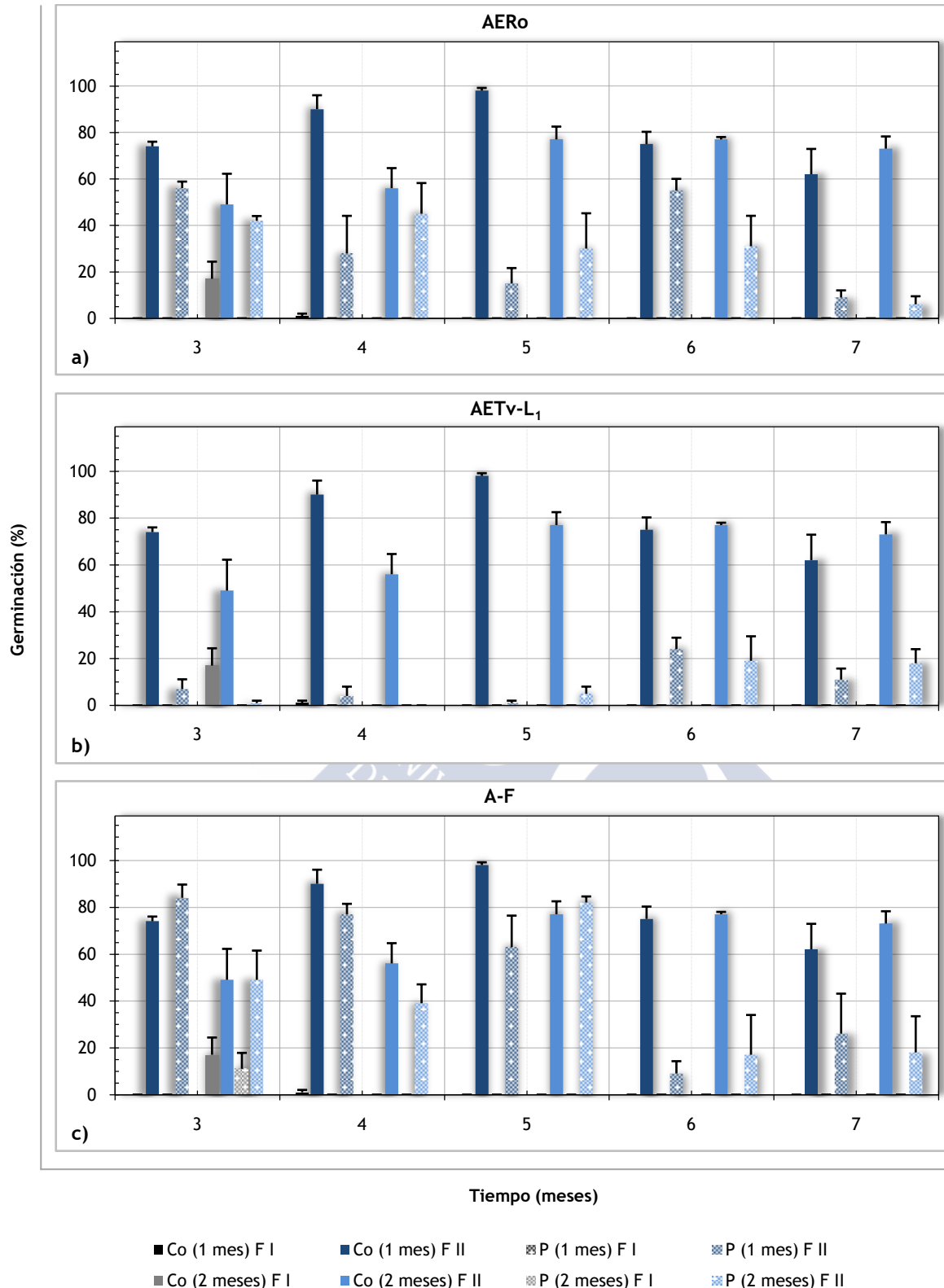
La germinación de *P. judaica* alcanzó, tras la hidratación, niveles elevados o muy elevados en el primer mes en prácticamente todas las condiciones de almacenamiento estudiadas, y fueron significativamente menores en el segundo mes de las tres primeras (Figura 4.8).

En lo relativo a los aceites, con el de *R. officinalis* se observó una reducción significativa de la germinación desde niveles elevados o muy elevados hasta niveles medios en casi todas las condiciones (intervalos temporales) analizadas, y muy bajos en la última de ellas, incluso en el segundo mes (Figura 4.8a), mientras que el aceite de *T. vulgaris* redujo significativamente la germinación hasta niveles bajos o muy bajos en todas las condiciones, efecto que permaneció en el segundo mes (Figura 4.8b).

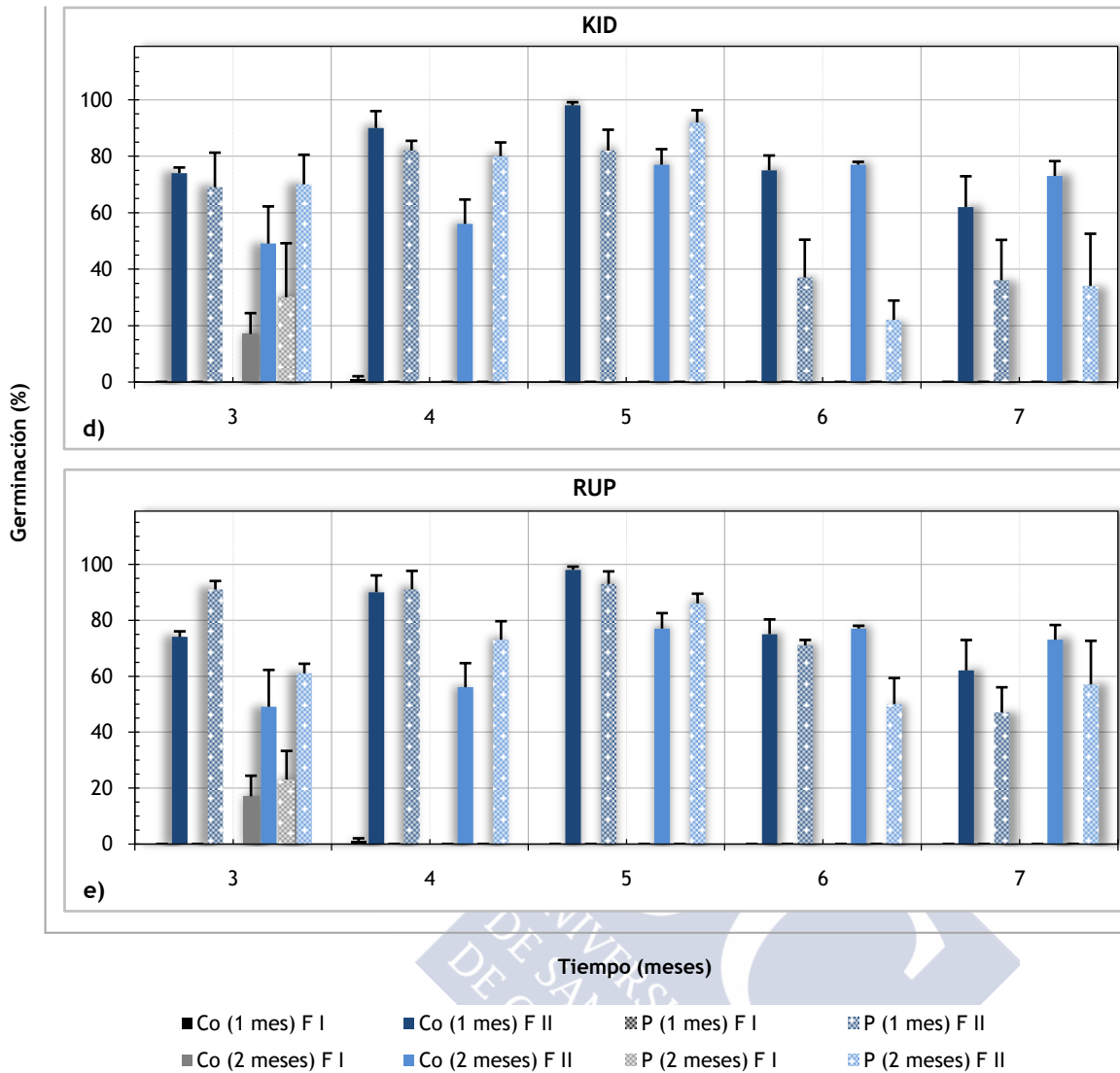
En cuanto a los fitocidas de síntesis, el Ajax-Finale redujo significativamente la germinación hasta niveles bajos en las dos últimas condiciones, que se observaron en el segundo mes, fueron medios y bajos con el Kid en la cuarta, y también con el Roundup Ultra Plus (Figura 4.8c,d,e).

Cuando las semillas se sembraron, la germinación de *P. judaica* alcanzó niveles elevados o muy elevados, que no difirieron significativamente entre sí, en todas las condiciones de almacenamiento estudiadas (Figura 4.9).

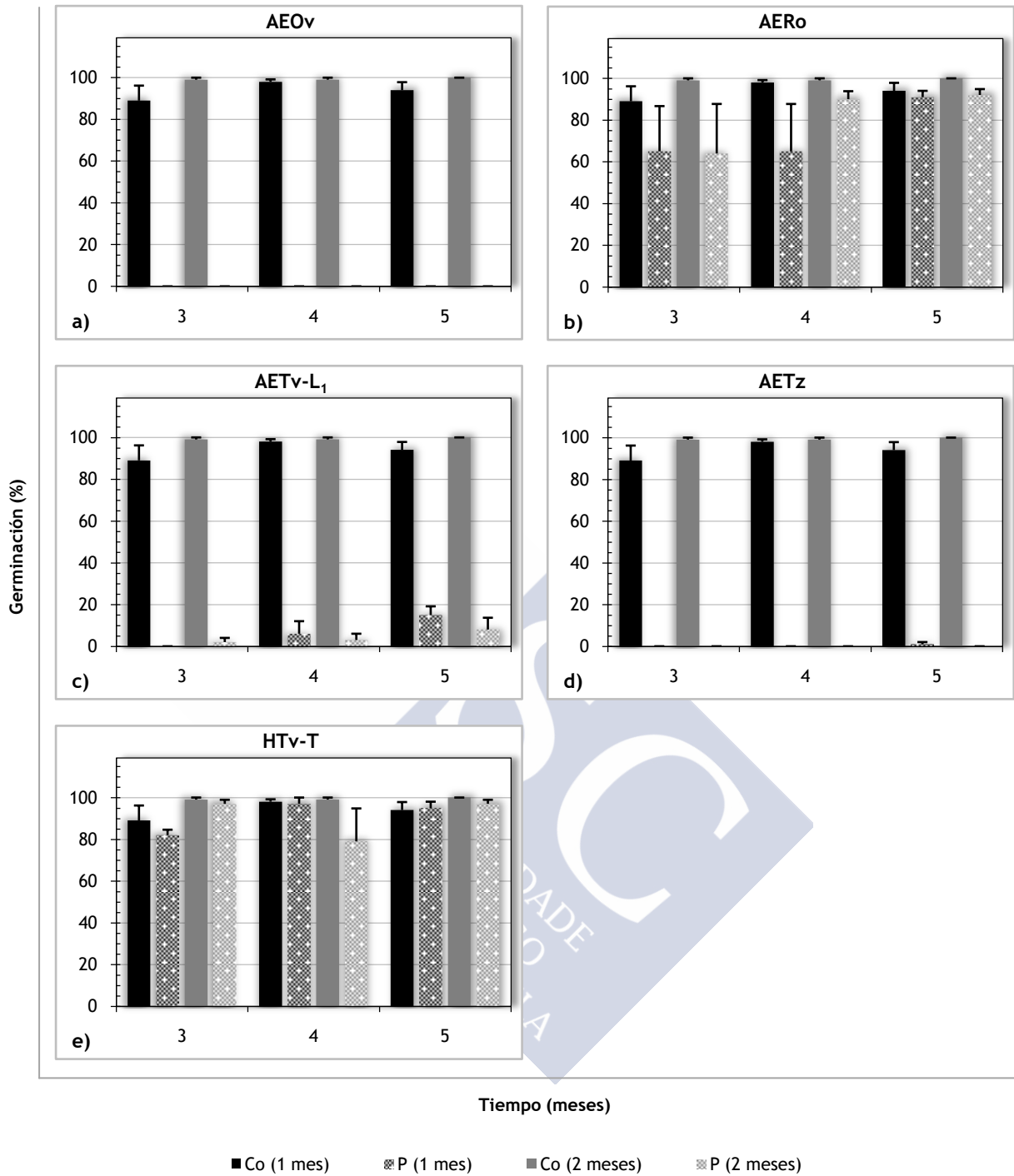
Los aceites de *O. vulgare* y *T. zygis* redujeron significativamente la germinación, inhibiéndola completamente en todas las condiciones de almacenamiento analizadas, manteniendo su efecto en el segundo mes (Figura 4.9a,d). El aceite de *T. vulgaris* también la redujo hasta valores bajos o muy bajos (Figura 4.9c), mientras que con el aceite de *R. officinalis* y el hidrolato de *T. vulgaris* se observaron valores similares al control (Figura 4.9b,e).



**Figura 4.8** Germinación (%) en la Fase I-Producto (F I, uno o dos meses) y en la Fase II-Producto+Agua (F II, un mes más) de las semillas de *Parietaria judaica* (con perianto, en condiciones naturales), en el control (Co) y con los diferentes productos (P) (aceites esenciales o fitocidas de síntesis química), desde su producción (otoño) hasta la primavera siguiente (3, 4, 5, 6 y 7 meses). AERO: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (a), AETV-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (b), A-F: Ayax-Finale (c), KID: Kid (d), RUP: Roundup Ultra Plus (e).



**Figura 4.8 (Cont.)** Germinación (%) en la Fase I-Producto (F I, uno o dos meses) y en la Fase II-Producto+Agua (F II, un mes más) de las semillas de *Parietaria judaica* (con perianto, en condiciones naturales), en el control (Co) y con los diferentes productos (P) (aceites esenciales o fitocidas de síntesis química), desde su producción (otoño) hasta la primavera siguiente (3, 4, 5, 6 y 7 meses). AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (a), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol, (b), A-F: Ajax-Finale (c), KID: Kid (d), RUP: Roundup Ultra Plus (e).



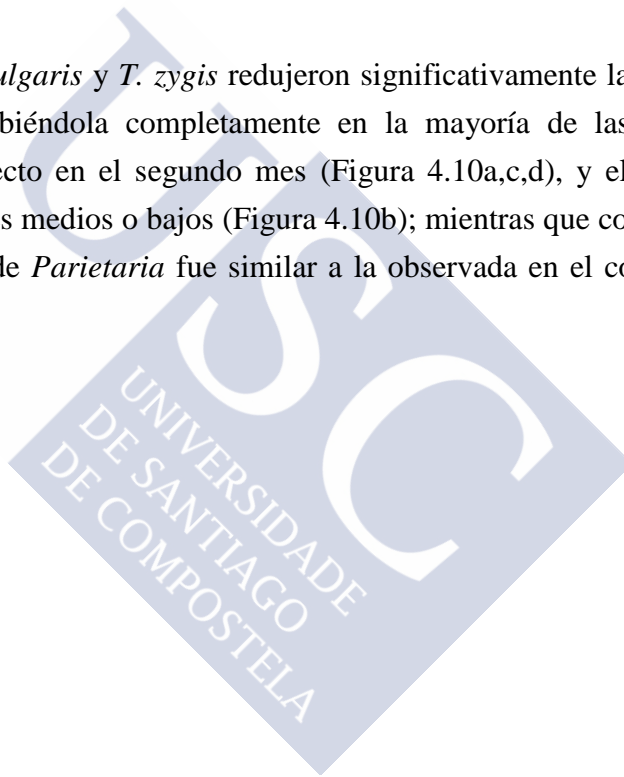
**Figura 4.9** Germinación (%) evaluada transcurridos uno y dos meses, de semillas de *Parietaria judaica* (con perianto, en condiciones naturales), en el control (Co) y con los aceites esenciales e hidrolato (P), en intervalos temporales desde su producción en otoño (3, 4, y 5 meses). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol, (c), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (d), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (e).

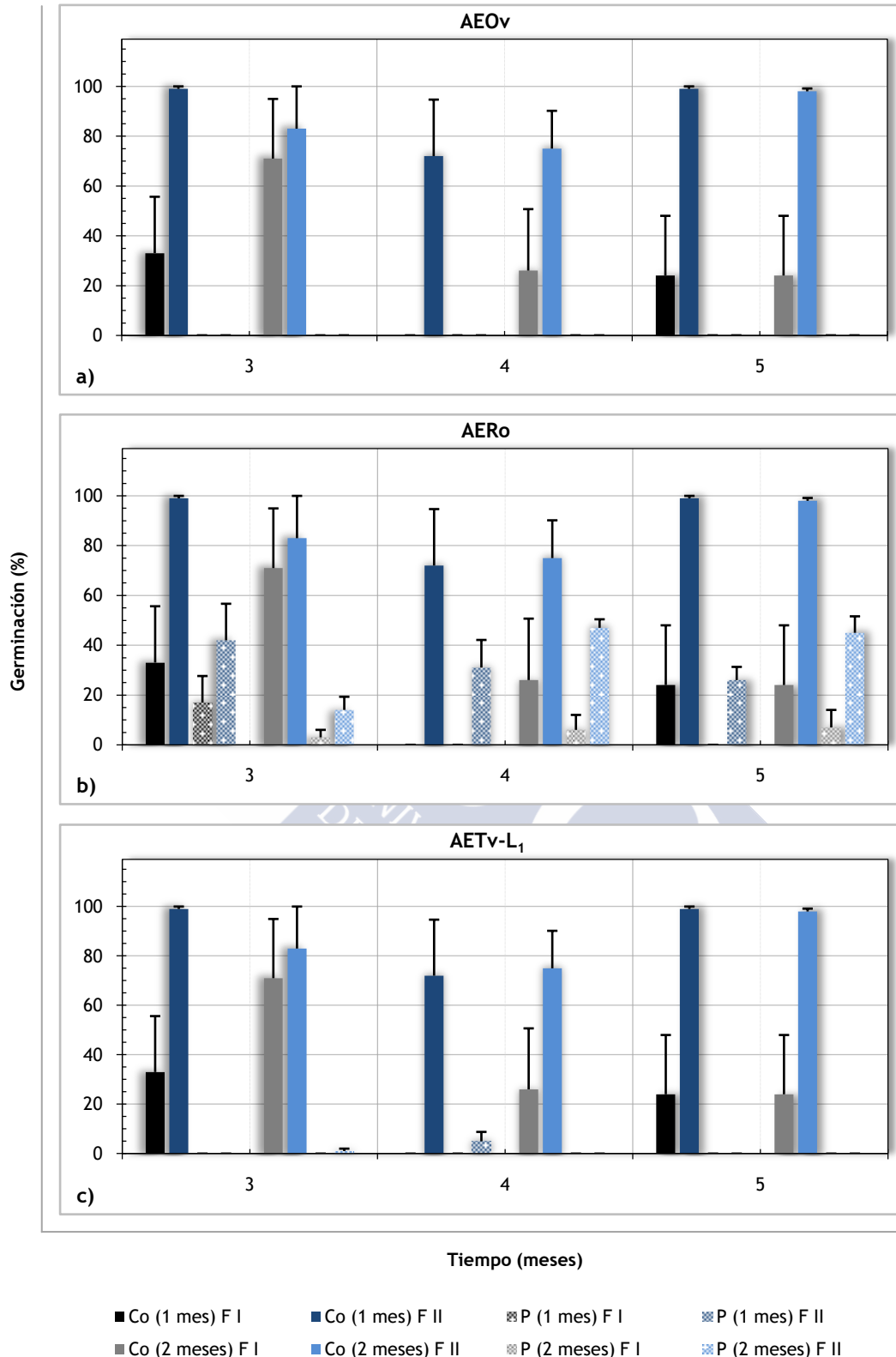
#### 4.4.2 Germinación y emergencia *in situ*

En cuanto al efecto de los aceites e hidrolato sobre la germinación de las semillas de *Parietaria*, éste se evaluó inicialmente *in situ*, en las paredes de la muralla y se repitió la evaluación posteriormente, tras la hidratación, debido a la ausencia de germinación en el control -o baja en relación con los valores esperados según las observaciones previas-, dependiendo del bloque analizado.

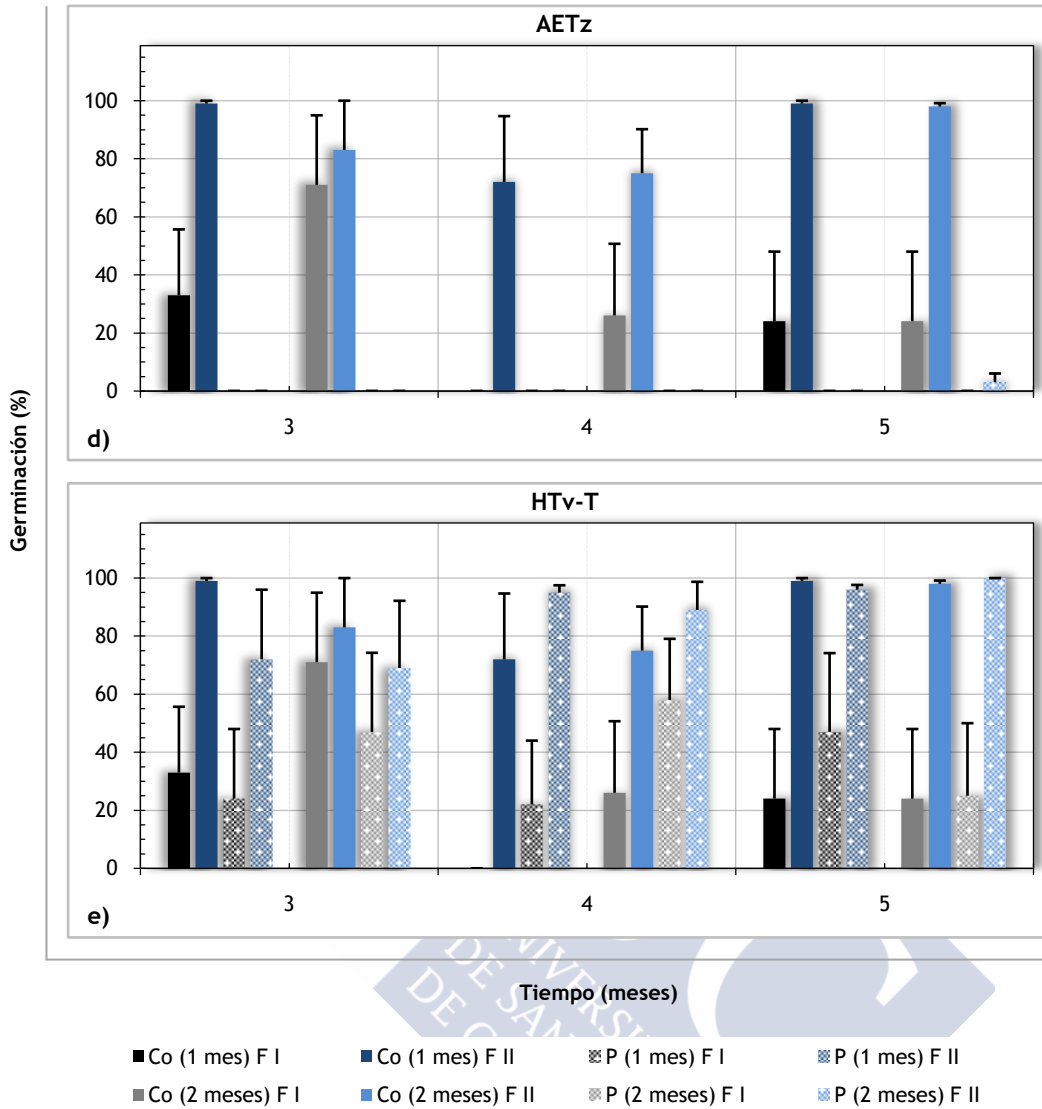
La germinación de *P. judaica* alcanzó finalmente niveles elevados o muy elevados, que no difirieron entre sí, en todas las condiciones estudiadas (Figura 4.10).

Los aceites de *O. vulgare*, *T. vulgaris* y *T. zygis* redujeron significativamente la germinación hasta valores muy bajos, inhibiéndola completamente en la mayoría de las condiciones analizadas, manteniendo su efecto en el segundo mes (Figura 4.10a,c,d), y el aceite de *R. officinalis* la redujo hasta niveles medios o bajos (Figura 4.10b); mientras que con el hidrolato de *T. vulgaris* la germinación de *Parietaria* fue similar a la observada en el control (Figura 4.10e).





**Figura 4.10** Germinación (%) en la Fase I-Producto (F I, uno o dos meses) y en la Fase II-Producto+Agua (F II, un mes más) de las semillas de *Parietaria judaica* (con perianto, en condiciones naturales), en el control y con los aceites esenciales e hidrolato (P), en intervalos temporales desde su producción en otoño (3, 4, y 5 meses). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERO: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (c), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (d), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (e).



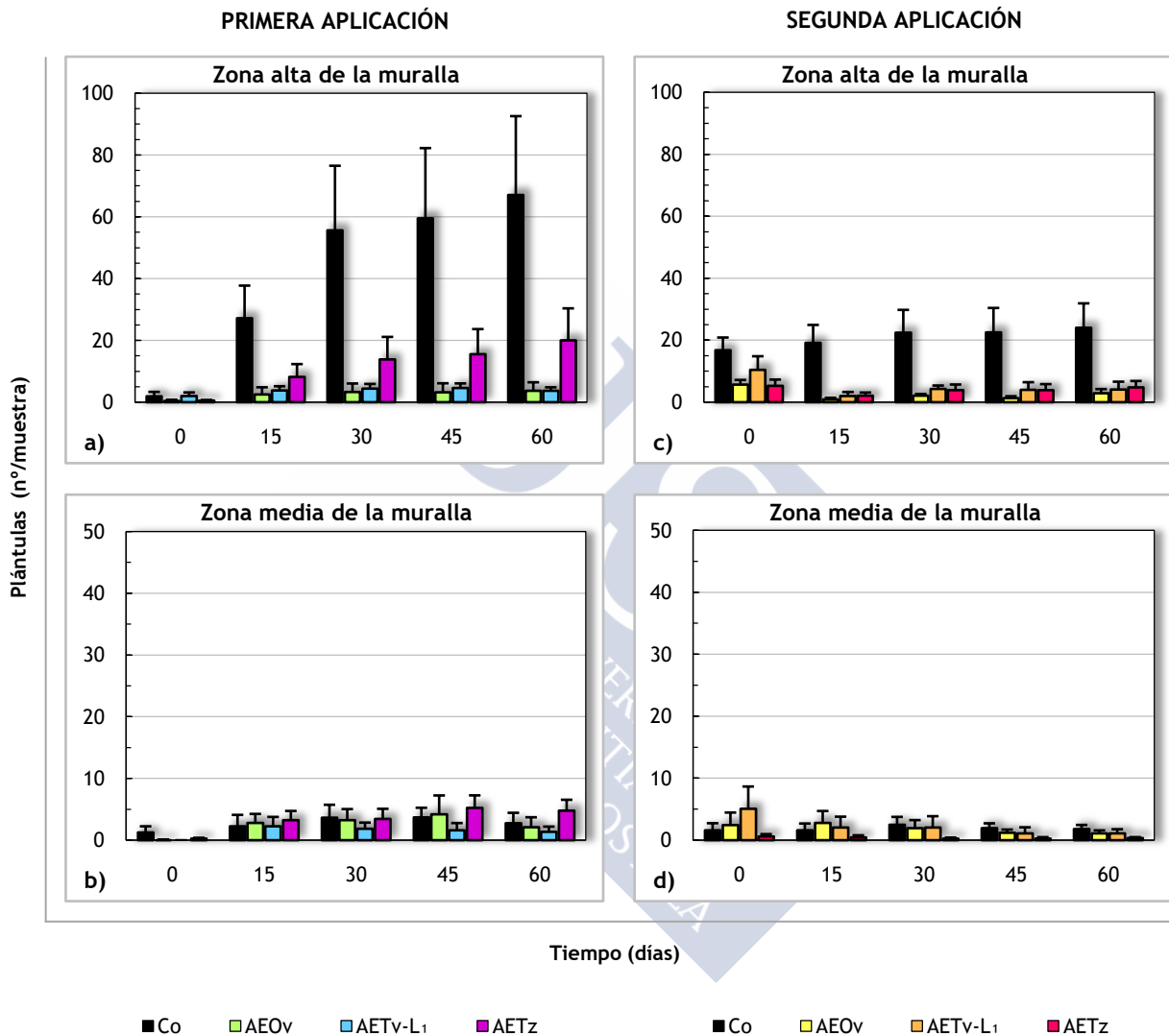
**Figura 4.10 (Cont.)** Germinación (%) en la Fase I-Producto (F I, uno o dos meses) y en la Fase II-Producto+Agua (F II, un mes más) de las semillas de *Parietaria judaica* (con perianto, en condiciones naturales), en el control y con los aceites esenciales e hidrolato (P), en intervalos temporales desde su producción en otoño (3, 4, y 5 meses). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (c), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (d), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (e).

En lo relativo a los tratamientos con aceites esenciales en la muralla (Figura 4.11), la emergencia de plántulas tras la primera aplicación (diciembre 2017) en la zona alta de la muralla fue inicialmente muy baja y la mayor incorporación de nuevas plántulas procedentes de germinación se produjo a lo largo del primer mes (Figura 4.11a). A los 15 días el número de plántulas observadas en las parcelas tratadas fue significativamente menor que el del control, manteniendo valores muy bajos, significativamente menores en el caso del aceite de *O. vulgare* en comparación con el aceite de *T. zygis*, continuando estas diferencias a lo largo de los dos meses de seguimiento, en los que se observó una tendencia moderadamente ascendente con el aceite de *T. zygis*, manteniéndose no obstante en valores bajos, apreciándose una eficacia similar, elevada y prolongada en este período, para los otros dos aceites. Estos resultados muestran un encaje temporal adecuado entre la emergencia de plántulas (concentrada en el primer mes) y la eficacia de la aplicación, que se mantiene en el periodo de seguimiento (dos meses). Los tres productos estudiados resultaron eficaces para el control de la emergencia de plántulas, destacando el aceite de *O. vulgare* y el aceite de *T. zygis*.

En relación la zona media de la muralla, inicialmente tampoco se apreciaron emergencias y la incorporación de nuevas plántulas en el primer mes alcanzó valores muy bajos, que se mantuvieron similares tanto para los tratamientos como para el control durante el periodo de seguimiento (Figura 4.11b). Estos resultados muestran que en esta parte media de la muralla los niveles de emergencia observados fueron tan bajos (menos de 5 plántulas/réplica en casi todos los casos) que no resultó posible detectar la eficacia de los productos analizados.

En la segunda aplicación (enero 2018), en la parte alta de la muralla, ya se apreciaron inicialmente la mayor parte de las emergencias de parietaria y no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 4.11c). A los 15 días se observó una reducción del número de plántulas en todos los tratamientos hasta valores muy bajos, significativamente más bajos que los del control, similares entre sí; los valores se mantuvieron en el periodo de seguimiento sin diferenciarse entre ellos. Estos resultados muestran, además del efecto sobre la germinación, evidenciado en la aplicación anterior, un efecto adicional sobre las plántulas emergidas antes de la aplicación, de modo que se observaron, además de las diferencias significativas con el control, nuevas diferencias respecto a cada situación previa a la aplicación, debido al efecto inicial de todos los productos. Entre ellos el aceite de *O. vulgare* fue el que mejor mantuvo este efecto en la mayor parte del periodo de seguimiento.

En la zona media da muralla, de modo similar, se apreciaron inicialmente la mayor parte de las emergencias, muy escasas en este caso, y que también se mantuvieron en esos valores muy bajos durante el periodo de seguimiento como en la primera aplicación, por lo que tampoco resultó posible detectar la eficacia de los productos analizados (Figura 4.11d).



**Figura 4.11** Densidad media de plántulas (n°/muestra) de *Parietaria judaica* y *Cymbalaria muralis* durante el periodo de seguimiento (60 días), en el control y con los aceites esenciales de *Origanum vulgare* (AEOv), *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (AETv-L<sub>1</sub>) y *Thymus zygis* (AETz), para la primera aplicación (zona alta (a) y media (b) de la muralla) y la segunda aplicación (zona alta (c) y media (d) del monumento).

#### 4.5 DISCUSIÓN

Son muy escasos los estudios en los que se realiza la verificación, bien en invernadero o directamente en el campo, de la potencialidad bioherbívora de compuestos como los aceites e hidrolatos, entre ellos los de Verdeguer (2011) que no ha podido verificar el efecto de extractos y aceites sobre cultivos, Singh *et al.* (2005), quienes comprobaron en invernadero la eficacia del aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* sobre el crecimiento de *Parthenium hysterophorus*, Benchaa *et al.* (2018), quienes comprobaron en invernadero la eficacia de dicho aceite sobre el crecimiento de cuatro especies de plantas arvenses.

El estudio del efecto en condiciones naturales de los aceites y fitocidas de síntesis sobre la germinación de las semillas de *Parietaria judaica* planteado inicialmente no ha aportado información debido a la ausencia de germinación, incluso en el control, pero sí posteriormente tras su hidratación, lo que pone en evidencia tanto la dificultad de reproducir los ensayos de laboratorio con condiciones adecuadas y favorables para la germinación, como la eventualidad de las condiciones naturales que pueden afectar a su desarrollo y a la obtención de resultados (Figura 4.8).

Las semillas que no han germinado en el primer o segundo mes de exposición a los productos ensayados en condiciones naturales, lo han hecho en mayor o menor medida una vez hidratadas, en cuyo caso se ha apreciado un efecto diferencial de los productos ensayados; entre los aceites destaca el de *T. vulgaris* con un nivel de inhibición muy elevado, tanto en las semillas expuestas al aceite durante menos tiempo (un mes) como las que lo han estado más (dos meses), manteniéndolo durante todo el periodo analizado; tendencia que también se observa en el aceite de *R. officinalis*, con un nivel de inhibición menor (medio o incluso bajo). En cuanto a los fitocidas, su efecto sobre la germinación es bajo o muy bajo, únicamente en Ajax-Finale y Kid se produce una inhibición media de la germinación al final de periodo analizado, cuando la temperatura es más elevada.

La ausencia de germinación de las semillas de *Parietaria judaica* inicialmente y su elevada germinación en el control tras hidratación transcurrido cierto tiempo (uno o dos meses), indica que han mantenido su viabilidad, manifestando prevención de la germinación debido a las condiciones desfavorables, particularmente la falta de humedad, manteniendo así su condición de semillas sin dormición (Baskin y Baskin, 1998; Bacchetta *et al.*, 2008).

En cuanto a los productos estudiados, los aceites mostraron en condiciones naturales su capacidad inhibitoria de la germinación, destacando el de *T. vulgaris*, que también ha mostrado previamente su gran potencialidad *in vitro*, como han encontrado Uremis *et al.* (2009), de Almeida *et al.* (2010) y Grosso *et al.* (2010); y en menor medida el de *R. officinalis* que además *in vitro* ha mostrado escasa eficacia sobre la germinación, menor que la encontrada por otros autores (Angelini *et al.*, 2003), lo que puede ser atribuible a la diferencia entre las concentraciones utilizadas que resultaron muy bajas para los ensayos de laboratorio y suficientes para los que aquí se presentan. El mantenimiento de la capacidad inhibidora, particularmente del aceite de *T. vulgaris*, nos lleva a establecer nuevas hipótesis, o bien los compuestos activos afectan inicialmente a las semillas aunque no germinen, o bien se mantienen durante cierto tiempo inhibiendo la germinación cuando ésta se produce, lo que confirmaría nuestra hipótesis, y que deberían ser contrastadas en nuevos estudios en condiciones naturales.

Los fitocidas de síntesis muestran escasa capacidad inhibitoria de la germinación en condiciones naturales, a pesar de que algunos, como el Roundup Ultra Plus, son considerados de preemergencia y así aparecen en clasificaciones proporcionadas por casas comerciales, mucho menor que la encontrada previamente en condiciones de laboratorio. Se plantea la posibilidad de que, tras haber estado expuestos cierto tiempo (hasta dos meses) en condiciones naturales, se reduzca su eficacia debido a su propio proceso de degradación.

El estudio del efecto en condiciones naturales de los aceites sobre la germinación de las semillas de *Parietaria judaica* planteado en segundo lugar en bandejas con sustrato, resultó metodológicamente más adecuado, puesto que las condiciones de humedad fueron más favorables y se ha producido la germinación, con niveles muy elevados en el control, similares a los encontrados *in vitro* (Figura 4.9).

En este caso se confirma la elevada eficacia inhibitoria de los aceites de *O. vulgare*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, en clara concordancia con la demostrada *in vitro*, así como, en el caso de los dos primeros, con la de estudios previos (Argyropoulos *et al.*, 2008; de Almeida *et al.*, 2010; Fouad *et al.*, 2015), considerando que la del tercer aceite estudiado constituye una nueva aportación. El aceite de *R. officinalis* y sobre todo el hidrolato de *T. vulgaris*, mostraron una muy escasa o nula potencialidad inhibitoria en estas condiciones, a lo que en el segundo caso podría contribuir su comportamiento químico diferencial, característico de estos compuestos, que debería ser investigado (Valiño, 2013).

Puesto que estos aceites han resultado muy eficaces con las concentraciones analizadas, más bajas en los estudios de laboratorio, puede deducirse que la concentración de sus compuestos activos se mantiene en un nivel suficiente para que se aprecie su efecto en ambas condiciones; lo que no ocurre con los menos eficaces, como el aceite de *R. officinalis* anteriormente comentado.

Cuando el estudio del efecto *in situ* de los aceites sobre la germinación de las semillas de *Parietaria judaica* se realiza en las paredes de la muralla con semillas colocadas entre sus rendijas siguiendo un diseño experimental, se detecta nuevamente el comportamiento preventivo de la germinación de esta especie cuando las condiciones, especialmente la humedad, no son favorables. En este caso las semillas también mantienen su viabilidad, puesto que cuando se produce su hidratación, germinan alcanzando niveles elevados o muy elevados (Figura 4.10).

Se deduce entonces que las grietas y resaltes de las paredes de la muralla presentan unas condiciones adecuadas para la conservación de las semillas, condiciones que son además bastante estables, de modo que el inicio de la germinación está más controlado y es menos variable que en las planteadas inicialmente en este estudio, y las semillas no pierden viabilidad.

Los aceites *O. vulgare*, *T. vulgaris*, *T. zygis* y en menor medida el aceite de *R. officinalis* muestran nuevamente su actividad inhibitoria sobre la germinación, en este caso en la muralla, efecto que se mantiene a corto plazo (hasta dos meses) tras su aplicación, sin que se produzca en ningún caso recuperación de la misma.

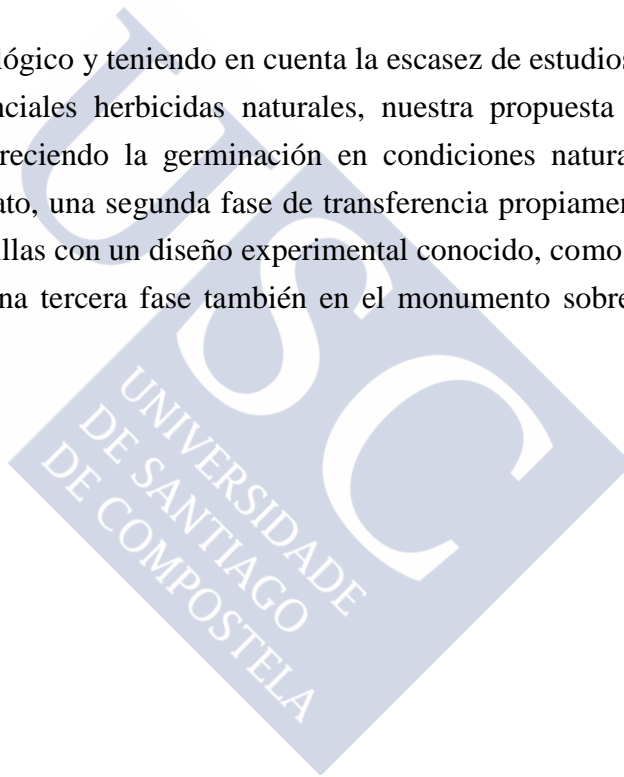
Finalmente, cuando el estudio del efecto *in situ* de los aceites sobre la emergencia de plántulas se realiza en las paredes de la muralla sobre el propio y desconocido banco de semillas que albergan, también los aceites *O. vulgare*, *T. vulgaris* y *T. zygis* mostraron su elevada potencialidad como bioherbicidas, especialmente tras la primera aplicación realizada y en la parte alta del monumento (Figura 4.11).

Estos resultados muestran que se ha producido, como se pretendía, un encaje temporal adecuado entre la emergencia de plántulas, concentrada en el primer mes, y la eficacia de la aplicación, que se mantiene en el periodo de seguimiento (dos meses). En el conjunto de los productos analizados los aceites de *O. vulgare*, *T. vulgaris* y *T. zygis* podrían ser aplicados en

monumentos y paredes en los que *P. judaica* sea abundante; no obstante entendemos que su aplicación en la práctica requiere de otros estudios complementarios sobre los efectos de estos productos en las piedras y argamasas de los mismos, como se ha realizado en la muralla.

La sincronización entre la aplicación *in situ* de productos naturales y la germinación de las semillas de las especies cuyo crecimiento se desea controlar, es un aspecto clave para conseguir un tratamiento eficaz, por lo que, para su utilización como bioherbicidas, son necesarios estudios complementarios relativos a la fenología de la germinación y emergencia de las plantas ruderales o adventicias, como base para definir protocolos concretos de aplicación.

Desde el punto de vista metodológico y teniendo en cuenta la escasez de estudios *in situ* sobre la eficacia de productos potenciales herbicidas naturales, nuestra propuesta de protocolo incluye una primera fase favoreciendo la germinación en condiciones naturales, como la diseñada en bandejas con sustrato, una segunda fase de transferencia propiamente *in situ*, en el monumento, incluyendo semillas con un diseño experimental conocido, como el de bloques aleatorios en nuestro caso, y una tercera fase también en el monumento sobre el banco de semillas que pueda albergar.



#### 4.6 CONCLUSIONES

1. La eficacia de los aceites esenciales, hidrolatos y fitocidas de síntesis química demostrada en su evaluación *in vitro* sobre la germinación de las semillas de *Parietaria judaica*, resulta desigual en condiciones ambientales naturales. Se mantiene muy elevada con los aceites de *O. vulgare*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, con niveles medios con el aceite de *R. officinalis* y baja con el hidrolato de *T. vulgaris*. Cuando la eficacia es muy elevada, se mantiene a corto plazo y no se produce recuperación de la germinación.
2. La evaluación *in situ* en condiciones ambientales naturales del efecto y la duración de los tres herbicidas naturales más eficaces sobre la emergencia de plántulas de *Parietaria judaica* permite verificar dicha potencialidad, para lo que se requiere conseguir la sincronización entre su aplicación *in situ* y la germinación de las semillas de la especie cuyo crecimiento se desea controlar.
3. Desde el punto de vista metodológico, nuestra propuesta de protocolo para la evaluación *in situ*, que en nuestro caso ha resultado concluyente, incluye una primera fase en la que se favorece la germinación en condiciones naturales en la que se analiza el efecto de los productos, una segunda fase en el monumento incluyendo semillas con un diseño experimental conocido, en la que se comprueba su comportamiento germinativo, y una tercera fase definitiva, también en el monumento, sobre el banco de semillas que pueda albergar.





# 5

Control de la germinación y  
del crecimiento inicial de  
*Epilobium hirsutum* L.,  
*Rumex obtusifolius* L. y  
*Spergula arvensis* L.



## **5 Control de la germinación y del crecimiento inicial de *Epilobium hirsutum* L., *Rumex obtusifolius* L. y *Spergula arvensis* L.**

### **5.1 INTRODUCCIÓN**

Los compuestos fitotóxicos de algunas 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.*, 2012; Blázquez y Carbó, 2015; Miranda *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 y tres hidrolatos quimiotipados comerciales de orégano, romero y tomillo (Torres *et al.*, 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 especies que con frecuencia compiten con los cultivos como *Epilobium hirsutum* L., *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.

En los numerosos estudios sobre la potencialidad bioherbicida de aceites y/o hidrolatos de plantas aromáticas, se evalúa habitualmente su efecto reductor sobre el nivel de germinación y sobre el crecimiento inicial, así como mediante la elaboración de índices de vigor de plántulas obtenidos a partir de dichos datos (Hussain y Reigosa, 2014), independientemente de su capacidad para desarrollar una nueva planta (Verdeguer *et al.*, 2009, 2012; Blázquez y Carbó,

2015; Miranda *et al.*, 2015; Pinheiro *et al.*, 2015), características sin duda relacionadas entre sí.

Nuestros estudios sobre el control de la germinación de *Parietaria judaica* L. (Torres *et al.*, 2014, 2016) han permitido detectar variabilidad en el desarrollo inicial de las plántulas (5-15 días) que posiblemente no pueda ser detectada analizando su crecimiento; por lo que hemos establecido la hipótesis de que la actividad fitotóxica no solamente se refleja en el nivel de germinación o en el crecimiento inicial, sino también en la viabilidad de las plántulas, por lo que la evaluación de su desarrollo inicial, y más concretamente la determinación de dicha viabilidad, puede contribuir también, o incluso mejorar, a la caracterización de la actividad bioherbicida.



## 5.2 OBJETIVOS

Verificar la idoneidad de *Epilobium hirsutum* L., *Rumex obtusifolius* L. y *Spergula arvensis* L. para realizar bioensayos de fitotoxicidad evaluando su potencialidad germinativa (nivel y ritmo de germinación de las semillas y emergencia de plántulas), como base para establecer el momento más adecuado para la posible aplicación de tratamientos de control natural de su germinación.

Evaluar *in vitro* la potencialidad fitotóxica de productos industriales (aceites esenciales e hidrolatos) sobre la germinación y el crecimiento inicial de las tres especies ruderales o arvenses, analizando de modo complementario si la eficacia (productos y concentración) inhibitoria de la germinación es permanente o si, por el contrario, tras un lavado de las semillas tratadas, éstas recuperan la capacidad germinativa.

Verificar en condiciones de invernadero la potencialidad fitotóxica de productos industriales (aceites esenciales e hidrolatos) sobre la emergencia de plántulas, estudiando análogamente su permanencia en estas condiciones semicontroladas.



### 5.3 MATERIAL Y MÉTODOS

#### 5.3.1 Especies estudiadas

Las especies estudiadas en este capítulo son especies invasoras de cultivos habituales en Galicia: *Epilobium hirsutum* L., *Rumex obtusifolius* L. y *Spergula arvensis* L.

*Epilobium hirsutum* L. es una especie perteneciente a la familia Onagraceae, se trata de una hierba perenne, con estolones largos y muy gruesos que producen rosetas foliares (Figura 5.1). Tallos de 30-150 cm, de 2-16 mm de diámetro, erectos, profusamente ramificados en la mitad superior y con abundantes ramilletes axilares, sin costillas marcadas, más o menos densamente cubiertos de pelos no glandulíferos largos (0.5-1.7 mm), patentes, brillantes, y de pelos glandulíferos (de 0.1-0.3 mm), excepto en la parte inferior, que suele ser glabrescente. Hojas (15)40-130x(5)10-25(35) mm, opuestas -excepto las brácteas-; hojas medias y superiores de elíptico-lanceoladas a oblanceoladas -con la anchura máxima en la mitad apical- y sésiles, semiamplexicaules y algo decurrentes, de margen irregularmente serrulado (con dientes más o menos ganchudos). Inflorescencia con 8-20(24) flores tetrámeras, con cuatro pétalos de color rosa intenso a morados, rarísimamente blancos, ocho estambres y ovario ínfero. Frutos de (40)50-80(90) mm, en cápsula linear, más o menos tetrágona, con dehiscencia loculicida, uniformemente cubiertos de pelos glandulíferos (0.2-0.3 mm), densos, patentes y a menudo también con pelos no glandulíferos. Semillas 1-1.3 mm, numerosas, obovoides, redondeadas en el ápice y más o menos atenuadas en la base, sin cuello apical, de color castaño más o menos oscuro, con papilas prominentes, finas (Nieto Feliner, 2007).



**Figura 5.1** Planta de *Epilobium hirsutum* con flores, frutos y semillas en el momento de su dispersión (a) y semillas separadas (b).

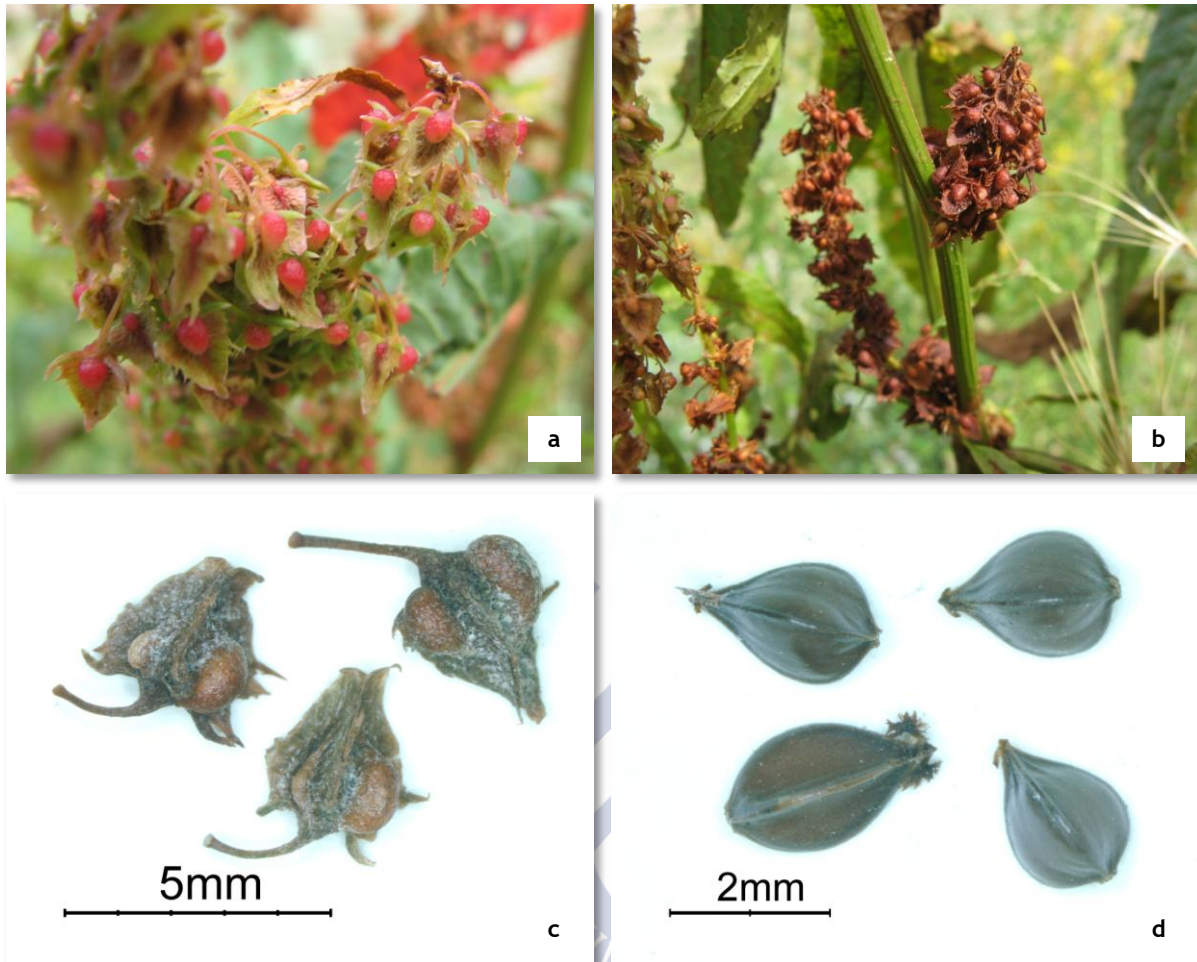
En cuanto a la morfología de las semillas, se corresponde con el tipo foliar axial, con un embrión grande, central y con endosperma no apreciable o limitado, y con el subtipo foliar axial (FA4), característico de las Onagráceas (Martin, 1946; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Según dichos autores, las semillas de esta familia pueden carecer de dormición en algunos casos.

Crece en márgenes de arroyos, regatos y aguas estancadas más o menos eutrofizadas, hasta subsalinas, a veces también en lugares alterados con humedad edáfica, entre el nivel del mar y 1.500 m de altitud, extendiéndose su área por Europa, gran parte de Asia, desde Turquía hasta China, N, CE y S de África; introducida en el N de América. La encontramos en toda la Península Ibérica, pero es menos frecuente en la cornisa cantábrica (Nieto Feliner, 2007).

Su selección para nuestro estudio se fundamenta en su abundancia en determinadas zonas de la muralla de Lugo, además de su carácter ruderal y ser invasora de fincas de cultivo especialmente cuando están en barbecho o abandonadas.

*Rumex obtusifolius* L., perteneciente a la familia Polygonaceae, es una planta perenne, de hasta 1,5 m de altura (Figura 5.2). Tallos erectos, estriado-asurcados, a veces teñidos de pardo o púrpura. Hojas basales en roseta anchamente ovado-oblongas, cordadas o subcordadas en la base -raramente redondeadas-, obtusas o subagudas; lámina más corta o igual al pecíolo, de relación longitud/anchura 1.5-2. Inflorescencia con ramas por lo general simples, arqueadas, y verticilos más o menos distantes, los superiores no bracteados. Flores en verticilos con perianto sepaloideo en dos verticilos trímeros, seis estambres y ovario súpero. Los frutos son aquenios trígonos de 2.5-3 mm, rodeados por tres valvas membranosas, las piezas internas del perianto de (3.5)4-5.5x2-3.5 mm, ovado-triangules o estrechamente triangulares, truncadas en la base; tubérculo prominente, desarrollado por lo general en una sola de las valvas (López González, 1991).

En cuanto a la morfología de las semillas, se corresponde con el tipo periférico con un embrión alargado, grande y curvado, y con endospermo apreciable que a menudo ocupa una posición central, característico de las Poligonáceas (Martin, 1946; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Según dichos autores, las semillas de esta familia pueden carecer de dormición o presentar dormición fisiológica.



**Figura 5.2** Planta de *Rumex obtusifolius* con flores (a), frutos (b), fruto maduro con valvas membranosas (c) y frutos monospermos (aquenios trígonos) separados, con presencia de fruto vacío (inferior izquierda) (d).

Crece en prados húmedos, sotos, fuentes y bordes de cursos de agua, en medios más o menos alterados; entre 200 y 1.700 m de altitud, en Europa, O de Asia y naturalizada en otras partes del Globo. En la Península en la mitad norte, más rara en el sur (López González, 1991).

*Spergula arvensis* L., que pertenece a la familia Caryophyllaceae, es una hierba anual, muy variable en hábito, pubescencia, tamaño y ornamentación de las semillas, entre otros caracteres (Figura 5.3). Tallos de 5-70 cm, en general ascendentes, más o menos ramificados en la base, de moderada a densamente glandular-pubescentes en la parte superior. Hojas 10-30(80) mm, lineares, carnosas, canaliculadas en el envés, dispuestas en fascículos con apariencia de verticilos, estípulas escariosas. Flores pentámeras en cimas, con sépalos libres, pétalos blancos, 5-10 estambres y ovario súpero. Fruto en cápsula (3)3.5-6 mm, algo más larga que los sépalos. Semillas de 0.8-2.5(3) mm de diámetro, subglobosas, aquilladas o con ala muy estrecha, grisáceo-negruczas, papilosas o no (Ratter, 1991).

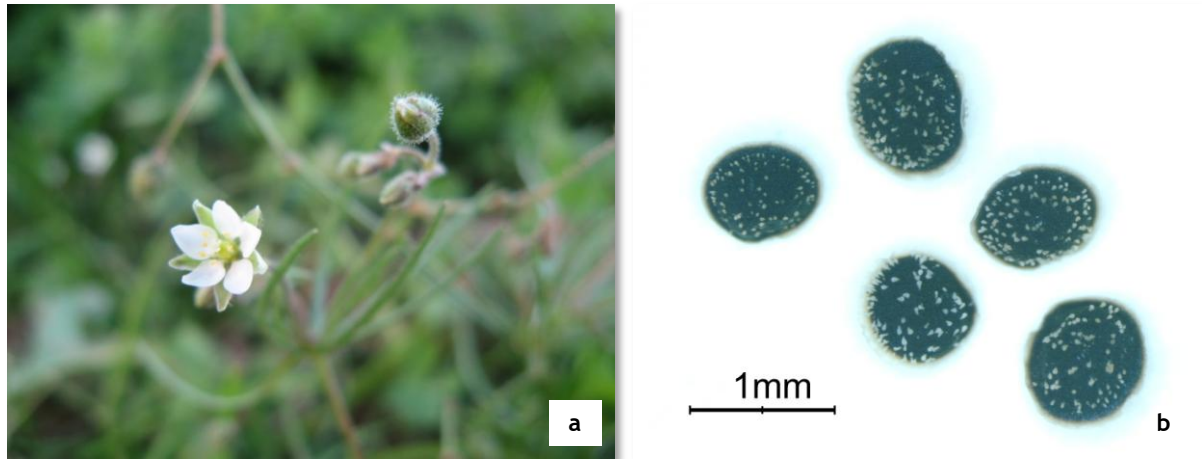


Figura 5.3 Planta de *Spergula arvensis* con flores y frutos (a) y semillas separadas (b).

En cuanto a la morfología de las semillas, se corresponde con el tipo periférico con un embrión alargado, grande y curvado, y con endospermo apreciable que a menudo ocupa una posición central, característico de las Cariofiláceas (Martin, 1946; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Según dichos autores, las semillas de esta familia pueden carecer de dormición o presentar dormición fisiológica.

Mala hierba en campos de cereales y otros cultivos de secano, además de huertas y pastos alterados, etc., principalmente en suelos arenosos, calcífuga, entre el nivel del mar y 1.400 m de altitud, subcosmopolita. Dispersa por gran parte de la Península, enrareciéndose hacia el este, salvo en los alcornoques catalanes, donde abunda (Ratter, 1991).

### 5.3.2 Metodología

#### 5.3.2.1 Fenología de la germinación de las semillas

Para la realización de los ensayos de germinación de semillas y emergencia de plántulas (controles *-in vitro-*, bioensayos de fitotoxicidad *-in vitro-* e invernadero-), se recolectaron, a finales del verano (de 2016), frutos maduros de las tres especies (*E. hirsutum*, *R. obtusifolius* y *S. arvensis*), en la finca de prácticas del campus universitario de Lugo, que fueron almacenados en condiciones ambientales, en el exterior y oscuridad, hasta el momento del inicio de los ensayos.

Los frutos fueron objeto de un procesamiento inicial para conseguir las unidades embrionarias (semillas o frutos, dependiendo de la especie) que se utilizaron en el estudio, así, en el caso de *E. hirsutum* y *S. arvensis*, se ha trabajado abriendo sus frutos, en cápsula ambos, para extraer las semillas y, en el caso de *R. obtusifolius*, se han retirado las valvas adosadas al fruto y se ha trabajado con sus aquenios (frutos indehiscentes y monospermos).

Una vez realizada esta tarea, se han seleccionado aquellas semillas/frutos llenas/os aplicando criterios de color, conformación y tamaño, escogiendo con prevalencia las/os que presentaban el color propio de su madurez, estaban bien conformadas/os para su tipo, y su tamaño se ajustaba al más frecuente observado para la especie (desechando los tamaños demasiado reducidos). En adelante, para simplificar, nos referiremos a semillas con carácter general para las tres especies, aunque en *R. obtusifolius* se trabaje específicamente con sus frutos monospermos.

Para evaluar la germinación de las semillas en el primer año tras su formación, se realizaron ensayos con las recién producidas, así como transcurridos tres, seis y nueve meses, en condiciones controladas a) favorables para su germinación: fotoperiodo de 16 horas luz, a 22°C, y 8 horas oscuridad, a 16°C, humedad relativa 80%, en las instalaciones de la RIAIDT (Rede de Infraestructuras de Apoio á Investigación e Desenvolvemento Tecnolóxico) del campus de Lugo, consistentes en una cámara Misa (controlador de temperatura Air Blue, humidificador centrífugo Herrmidifier, tubos fluorescentes específicos para cámaras fitotrón Osram L 58W/77 Fluora y programador horario Orbis Inca Duo); así como b) condiciones menos favorables similares a las de otoño-primavera en el medio natural: fotoperiodo de 12 horas luz, a 15°C, y oscuridad, a 10°C, equivalente humedad, en una cámara Gallenkamp, disponible en el Departamento de Botánica EPSE del mismo campus. En ambos casos, además de las condiciones de exposición a la luz (fotoperiodo) que pueden presentar las semillas dispuestas en la superficie del suelo, se ha estudiado su germinación en condiciones de oscuridad total, cuando están enterradas en el mismo.

Para cada tratamiento, se seleccionaron semillas de las tres especies, siguiendo los criterios descritos anteriormente, y se dispusieron en 4 réplicas de 25 semillas, en placas Petri de 9 cm de diámetro, cubiertas con doble papel de filtro previamente desinfectado en una estufa Gallenkamp (80°C, 24 h), que se ha humedecido con 6 ml de agua destilada, precintadas posteriormente con papel flexible Parafilm. Para el estudio de la germinación en condiciones de oscuridad, las placas se han mantenido en una caja opaca y envueltas individualmente con papel de aluminio.

Se evaluó la germinación de las semillas en cada caso, realizando recuentos periódicos de dos veces por semana durante un mes (periodo suficiente para la estabilización de la dinámica de la germinación), retirando las semillas germinadas, entendiendo como tal aquella en la que la radícula se observaba claramente, como proponen Boojh y Ramakrishnan (1982), Vigna *et al.* (1983), y como se ha realizado habitualmente en estudios ecológicos de la germinación.

Para el recuento de las germinaciones en condiciones de oscuridad se ha utilizado una lámpara de luz verde (frecuencia a la que las semillas no muestran en general sensibilidad que las lleve a cambiar su proceso germinativo) (Baskin y Baskin, 1998); no obstante, detectada la alta sensibilidad a la luz de *E. hirsutum* y *R. obtusifolius*, se decidió realizar únicamente un recuento final, manteniendo las placas en condiciones lumínicas inalterables.

#### 5.3.2.2 Bioensayos de fitotoxicidad *in vitro*

En los bioensayos de fitotoxicidad (dosis-respuesta), se han testado cuatro aceites esenciales y tres hidrolatos comerciales de orégano, romero y tomillo, aquéllos que han demostrado eficacia, incluso a bajas concentraciones, en bioensayos dosis-respuesta realizados previamente con *P. judaica*. Estos productos comerciales industriales se han adquirido a diferentes casas comerciales y, para algunos de ellos, su composición fue facilitada por las mismas (incluyendo una descripción detallada de la metodología de análisis aplicada), para los restantes fue analizada a petición propia mediante la técnica de resonancia magnética nuclear de protón (NMR) (una descripción detallada de esta técnica de análisis se presenta en el capítulo 3), quedando reflejada dicha composición de los aceites e hidrolatos estudiados en la Tabla 5.1 y Tabla 5.2, respectivamente.

Para evaluar su efecto sobre la germinación de las semillas, se ha diseñado un protocolo de bioensayo dosis-respuesta, en condiciones controladas (fotoperiodo de 16 horas luz, a 22°C, y 8 horas oscuridad, a 16°C, humedad relativa 80%), en la cámara Misa antes referida, condiciones que, según estudios preliminares, resultaron muy adecuadas para su germinación, en las instalaciones de la RIAIDT (Rede de Infraestructuras de Apoio á Investigación e Desenvolvemento Tecnolóxico) del campus de Lugo.

Debido al número de especies y productos ensayados, para cada tratamiento se ha probado inicialmente una concentración máxima, de 2  $\mu\text{l ml}^{-1}$  en el caso de los aceites, y el producto sin dilución (100%) en los hidrolatos, y posteriormente, una vez comprobada la eficacia de los

tratamientos (inhibición de la germinación o aparición de plántulas no viables), se ensayaron tres concentraciones decrecientes (1, 0.5 y 0.25  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) en el caso de los aceites y 50, 25 y 12.5% para los hidrolatos; de manera similar a las concentraciones utilizadas en otros estudios con aceites (Verdeguer *et al.*, 2009, 2012) y con hidrolatos (Valiño, 2013). También se estableció un control, únicamente con agua destilada.

**Tabla 5.1** Composición de los 4 aceites esenciales determinada por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC/MS) o con detector de ionización de llama (GC/FID), o bien resonancia magnética nuclear de protón (NMR) de los aceites en cloroformo deuterado. AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* L., AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L., AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. linalol<sub>1</sub>, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* Loefl. ex L.

Compuestos <sup>a</sup>	ACEITES ESENCIALES			
	AEOv	AERo	AETv-L <sub>1</sub>	AETz
$\alpha$ -pinene	0.91 <sup>b</sup>	0.39 <sup>c</sup>		1.26 <sup>b</sup>
$\alpha$ -thuyene	1.05			0.73
$\beta$ -pinene		0.37		
camphene		0.16		
$\beta$ -myrcene	1.50		3.50 <sup>c</sup>	1.62
$\alpha$ -terpinene	1.12		8.14	1,45
<i>p</i> -cymene	6.34		2.68	19.23
limonene			3.01	
1-8-cineole		99.09	1.30	
$\gamma$ -terpinene	4.66			8.06
linalool	1.30		81.37	4,71
camphor				0.79
borneol				1.30
4-terpineol	0.78			1.04
thymol	3.80			49.39
carvacrol	70.24			2.76
$\beta$ -caryophyllene	2.23			1.48

<sup>a</sup> Compuestos detectados en análisis por espectrometría de masas y tiempos de retención (en porcentaje  $\geq 0.5\%$ ), o bien resonancia magnética nuclear de protón (NMR).

<sup>b</sup> Porcentajes calculados a partir de GC/FID sin factor de corrección.

<sup>c</sup> Porcentajes relativos al total de los compuestos detectados por NMR. Los espectros obtenidos se han comparado con los de los compuestos puros obtenidos a partir de la web de Sigma-Aldrich (<https://www.sigmaaldrich.com>), la base de espectros "Spectral Database for Organic Compounds, SDBS" y la base SciFinder.

**Tabla 5.2** Principales compuestos de los aceites esenciales presentes en los 3 hidrolatos estudiados. HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* L., HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* L. timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis* Loeffl. ex L.

HOv	HIDROLATOS	
	HTv-T	HTz
carvacrol <sup>a</sup> (96.15) <sup>b</sup>	$\alpha$ -pinene	thymol <sup>a</sup> (81.30) <sup>b</sup>
thymol (3.85)	$\beta$ -myrcene	carvacrol (18.70)
	$\alpha$ -terpinene	
	$\gamma$ -terpinene	
	<i>p</i> -cymene	
	linalool	
	thymol	
	carvacrol	
	carvacrol	

<sup>a</sup> Compuestos detectados en análisis por resonancia magnética nuclear de protón (NMR).

<sup>b</sup> Porcentajes relativos al total de los compuestos detectados por NMR.

Cada bioensayo dosis respuesta se ha realizado en dos fases secuenciales temporalmente de cuatro semanas de duración cada una (tiempo suficiente para que se estabilizara la dinámica de la germinación para las tres especies, como se observó en estudios previos). Fase I: Inhibición, las semillas estuvieron en presencia del producto en la concentración correspondiente; finalizada esta fase, se realizó una evaluación rigurosa del estado de las semillas no germinadas y aquellas aparentemente viables se pasaron a una segunda fase (sólo cuando su proporción fue igual o superior al 10%).

Las semillas candidatas para la segunda fase (Fase II: Recuperación), se retiraron de las placas donde se había aplicado el producto, se depositaron en coladores de pequeño tamaño, respetando sus réplicas, se mantuvieron sumergidas en agua destilada durante cinco minutos, y fueron transferidas a nuevas placas en las que estuvieron únicamente en presencia de agua (2 ml), en dosificación constante, simulando un hipotético lavado natural del producto por agua de lluvia o de riego, 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); finalizada esta fase, se realizó nuevamente una evaluación rigurosa del estado de las semillas no germinadas.

En cada tratamiento se han preparado cuatro réplicas de 25 semillas de cada una de las (3) especies estudiadas, colocadas en placas Petri de 9 cm de diámetro, sobre doble capa de papel

de filtro, humedecido con la correspondiente dosificación, y precintadas con papel flexible Parafilm, para evitar variaciones de la misma, realizando un recuento diario de la germinación, siguiendo el criterio anteriormente establecido.

Además del estudio de la germinación, en cada una de las fases descritas, se ha evaluado simultáneamente el desarrollo inicial de las plántulas; para ello, con periodicidad diaria, una vez cuantificadas, se han retirado cuidadosamente las semillas germinadas (número variable según el nivel de germinación) en cada réplica de aceite e hidrolato, transfiriéndolas a nuevas placas de tratamiento (preparadas simultáneamente al bioensayo previo) e identificándolas según su fecha de germinación. Se ha realizado un seguimiento de cada una de estas semillas consistente en la tipificación de las plántulas, viables (bien desarrolladas y verdes) y de las que no lo son (con clorosis y/o escaso desarrollo del epicotilo o hipocotilo) a los 5 días de desarrollo, verificando dicha cuantificación transcurridos los 15 días.

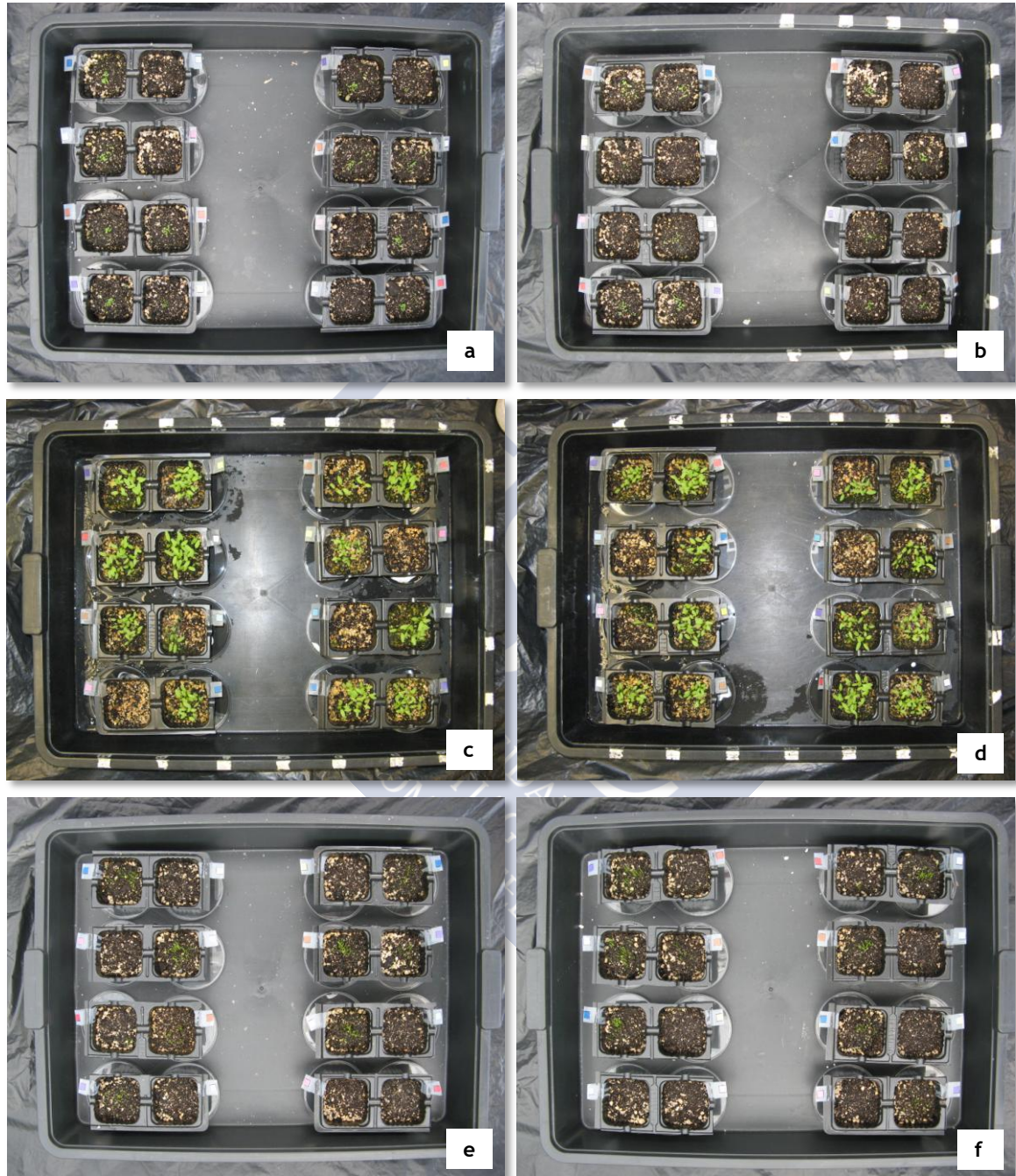
#### 5.3.2.3 Bioensayos de fitotoxicidad en invernadero

Una vez observada la eficacia *in vitro* de todos los productos estudiados, en la primavera de 2017, se realizaron, para las tres especies, ensayos de fitotoxicidad en invernadero evaluando la permanencia de la efectividad cuando se limitan las variables que pueden ser controladas (luz, temperatura).

Para ello las semillas se sembraron en alveolos (6x6x5 cm), dispuestos en bandejas portadoras en el invernadero del Departamento de Producción Vegetal y Proyectos de Ingeniería de la EPSE del campus universitario de Lugo. El diseño experimental consistió, para cada especie, en el establecimiento de cuatro bloques compuesto cada uno por ocho alveolos, una réplica de cada producto (7) y un control en cada bloque, etiquetados y ordenados según el resultado de un sorteo aleatorio de bloqueo de variables, que identificó la posición a ocupar la réplica de cada tratamiento y el control en el bloque. Por lo tanto la experiencia contó con cuatro repeticiones (Figura 5.4).

Cada alveolo se rellenó con un volumen de 75 ml (medidos en semihúmedo) de una mezcla, homogeneizada manualmente, de sustrato comercial Pindstrup Universal (turba rubia de *Sphagnum* con estructura fina y gruesa, corteza de pino compostada y perlita; con 1,2 g de NPK y 0.05 ml de humectante por litro de sustrato), perlita y vermiculita (3:1:1), muy adecuada para la realización de ensayos de crecimiento de planta. Cada alveolo se colocó

sobre un plato de riego individual, para evitar la transferencia de productos entre alveolos, hidratando el sustrato antes de la siembra.



**Figura 5.4** Bioensayos de fitotoxicidad en invernadero con los tratamientos de aceites esenciales de *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> y *Thymus zygis*, e hidrolatos de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* timol y *Thymus zygis*, para *Epilobium hirsutum* (a y b), *Rumex obtusifolius* (c y d) y *Spergula arvensis* (e y f). Para cada especie se establecieron cuatro bloques constituidos por ocho tratamientos por alveolo (siete productos y un control), ordenados según el resultado de un sorteo aleatorio, donde se aprecian las plántulas de cada especie cuando se ha producido su emergencia.

Una vez hidratado el sustrato, se procedió, según el identificativo de cada alveolo, a la aplicación de los (7) productos (cuatro aceites esenciales y tres hidrolatos), sobre una compresa de celulosa Pur-Zellin precortada en porciones 4x5 cm que descansaba sobre el sustrato, en dosificaciones variables según el tipo de producto (0.2 ml en aceites, 2 ml en hidrolatos), exceptuando el control.

Una vez realizada la aplicación, en el caso de *S. arvensis* se dispusieron 25 semillas en cada alveolo y se adicionó una pequeña capa de sustrato de 25 ml para cubrirlas, mientras que en el caso de *E. hirsutum* y *R. obtusifolius*, las semillas se colocaron sobre dicha capa de sustrato, de acuerdo con las observaciones previas sobre su potencialidad germinativa (luz y oscuridad); puesto que las semillas de la primera pueden germinar en las dos condiciones mientras que las otras dos no lo hacen en oscuridad. De esta forma se mantuvo la disposición del producto en profundidad, variando la posición de las semillas, en función de sus requerimientos germinativos.

El riego de los alveolos se efectuó a demanda, realizando un control exhaustivo diario de la hidratación del sustrato, asegurando las condiciones óptimas para la germinación y una absorción del agua que evitase la transferencia de producto a la placa y pérdidas del mismo por evaporación.

Se realizaron recuentos con periodicidad de dos veces por semana, retirando mediante corte a ras del sustrato, las plántulas emergidas. Con carácter general, una plántula se consideró emergida cuando el despliegue de sus cotiledones resultaba evidente, con casuísticas particulares dependiendo de la especie de la que se trataba, según las observaciones propias en el ensayo; de este modo, una plántula de *E. hirsutum* se consideró emergida cuando sus cotiledones alcanzaron un despliegue de 90° de apertura, en el caso de *R. obtusifolius*, los cotiledones se presentaron totalmente abiertos con un ángulo mayor si bien, en ocasiones, la propia cubierta del fruto impidió físicamente esta apertura temprana aunque la plántula se consideró emergida por su desarrollo, en el caso de *S. arvensis*, se observó que los cotiledones no siempre se presentaban completamente separados, sino que se mantenían cerrados en disposición más o menos helicoidal pero con un desarrollo tal que, como en el caso anterior, permitía considerar la plántula emergida.

Para averiguar la persistencia de la potencialidad fitotóxica de los productos estudiados en caso de lluvia o riego en el medio natural, se procedió a lavar los alveolos de modo consecutivo transcurridas una (lavado I) y cinco (lavado II) semanas desde su inicio,

incorporando cuidadosamente 30 ml de agua en cada alveolo (volumen que permitió el drenaje completo). Para ello, según el diseño experimental, se incorporaron cuatro nuevos bloques de ocho alveolos para cada especie estudiada, lo que supuso un seguimiento global de 192 alveolos (7 tratamientos y control, 4 bloques, 2 periodos de lavado, 3 especies) y la manipulación de 4.800 semillas.

Una vez realizado el lavado, se continuó con el recuento de emergencia de plántulas según el procedimiento descrito anteriormente, hasta la estabilización de su dinámica, lo que finalmente se produjo transcurridas cuatro semanas tras el mismo (excepcionalmente seis en *R. obtusifolius*).

Además, en el caso particular de *R. obtusifolius*, para averiguar el efecto de los tratamientos sobre semillas inicialmente enterradas en el suelo en el momento de su aplicación, y removidas posteriormente, se incorporó un nuevo ensayo adicional. Para ello, las semillas se mantuvieron las cuatro primeras semanas sobre la capa de celulosa y recubiertas por sustrato, procediendo a retirarlas y colocarlas sobre el mismo en cada alveolo con la ayuda de una lupa en el laboratorio; evaluando la emergencia durante cinco semanas más. Este efecto de la remoción se ha podido realizar en esta especie por la factibilidad del reconocimiento, identificación y manipulación de sus semillas, lo que no resultó posible en el caso de *E. hirsutum*.

### 5.3.3 Análisis estadístico y representación gráfica

La fase de elaboración, representación y análisis de datos obtenidos se ha realizado con Microsoft Excel 2010, GraphPad Prism 7 y el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 27 para Windows, con licencia de la Universidad de Santiago de Compostela.

#### 5.3.3.1 Elaboración de datos

Las variables analizadas de germinación/emergencia, las referentes a la tipología de plántulas y viabilidad de las semillas, así como la transformación que se ha aplicado para su posterior análisis, se describen a continuación:

- **Variables de germinación/emergencia.** Las variables de germinación/emergencia que se estudiaron han sido las que a continuación se detallan:

- Porcentaje final acumulado de germinación. Se recogieron, con la periodicidad determinada, datos de cuantificación de semillas germinadas por réplica, calculando el porcentaje de germinación final acumulado. En el caso de los bioensayos de fitotoxicidad, para la Fase I (inhibición) y globalmente al término de la Fase II (inhibición+recuperación).

Para evaluar comparativamente el efecto de los tratamientos sobre esta variable se han establecido cinco niveles cualitativos de germinación de las semillas: muy bajo ( $\leq 10\%$ ), bajo (11-30%), medio (31-70%), elevado (71-89%) y muy elevado ( $\geq 90$ ).

- Porcentaje final acumulado de emergencia. Se recogieron datos, con periodicidad de dos veces por semana, de cuantificación de plántulas emergidas, calculando el porcentaje de emergencia final acumulado.

Para evaluar comparativamente el efecto de las condiciones sobre esta variable se han establecido cinco niveles cualitativos de emergencia de las plántulas, similares a los correspondientes al porcentaje de germinación.

- Tiempo medio de germinación/emergencia. Para caracterizar la germinación/emergencia de cada una de las tres especies se calculó este parámetro, que guarda relación con el ritmo de germinación (Ellis y Roberts, 1980; Bradbeer, 1988; Thompsett y Pritchard, 1998):

$$t_m = \frac{N_1 \times T_1 + N_2 \times T_2 + \dots + N_n \times T_n}{N_1 + N_2 + \dots + N_n}$$

Donde:  $t_m$ : tiempo medio de germinación/emergencia;  $N_1$ : número de semillas germinadas/plántulas emergidas en  $T_1$ ;  $N_2$ : número de semillas germinadas/plántulas emergidas en  $T_1$  y  $T_2$ ;  $T_n$ : días transcurridos desde que las semillas se pusieron a germinar.

- **Datos transformados.** Para el análisis de los datos se ha considerado necesario realizar también una transformación de los valores obtenidos para estas variables,

aplicando la transformación habitualmente utilizada en cada caso (Montgomery, 2017).

- Porcentaje final acumulado de germinación/emergencia. Se calculó el valor de los porcentajes finales de germinación/emergencia en cada uno de los tratamientos/condiciones como “ $\arcsin(\sqrt{p})$ ”, donde: arcsin: arcoseno de la función; p: valor de germinación/emergencia en tanto por uno.
- Tiempo medio de germinación/emergencia. Se calculó como “ $\log(t_m + 1)$ ”, donde: log: logaritmo en base 10 de la función;  $t_m$ : tiempo medio de germinación/emergencia.
- **Tipología de las plántulas**
  - Proporción de tipos de plántulas. En los bioensayos de fitotoxicidad *in vitro*, para la Fase I (inhibición) y la Fase II (recuperación, cuando procedió realizarla), se recogieron datos de la tipología de plántulas de 5 y 15 días, calculando su proporción final en la muestra, siempre que se pudo disponer a la terminación del ensayo de un mínimo de 10 individuos estudiados.
- **Viabilidad de las semillas**
  - Proporción de semillas no viables. En los bioensayos de fitotoxicidad *in vitro*, para la Fase I (inhibición) y la Fase II (recuperación, cuando procedió realizarla), se recogieron datos de la viabilidad de las semillas, calculando la proporción de semillas viables germinadas, viables no germinadas y no viables, para la Fase I y globalmente al final de la Fase II.

#### 5.3.3.2 Análisis y representaciones

El estudio de la germinación de las semillas/emergencia de las plántulas se realizó en tres campos de análisis:

- Representaciones gráficas mediante

- Dinámica de germinación de las semillas/emergencia de las plántulas
- Curvas dosis-respuesta para el tratamiento determinado, características en los estudios con bioensayos de toxicidad, que reflejan las variaciones entre individuos de una misma población; las curvas sigmoidales dosis-respuesta (pendiente variable) y su coeficiente de determinación ( $R^2$ ), se obtuvieron representando la concentración (abscisas) y el porcentaje final medio de germinación (ordenadas), usando GraphPad Prism 7. Para cada tratamiento, se calculó el valor de  $IC_{50}$  (Concentración Inhibitoria Máxima Media, concentración que produce una inhibición del 50% de la respuesta germinativa), que se determinó en función de su curva dosis-respuesta específica. Todo esto se ha realizado según la propuesta de Fagodia *et al.* (2017).

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + ((X^{\text{HillSlope}}) / (IC50^{\text{HillSlope}})))$$

- Estudio de la distribución y dispersión de los datos mediante estadísticos descriptivos básicos y representaciones gráficas.
- Comparación de medias realizando pruebas ANOVA o pruebas T, en su caso, para detectar diferencias significativas entre tratamientos/condiciones para cada una de las tres especies consideradas, cuando se cumplió la normalidad de los datos (analizada mediante el test Shapiro-Wilk); y análisis Tukey/DMS (Mínima Diferencia Significativa) *a posteriori* ( $p < 0.05$ ), previa verificación de la homogeneidad de su varianza mediante la prueba de Levene, o Games Howell para una asunción de varianzas diferentes (Pardo y Ruíz, 2002; Montgomery, 2017). Cuando los datos no se ajustaron a la normalidad, se compararon las medias con la prueba de Kruskal-Wallis, o U de Mann-Whitney en su caso.

El estudio de la tipología de plántulas y de la viabilidad de las semillas se realizó tal como se describe a continuación:

- Representaciones gráficas mediante

- Diagramas de barras, apilados y agrupados, representando la distribución proporcional de tipos de plántulas presentes en cada concentración (creciente) para la fase inicial (Fase I-Inhibición, ya que cuando procedió la segunda fase no se obtuvo un porcentaje mínimo del 10% de semillas germinadas), transcurridos 5 y 15 días, para cada uno de los productos estudiados (pudiendo tratarse del grupo de aceites esenciales o hidrolatos).
- Diagramas de barras, apilados y agrupados, representando la distribución proporcional de semillas viables (germinadas y no germinadas) y no viables presentes en cada concentración (creciente) al final de cada fase estudiada (Fase I-Inhibición, Fase II-Recuperación), para cada uno de los productos estudiados (pudiendo tratarse del grupo de aceites esenciales o hidrolatos).
- Estudio de la distribución y dispersión de los datos mediante estadísticos descriptivos básicos y representaciones gráficas.
- Comparación de medias realizando pruebas ANOVA o pruebas T, en su caso, para detectar diferencias significativas entre las semillas no viables identificadas en cada tratamiento, para cada una de las tres especies consideradas, cuando se cumple la normalidad de los datos (analizada mediante el test Shapiro-Wilk); y análisis Tukey/DMS (Mínima Diferencia Significativa) *a posteriori* ( $p < 0.05$ ), previa verificación de la homogeneidad de su varianza mediante la prueba de Levene, o Games Howell para una asunción de varianzas diferentes (Pardo y Ruíz, 2002; Montgomery, 2017). Cuando los datos no se ajustaron a la normalidad, se compararon las medias con la prueba de Kruskal-Wallis, o U de Mann-Whitney en su caso.

## 5.4 RESULTADOS

### 5.4.1 Fenología de la germinación de las semillas

En relación con la fenología *E. hirsutum*, las semillas presentaron siempre una germinación muy elevada en condiciones de fotoperiodo, tanto en las más favorables (fotoperiodo 22-16°C), como en las menos (fotoperiodo 15-10°C), y tanto en semillas recientes como en las almacenadas durante nueve meses (Figura 5.5a), que difirió significativamente de la encontrada en condiciones de oscuridad (nula o muy baja) (Figura 5.5b), y que no obstante presentaron reducciones significativas a lo largo del primer año.

La germinación se produjo muy rápidamente (4-8 días), con un tiempo medio significativamente menor en la condición más favorable (4 días) (Tabla 5.3).

En oscuridad se observó un nivel de germinación muy bajo o nulo, que se elevó significativamente al final del primer año en las condiciones menos favorables (85%).

En relación con la fenología de *R. obtusifolius* las semillas mantuvieron en fotoperiodo siempre un nivel de germinación muy elevado, tanto en las condiciones más favorables como las que no lo fueron, y tanto en semillas recién producidas como en las almacenadas nueve meses (Figura 5.5c); que difirió significativamente del observado en oscuridad (nulo o muy bajo) (Figura 5.5d).

La germinación se produjo rápidamente (7-14 días), con un tiempo medio que bajó significativamente a los nueve meses en ambas condiciones, y menor para la más favorable (7 días) (Tabla 5.3).

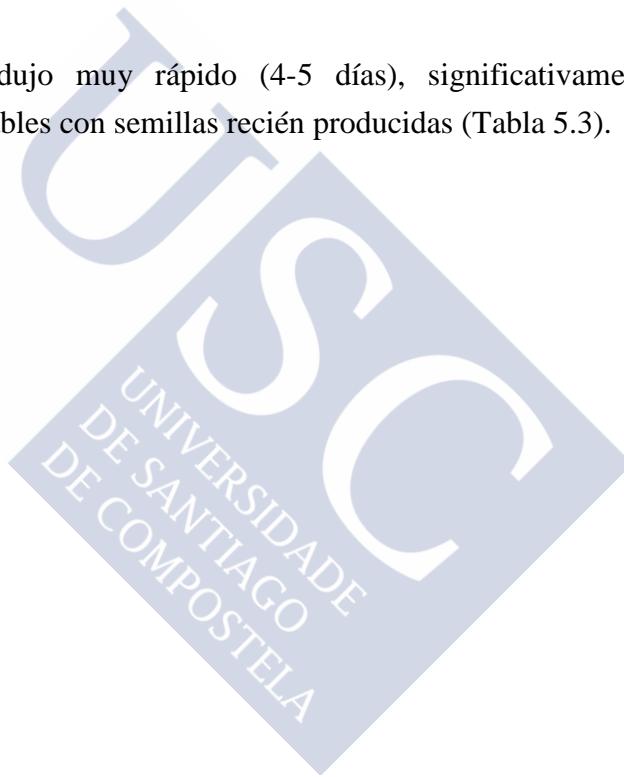
En relación con las condiciones de oscuridad, los niveles de germinación se mantuvieron bajos o nulos para ambas condiciones a lo largo del primer año.

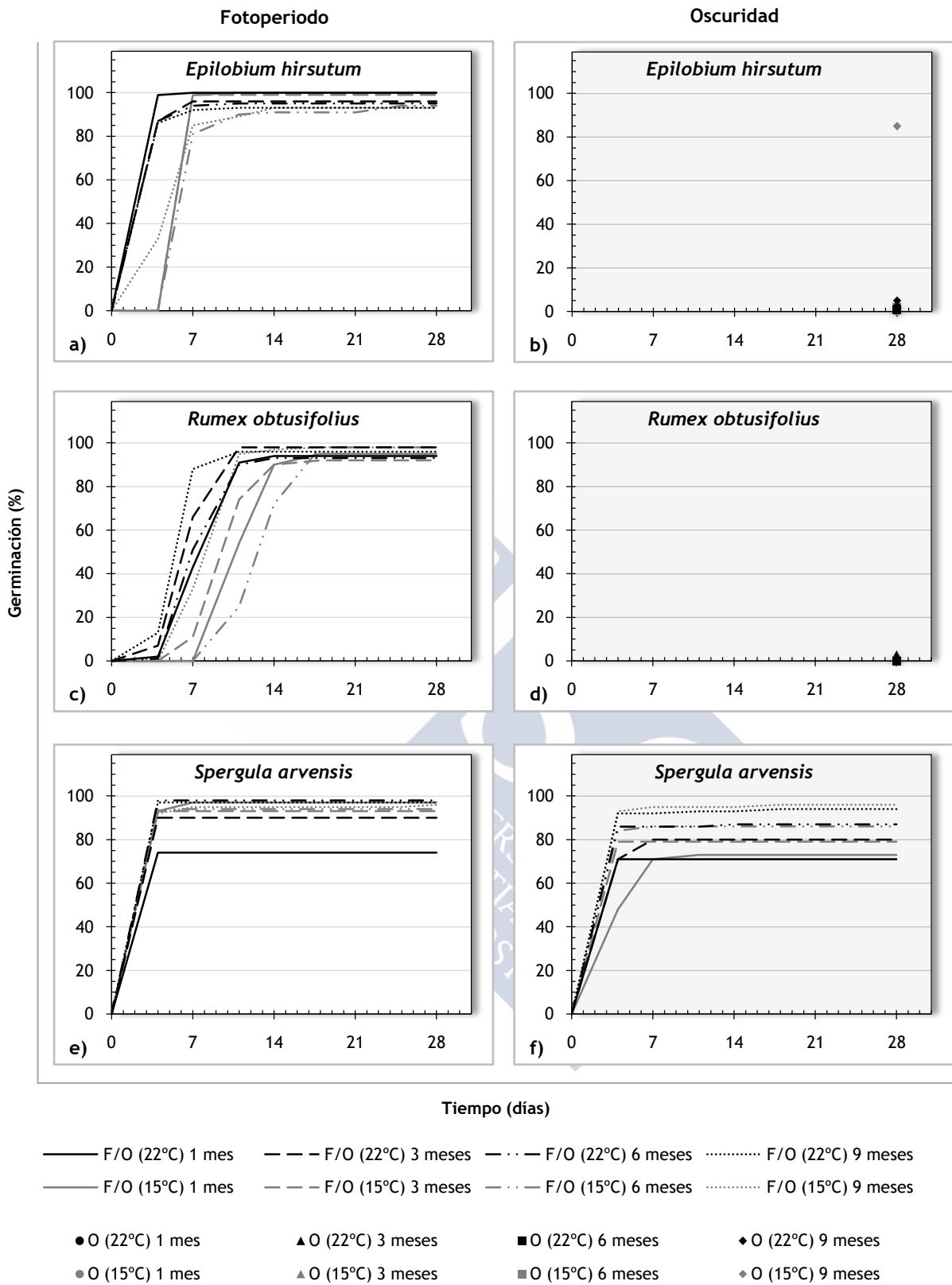
En relación con la fenología de *S. arvensis* en fotoperiodo, para las condiciones menos favorables se observaron siempre niveles de germinación muy elevados, en las condiciones menos favorables se incrementó significativamente la germinación en los seis primeros meses hasta valores similares (Figura 5.5e).

La germinación se produjo siempre muy rápido (4días), en ambas condiciones (Tabla 5.3).

En relación con las condiciones de oscuridad, los niveles de germinación fueron similares para ambas condiciones a lo largo del año, incrementándose significativamente con el almacenamiento de las semillas hasta valores muy elevados (Figura 5.5f).

La germinación se produjo muy rápido (4-5 días), significativamente más lenta en condiciones menos favorables con semillas recién producidas (Tabla 5.3).





**Figura 5.5** Germinación media acumulada (%) de *Epilobium hirsutum* (a y b), *Rumex obtusifolius* (c y d) y *Spergula arvensis* (e y f) a lo largo del tiempo (cuatro semanas); semillas de 2016 en el primer año tras su formación (recién producidas, 3, 6 y 9 meses de almacenamiento), en condiciones de fotoperiodo (F): favorables para su germinación (16-8 h, 22-16°C) y menos favorables similares a las de otoño-primavera (12 h, 15-10°C), y oscuridad (O).

**Tabla 5.3** Tiempo medio (días) de germinación de las semillas (2016) de *Epilobium hirsutum*, *Rumex obtusifolius* y *Spergula arvensis* en el primer año tras su formación (recién producidas, 3, 6 y 9 meses de almacenamiento); en condiciones de fotoperiodo, favorables para su germinación (16-8 h, 22-16°C) y menos favorables similares a las de otoño-primavera (12 h, 15-10°C), y oscuridad. F(15-10°C): fotoperiodo (12 h, 15-10°C), F(22-16°C): fotoperiodo (16-8 h, 22-16°C), O(15-10°C): oscuridad (12 h, 15-10°C), O(22-16°C): oscuridad (16-8 h, 22-16°C).

	FOTOPERIODO			
	<i>Epilobium hirsutum</i>	<i>Rumex obtusifolius</i>	<i>Spergula arvensis</i>	
F(15-10°C)-1 mes	7.04 ± 0.04 a	12.51 ± 0.23 a	4.12 ± 0.05 a	a*
F(15-10°C)-3 meses	7.00 ± 0.00 a	11.19 ± 0.32 b	4.00 ± 0.00 a	a*
F(15-10°C)-6 meses	8.05 ± 0.22 b	14.30 ± 0.20 c	4.00 ± 0.00 a	a*
F(15-10°C)-9 meses	6.41 ± 0.12 c	9.78 ± 0.21 d	4.34 ± 0.26 a	a*
F(22-16°C)-1 mes	4.03 ± 0.03 d	9.23 ± 0.39 de	4.00 ± 0.00 a	a**
F(22-16°C)-3 meses	4.29 ± 0.06 e	8.10 ± 0.27 e	4.00 ± 0.00 a	a**
F(22-16°C)-6 meses	4.30 ± 0.07 e	8.83 ± 0.44 e	4.00 ± 0.00 a	a**
F(22-16°C)-9 meses	4.29 ± 0.13 e	6.93 ± 0.10 f	4.00 ± 0.00 a	a**
	OSCURIDAD			
	<i>Epilobium hirsutum</i>	<i>Rumex obtusifolius</i>	<i>Spergula arvensis</i>	
O(15-10°C)-1 mes			5.16 ± 0.28 a	b*
O(15-10°C)-3 meses			4.00 ± 0.00 b	a*
O(15-10°C)-6 meses			4.07 ± 0.04 b	a*
O(15-10°C)-9 meses			4.20 ± 0.20 b	a*
O(22-16°C)-1 mes			4.00 ± 0.00 b	a**
O(22-16°C)-3 meses			4.32 ± 0.12 b	b**
O(22-16°C)-6 meses			4.13 ± 0.13 b	ab**
O(22-16°C)-9 meses			4.23 ± 0.15 b	ab**

Valores medios ± error estándar y test *post hoc* DMS ( $p < 0.05$ ), o test correspondiente, letras iguales para una misma especie indican que no hay diferencias significativas entre condiciones (temperatura y almacenamiento). Los valores medios se corresponden con los datos sin transformar, los resultados de la prueba ANOVA, o la correspondiente en su caso, y comparaciones *post hoc* se han interpretado a partir de datos previamente transformados.

\* Comparaciones en 15-10°C, \*\* comparaciones en 22-16°C.

## 5.4.2 Bioensayos de fitotoxicidad *in vitro*

### 5.4.2.1 Efecto sobre la germinación de las semillas

Se evaluó la dinámica de la germinación de las semillas de *E. hirsutum*, *R. obtusifolius* y *S. arvensis*, para los bioensayos de fitotoxicidad *in vitro* con aceites esenciales, quimiotipados (*R. officinalis*, *T. vulgaris*, *T. zygis*) o no (*O. vulgare*), e hidrolatos, quimiotipados (*T. vulgaris*, *T. zygis*) o no (*O. vulgare*), en cada una de las cuatro concentraciones decrecientes, para la Fase I-Inhibición y globalmente a la finalización de la Fase II-Recuperación.

En relación con la dinámica de *E. hirsutum* (Figura 5.6), para la Fase I-Inhibición, el nivel final de germinación se redujo significativamente con el aceite de *O. vulgare* en todas las concentraciones, inhibiéndose totalmente en las tres más altas (2, 1, 0.5  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) y presentando valores muy bajos (11%) en la menor (0.25  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ), que difirió significativamente de las tres anteriores (Figura 5.6a). Con el aceite de *R. officinalis* no varió el nivel de germinación, que se mantuvo similar al control con las dos concentraciones más elevadas (Figura 5.6b). El aceite de *T. vulgaris* redujo significativamente la germinación, inhibiéndola totalmente en su mayor concentración, manteniendo en las tres siguientes valores similares al control (Figura 5.6c). Con el aceite de *T. zygis* se redujo significativamente germinación, inhibiéndola completamente en las tres primeras concentraciones, alcanzando valores elevados (77%) en la concentración más baja, que difirió significativamente de las tres anteriores (Figura 5.6d).

En cuanto al tiempo medio de germinación, éste se elevó significativamente para los aceites a medida que se incrementó su concentración, incluso con el aceite de *T. vulgaris* (de 4 a 10 días) con el cual los niveles de germinación, cuando ésta no se inhibió, se mantuvieron similares al control, si bien la germinación ocurrió muy rápido en todo caso (Tabla 5.4).

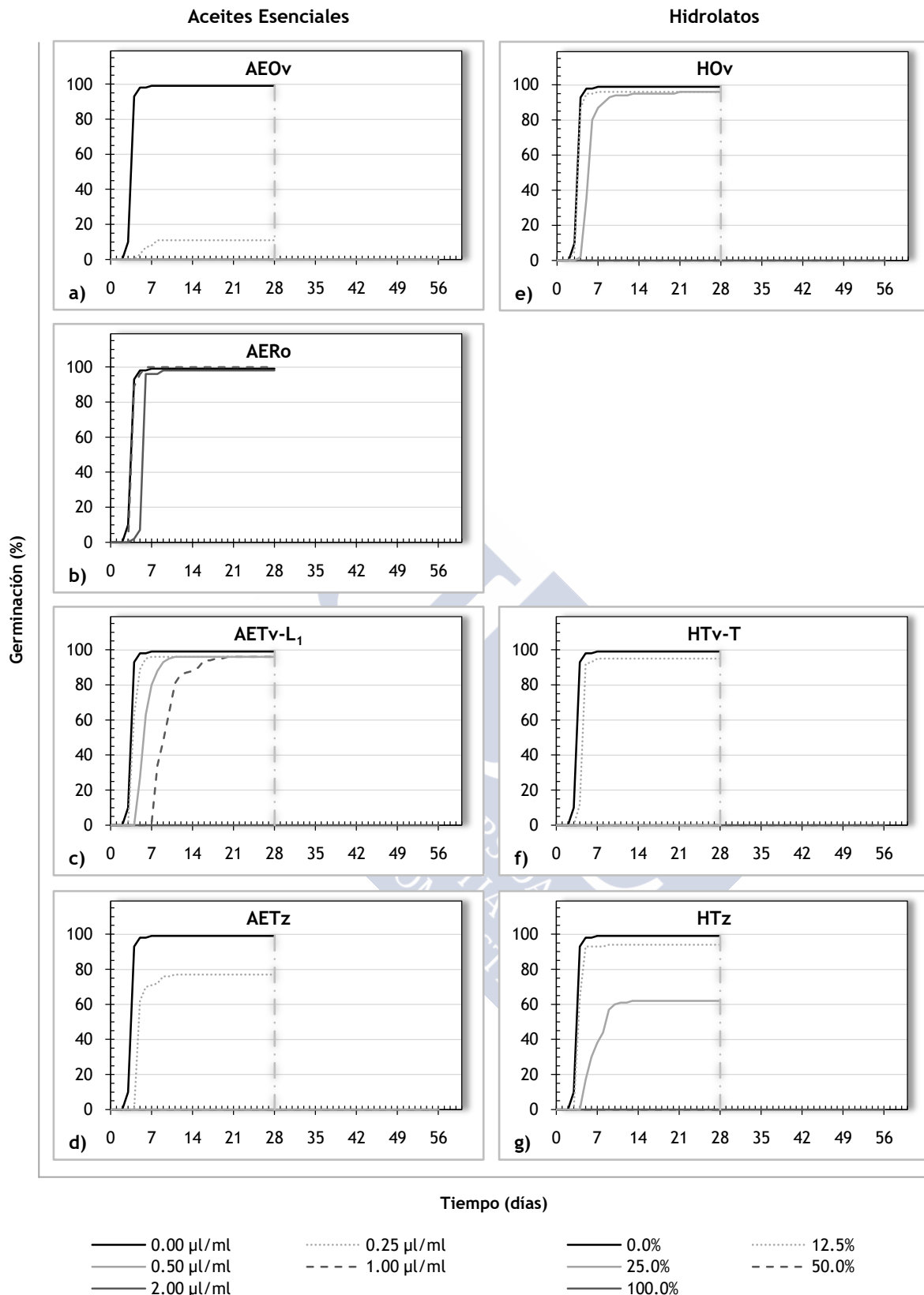
En relación a los hidrolatos, el de *O. vulgare* inhibió completamente la germinación en las dos concentraciones más elevadas (100, 50%), que difirieron del control, observándose niveles similares a los de éste en las dos más bajas (25, 12.5%) (Figura 5.6e). Con el hidrolato de *T. vulgaris* se redujo el nivel de germinación significativamente en todas las concentraciones, inhibiéndose totalmente en las tres primeras y manteniendo niveles muy elevados en la última, que difirió de las tres anteriores (Figura 5.6f). Finalmente, el hidrolato de *T. zygis* redujo significativamente la germinación en las tres primeras concentraciones, observándose

una inhibición total en las dos más elevadas, y alcanzando valores medios en la tercera, que difirió de las dos anteriores (Figura 5.6g).

En cuanto al tiempo medio de germinación, se elevó significativamente cuando lo hizo la concentración, de 4 a 7 días con el hidrolato de *T. zygis*, excepto en la más baja de *O. vulgare*, similar al del control, ocurriendo una germinación muy rápida siempre (Tabla 5.4).

La dinámica de la germinación de esta especie no se modificó tras el alivio de su exposición a aceites e hidrolatos (Fase II-Recuperación), manteniendo los niveles finales de germinación observados en la fase anterior (Fase I-Inhibición).





**Figura 5.6** Germinación media acumulada (%) de semillas de 2016 de *Epilobium hirsutum* para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control (0) y con concentraciones decrecientes de los aceites esenciales (2, 1, 0.5 y 0.25 µl ml<sup>-1</sup>) e hidrolatos (100, 50, 25 y 12.5%). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (c), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (d), HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* (e), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (f), HTz: hidrolato de *Thymus zygis* (g).

**Tabla 5.4** Tiempo medio (días) de germinación de las semillas de 2016 de *Epilobium hirsutum* para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas), en el control (0) y con concentraciones (C) decrecientes de los aceites esenciales (2, 1, 0.5 y 0.25  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) e hidrolatos (100, 50, 25 y 12.5%). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare*, AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub>, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis*, HOv: hidrolato de *Origanum vulgare*, HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis*.

C ( $\mu\text{l ml}^{-1}$ )	ACEITES ESENCIALES			
	AEOv	AERo	AETv-L <sub>1</sub>	AETz
0.00	3.98 ± 0.03 a	3.98 ± 0.03 a	3.98 ± 0.03 a	3.98 ± 0.03 a
0.25	6.74 ± 0.63 b		4.42 ± 0.09 d	5.52 ± 0.21 b
0.50			6.37 ± 0.31 c	
1.00		4.15 ± 0.04 c	10.02 ± 0.29 b	
2.00		5.97 ± 0.09 b		

C (%)	HIDROLATOS		
	HOv	HTv-T	HTz
0.0	3.98 ± 0.03 a	3.98 ± 0.03 a	3.98 ± 0.03 a
12.5	4.07 ± 0.05 a	4.93 ± 0.07 b	4.36 ± 0.08 c
25.0	6.12 ± 0.20 b		7.08 ± 0.29 b
50.0			
100.0			

Valores medios ± error estándar y test *post hoc* DMS ( $p < 0.05$ ), o test correspondiente, letras iguales para un mismo producto indican que no hay diferencias significativas entre concentraciones. Los valores medios se corresponden con los datos sin transformar, los resultados de la prueba ANOVA, o la correspondiente en su caso, y comparaciones *post hoc* se han interpretado a partir de datos previamente transformados.

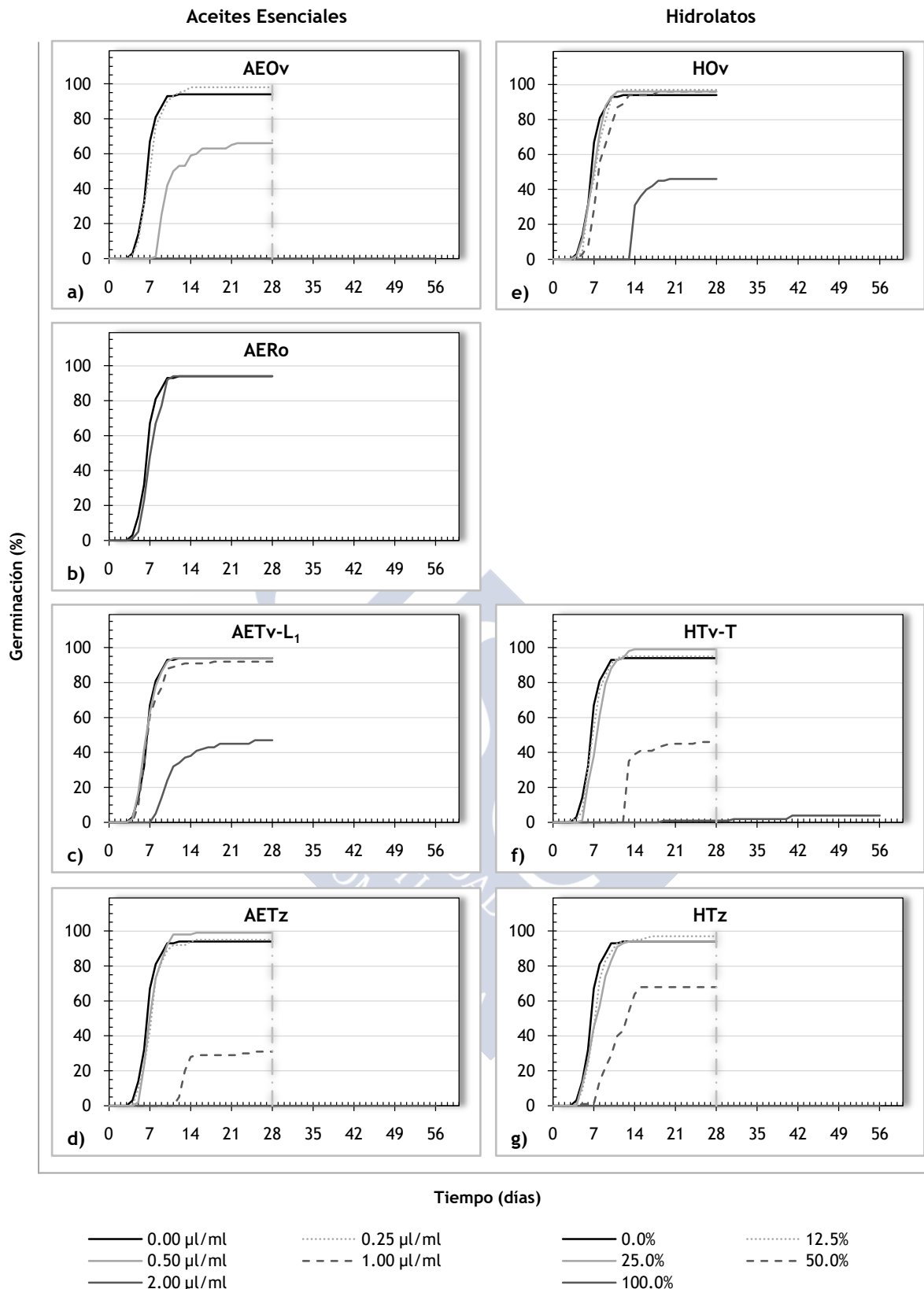
En relación con la dinámica de *R. obtusifolius* (Figura 5.7), para la Fase I-Inhibición, el nivel final de germinación se redujo significativamente con el aceite de *O. vulgare* en las tres primeras concentraciones, inhibiéndose totalmente en las dos primeras, y presentando valores medios para la tercera (66%), que difirió significativamente de las dos anteriores (Figura 5.7a). Con el aceite de *R. officinalis* no varió el nivel de germinación, que se mantuvo similar al control ya con la concentración más elevada (Figura 5.7b). El aceite de *T. vulgaris* redujo significativamente la germinación, inhibiéndola totalmente en su mayor concentración, manteniendo en las dos siguientes valores similares al control (Figura 5.7c). Con el aceite de *T. zygis* se redujo significativamente la germinación, inhibiéndola completamente en la primera concentración, manteniendo valores bajos (31%) en la segunda, de la que difirió significativamente (Figura 5.7d).

En cuanto al tiempo medio de germinación, éste se elevó significativamente para los aceites, en la tercera concentración en el aceite de *O. vulgare*, para la más elevada de *T. vulgaris* y a medida que se aumentó la concentración en *T. zygis* (de 7 a 14 días), observándose una germinación rápida en todo caso (Tabla 5.5).

En relación a los hidrolatos, el de *O. vulgare* redujo significativamente el nivel de germinación, que se mantuvo en niveles medios en la mayor concentración (Figura 5.7e). Con el hidrolato de *T. vulgaris* se inhibió significativamente la germinación en las dos primeras concentraciones, totalmente en la mayor y hasta valores medios con la segunda, que difirió de la otra (Figura 5.7f). Finalmente, el hidrolato de *T. zygis* se comportó de modo similar, reduciendo la germinación significativamente, inhibiéndola en la primera concentración y manteniendo valores medios en la siguiente, que difirieron de la anterior (Figura 5.7g).

En cuanto al tiempo medio de germinación, éste se elevó significativamente en la primera y segunda concentración con el hidrolato de *O. vulgare* (de 7 a 15 días), a medida que lo hicieron éstas, con las dos intermedias en el caso del hidrolato de *T. vulgaris*, difiriendo entre sí, y con la segunda con el hidrolato de *T. zygis*, ocurriendo una germinación rápida siempre (Tabla 5.5).

La dinámica de la germinación de esta especie no se modificó significativamente tras el alivio de su exposición a aceites e hidrolatos (Fase II-Recuperación), manteniendo los niveles finales de germinación observados en la fase anterior.



**Figura 5.7** Germinación media acumulada (%) de semillas de 2016 de *Rumex obtusifolius* para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control (0) y con concentraciones decrecientes de los aceites esenciales (2, 1, 0.5 y 0.25 µl ml<sup>-1</sup>) e hidrolatos (100, 50, 25 y 12.5%). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (c), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (d), HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* (e), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (f), HTz: hidrolato de *Thymus zygis* (g).

**Tabla 5.5** Tiempo medio (días) de germinación de las semillas de 2016 de *Rumex obtusifolius* para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas), en el control (0) y con concentraciones (C) decrecientes de los aceites esenciales (2, 1, 0.5 y 0.25  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) e hidrolatos (100, 50, 25 y 12.5%). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare*, AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub>, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis*, HOv: hidrolato de *Origanum vulgare*, HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis*.

C ( $\mu\text{l ml}^{-1}$ )	ACEITES ESENCIALES			
	AEOv	AERo	AETv-L <sub>1</sub>	AETz
0.00	6.99 ± 0.20 a	6.99 ± 0.20 a	6.99 ± 0.20 a	6.99 ± 0.20 a
0.25	7.61 ± 0.15 a			7.73 ± 0.15 c
0.50	11.01 ± 0.49 b		6.96 ± 0.22 a	7.76 ± 0.26 c
1.00			7.40 ± 0.28 a	13.92 ± 0.39 b
2.00		7.69 ± 0.20 a	12.13 ± 1.14 b	

C (%)	HIDROLATOS		
	HOv	HTv-T	HTz
0.0	6.99 ± 0.20 a	6.99 ± 0.20 a	6.99 ± 0.20 a
12.5	7.69 ± 0.15 d	7.38 ± 0.07 a	7.85 ± 0.33 c
25.0	7.35 ± 0.13 ad	8.20 ± 0.26 c	7.89 ± 0.09 c
50.0	8.78 ± 0.40 c	13.97 ± 0.51 b	10.99 ± 0.30 b
100.0	14.88 ± 0.44 b		

Valores medios ± error estándar y test *post hoc* DMS ( $p < 0.05$ ), o test correspondiente, letras iguales para un mismo producto indican que no hay diferencias significativas entre concentraciones. Los valores medios se corresponden con los datos sin transformar, los resultados de la prueba ANOVA, o la correspondiente en su caso, y comparaciones *post hoc* se han interpretado a partir de datos previamente transformados.

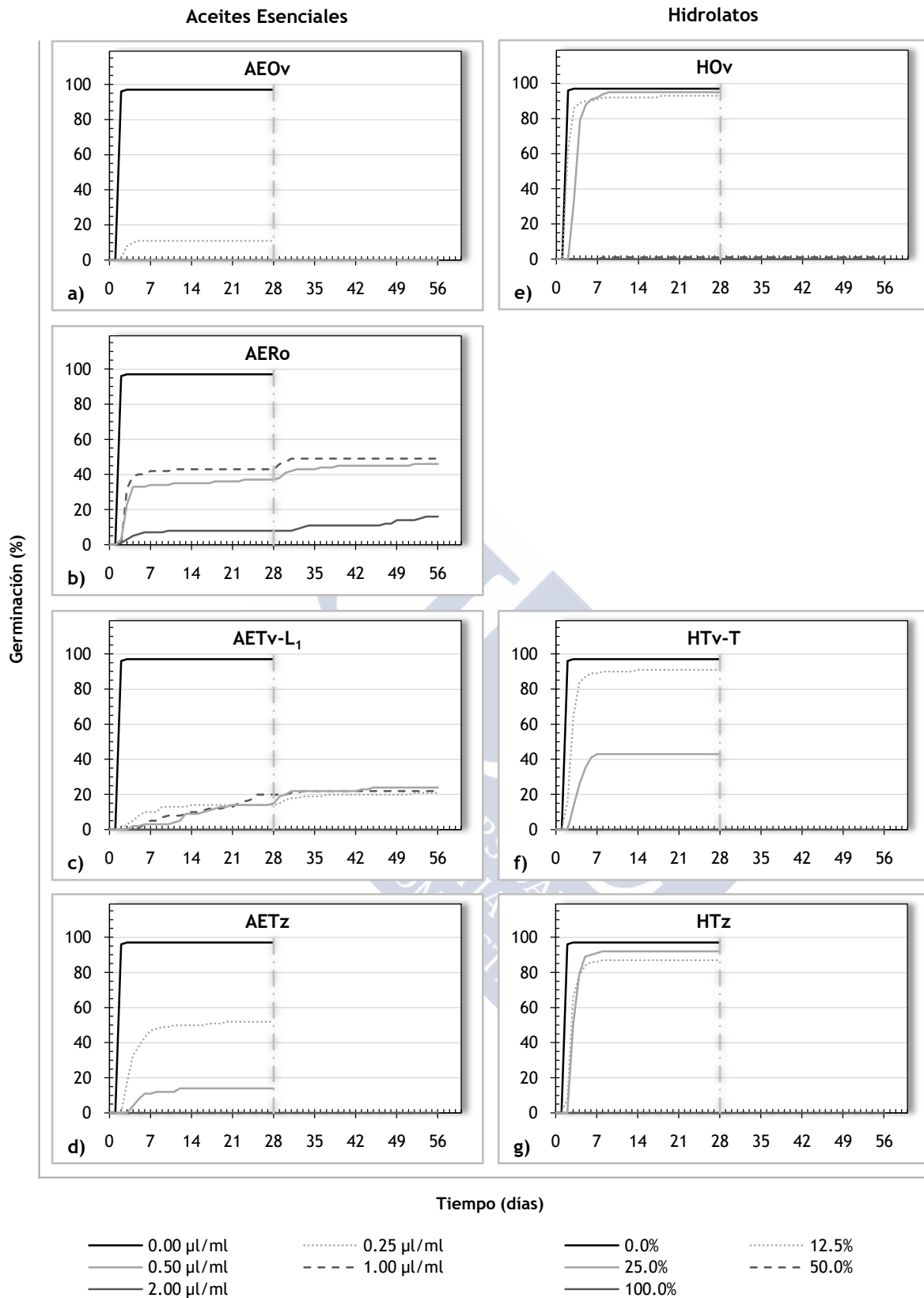
En relación con la dinámica de *S. arvensis* (Figura 5.8), para la Fase I-Inhibición el nivel final de germinación se redujo significativamente con todos los aceites, incluso en las concentraciones más bajas. Con el aceite de *O. vulgare* en todas las concentraciones, inhibiéndose totalmente en las tres primeras y presentando valores muy bajos (11%) en la cuarta, que difirió significativamente de las tres anteriores (Figura 5.8a). Con el aceite de *R. officinalis*, se redujo significativamente el nivel de germinación, alcanzando valores muy bajos en la mayor concentración y medios en las dos concentraciones siguientes, de las que difirió (Figura 5.8b). El aceite de *T. vulgaris* redujo significativamente la germinación, inhibiéndola totalmente, en su mayor concentración, manteniendo en las tres siguientes valores bajos, que no difirieron entre sí (Figura 5.8c). Con el aceite de *T. zygis* se redujo significativamente germinación, inhibiéndola completamente en las dos concentraciones más elevadas, manteniendo valores bajos en la siguiente y medios (52%) en la más baja, difiriendo de las primeras y de la tercera (Figura 5.8d).

En cuanto al tiempo medio de germinación, éste se elevó significativamente para los aceites en todas sus concentraciones, destacando el aceite de *T. vulgaris*, en el que se observó un cambio de 2 a 18 días en las dos concentraciones más elevadas, que no difirieron entre sí (Tabla 5.6).

En relación a los hidrolatos, el nivel de germinación se inhibió totalmente para todos los hidrolatos en las dos concentraciones más elevadas. El hidrolato de *O. vulgare* inhibió completamente la germinación en las dos concentraciones más elevadas, que difirieron del control, observándose niveles similares al de éste en las dos más bajas (Figura 5.8e). Con el hidrolato de *T. vulgaris* se redujo el nivel de germinación significativamente en todas las concentraciones, inhibiéndose totalmente en las dos más bajas, manteniéndose medios y elevados en la tercera y cuarta respectivamente, que difirieron de las anteriores y entre sí (Figura 5.8f). El hidrolato de *T. zygis* redujo significativamente la germinación inhibiéndola totalmente en las dos concentraciones más elevadas (Figura 5.8g).

En cuanto al tiempo medio de germinación, éste se elevó significativamente cuando lo hizo la concentración para todos los hidrolatos, de 2 a 4 días en el hidrolato de *O. vulgare* o *T. vulgaris*, produciéndose una germinación muy rápida en todo caso (Tabla 5.6).

La dinámica de la germinación de esta especie tampoco se modificó de modo significativo tras el alivio de su exposición a aceites e hidrolatos (Fase II-Recuperación), manteniendo niveles finales de germinación similares a los de la primera fase.



**Figura 5.8** Germinación media acumulada (%) de semillas de 2016 de *Spargula arvensis* para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control (0) y con concentraciones decrecientes de los aceites esenciales (2, 1, 0.5 y 0.25 µl ml<sup>-1</sup>) e hidrolatos (100, 50, 25 y 12.5%). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (c), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (d), HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* (e), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (f), HTz: hidrolato de *Thymus zygis* (g).

**Tabla 5.6** Tiempo medio (días) de germinación de las semillas de 2016 de *Spergula arvensis* para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas), en el control (0) y con concentraciones (C) decrecientes de los aceites esenciales (2, 1, 0.5 y 0.25  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) e hidrolatos (100, 50, 25 y 12.5%). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare*, AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub>, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis*, HOv: hidrolato de *Origanum vulgare*, HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis*.

C ( $\mu\text{l ml}^{-1}$ )	ACEITES ESENCIALES			
	AEOv	AERo	AETv-L <sub>1</sub>	AETz
0.00	2.01 ± 0.01 a	2.01 ± 0.01 a	2.01 ± 0.01 a	2.01 ± 0.01 a
0.25	3.41 ± 0.22 b		6.20 ± 1.13 c	5.04 ± 0.43 b
0.50		4.43 ± 0.56 b	15.08 ± 2.39 b	6.93 ± 1.69 b
1.00		3.58 ± 0.20 b	18.26 ± 2.93 b	
2.00		4.50 ± 0.65 b		

C (%)	HIDROLATOS		
	HOv	HTv-T	HTz
0.0	2.01 ± 0.01 a	2.01 ± 0.01 a	2.01 ± 0.01 a
12.5	2.64 ± 0.12 c	3.34 ± 0.07 c	3.33 ± 0.14 c
25.0	3.99 ± 0.12 b	4.28 ± 0.13 b	3.66 ± 0.10 b
50.0			
100.0			

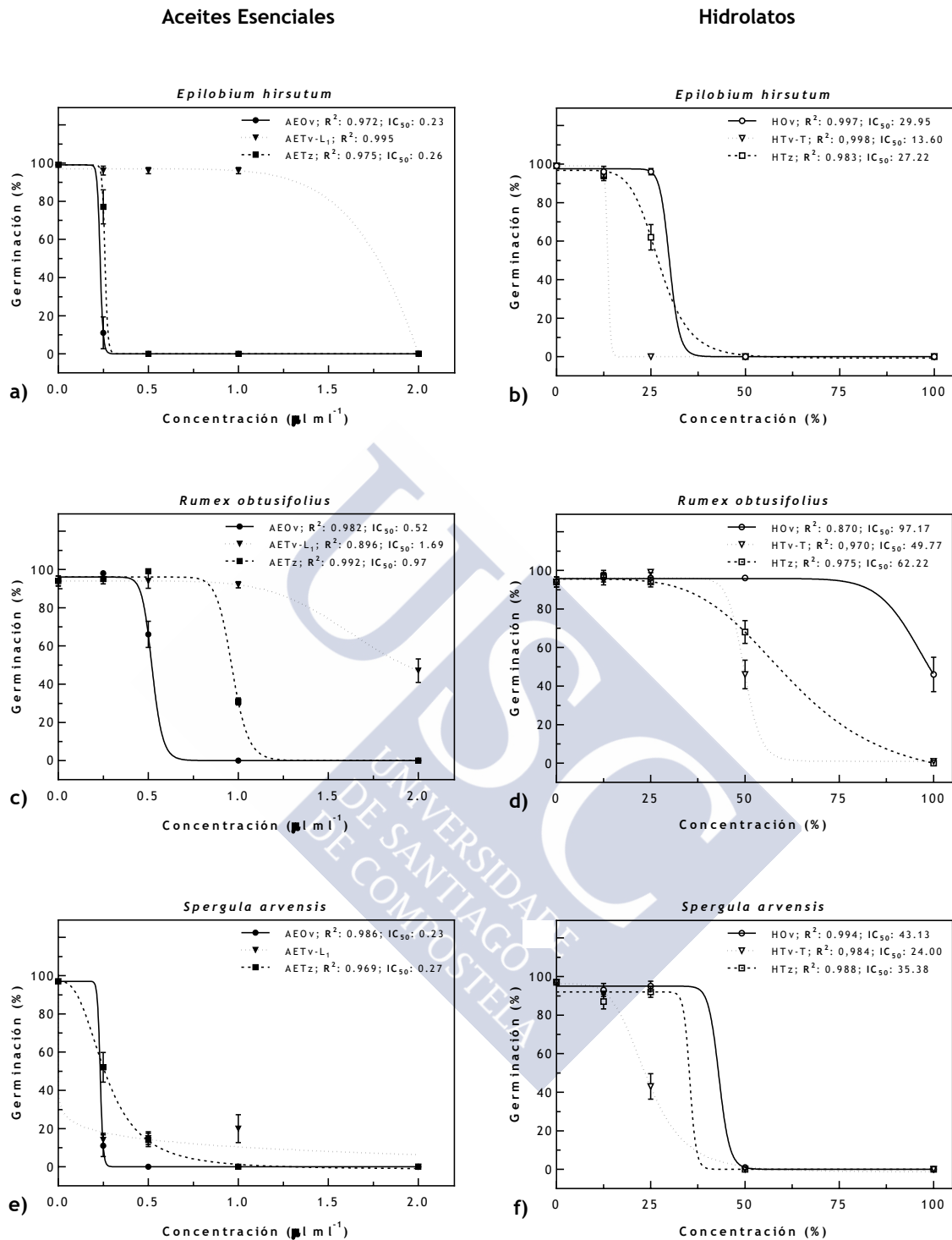
Valores medios ± error estándar y test *post hoc* DMS ( $p < 0.05$ ), o test correspondiente, letras iguales para un mismo producto indican que no hay diferencias significativas entre concentraciones. Los valores medios se corresponden con los datos sin transformar, los resultados de la prueba ANOVA, o la correspondiente en su caso, y comparaciones *post hoc* se han interpretado a partir de datos previamente transformados.

En cuanto a los bioensayos dosis-respuesta (Figura 5.9), y en lo que respecta a los aceites esenciales, la reducción de la respuesta germinativa se hizo evidente en su  $IC_{50}$ , con valores muy bajos para los aceites de *O. vulgare* y *T. zygis*, en *E. hirsutum* ( $R^2$  0.972, 0.975, respectivamente) (Figura 5.9a) y *S. arvensis* ( $R^2$  0.986, 0.969, respectivamente) (Figura 5.9e), similares a los de la mínima concentración ensayada ( $0.25 \mu\text{l ml}^{-1}$ ); menos bajos fueron los valores para estos aceites cuando se trataba de *R. obtusifolius*, que presentó valores elevados con el aceite de *T. vulgaris* (Figura 5.9c).

Se observó la siguiente tendencia del efecto fitotóxico para las tres especies: aceite de *O. vulgare* > aceite de *T. zygis* > aceite de *T. vulgaris* (para *R. obtusifolius*).

Respecto a los hidrolatos, el  $IC_{50}$  presentó valores muy bajos para el hidrolato de *T. vulgaris* en *E. hirsutum* ( $R^2$  0.998), menos bajos para los otros dos (Figura 5.9b), igual que ocurre para estos hidrolatos en *S. arvensis* (Figura 5.9f); los valores fueron más elevados para los hidrolatos de *Thymus* en *R. obtusifolius*, siendo muy elevados para el hidrolato de *O. vulgare* (Figura 5.9d).

La tendencia de fitotoxicidad observada para estos hidrolatos fue la siguiente: hidrolato de *T. vulgaris* > hidrolato de *T. zygis* > hidrolato de *O. vulgare*.

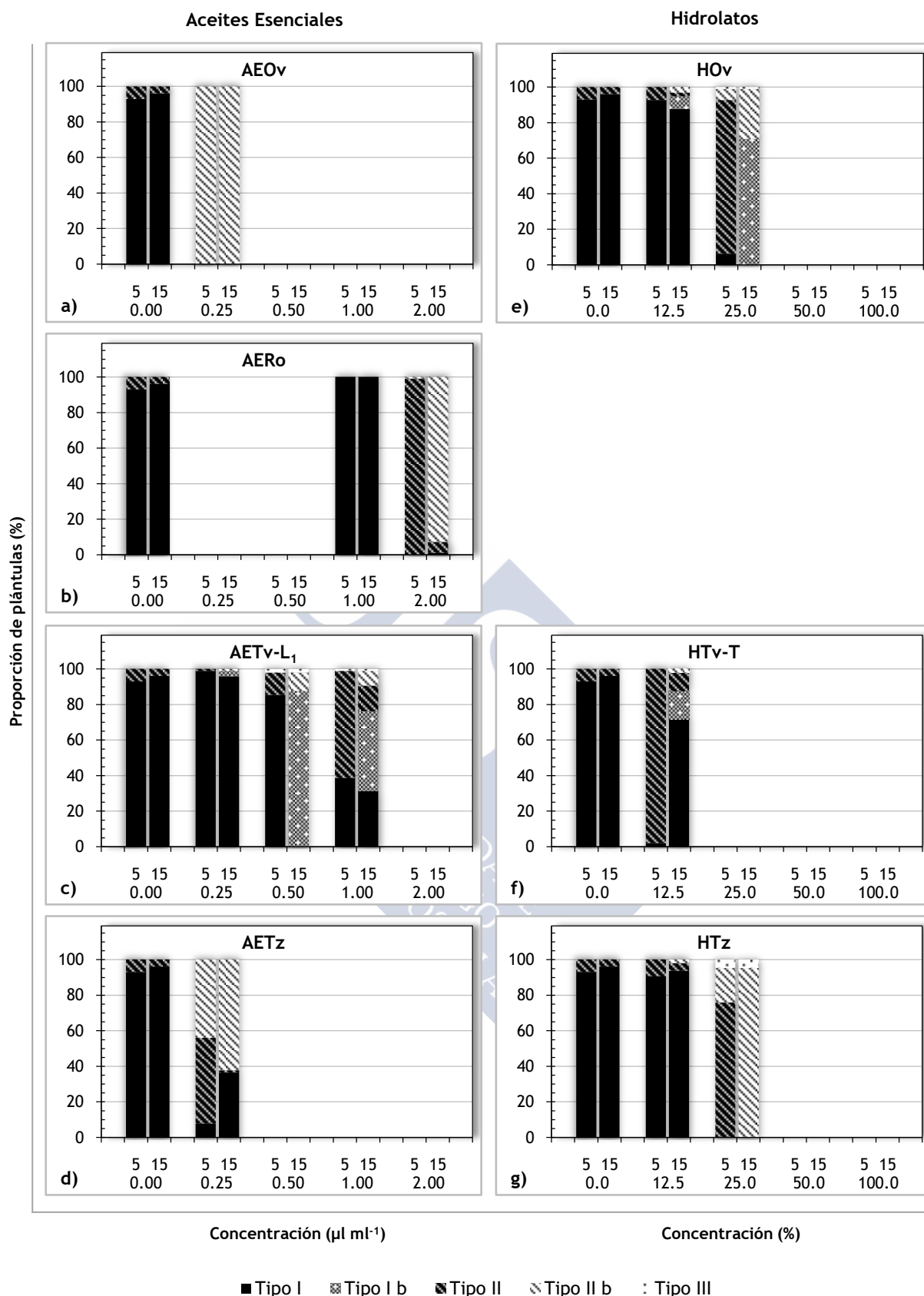


**Figura 5.9** Efecto fitotóxico inhibitor sobre la germinación (%) de las semillas de *Epilobium hirsutum* (a y b), *Rumex obtusifolius* (c y d) y *Spergula arvensis* (e y f), de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* (AEOv), *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (AETv-L<sub>1</sub>) y *Thymus zygis* (AETz) y los correspondientes hidrolatos de *Origanum vulgare* (HOv), *Thymus vulgaris* timol (HTv-T) y *Thymus zygis* (HTz), en concentraciones crecientes, evaluado transcurridas cuatro semanas. Los datos fueron analizados mediante una curva sigmoideal dosis-respuesta (pendiente variable), representando el error estándar de la media.  $R^2$ : coeficiente de determinación,  $IC_{50}$ : Concentración Inhibitoria Máxima Media.

## 5.4.2.2 Efecto sobre el crecimiento inicial

En relación a las categorías tipológicas de las plántulas de *E. hirsutum* (Figura 5.10), para la Fase I-Inhibición, incluso la concentración más baja de aceite de *O. vulgare* ( $0.25 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) afectó a la viabilidad de las plántulas (tipo II), confirmando su actividad a los 15 días de observación (Figura 5.10a). Con el aceite de *R. officinalis*, la concentración más elevada ( $2 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) afectó a la viabilidad de las plántulas que se confirmó mostrando signos de clorosis a los 15 días de seguimiento; con la siguiente concentración ya se observó un nivel muy elevado de plántulas viables, que se mantuvo a los 15 días (Figura 5.10b). En cuanto al aceite de *T. vulgaris*, el nivel de plántulas no viables examinadas a los 5 días descendió a medida que lo hizo la concentración del aceite, observándose niveles bajos de plántulas viables a los 15 días, excepto en la concentración más baja en la que se observó un nivel de plántulas viables muy elevado que se mantuvo en el plazo de 15 días (Figura 5.10c). Con el aceite de *T. zygis* se observó un nivel muy elevado de plántulas no viables a los 5 días en la concentración más baja, si bien existe una cierta recuperación de la viabilidad a los 15 días de plántulas evaluadas inicialmente como no viables (Figura 5.10d).

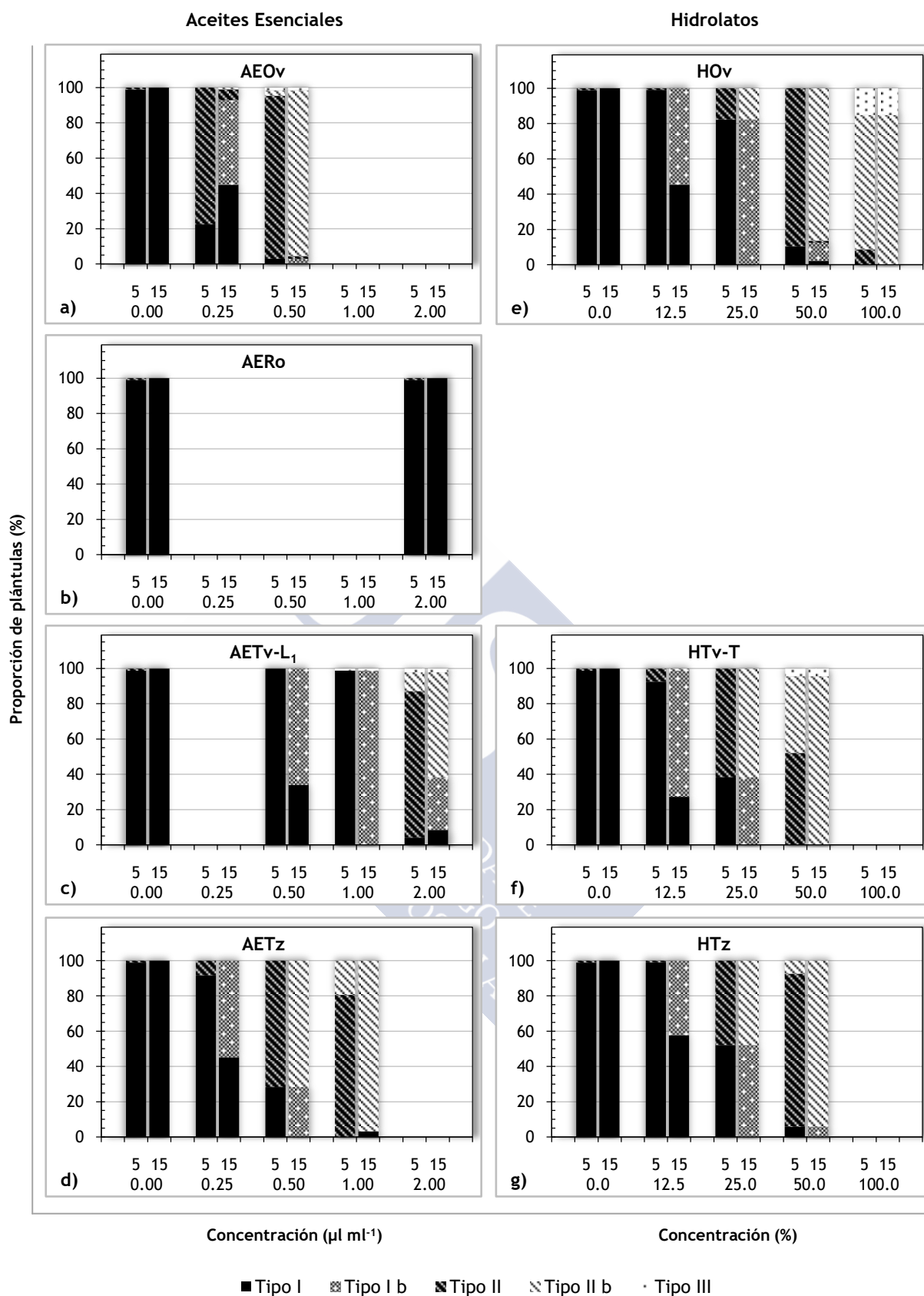
En cuanto a los hidrolatos, el de *O. vulgare* y el de *T. zygis* afectaron a la viabilidad de las plántulas en la tercera concentración estudiada (25%), actividad que se confirmó a los 15 días; si bien, en la concentración más baja, se observaron niveles muy elevados de plántulas viables que se mantuvieron en ese periodo (Figura 5.10e,g). Con el hidrolato de *T. vulgaris*, en la concentración más baja, se observó una recuperación de la viabilidad de las plántulas a los 15 días hasta valores elevados (Figura 5.10f).



**Figura 5.10** Distribución de los tipos de plántulas (%) de *Epilobium hirsutum* a los 5 y 15 días para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas), en el control (0) y con concentraciones crecientes de los aceites esenciales (0.25, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) e hidrolatos (12.5, 25, 50 y 100%). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (c), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (d), HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* (e), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (f), HTz: hidrolato de *Thymus zygis* (g).

En relación a las categorías tipológicas de las plántulas de *R. obtusifolius* (Figura 5.11), para la Fase I-Inhibición, la tercera concentración de aceite de *O. vulgare* afectó a la viabilidad de las plántulas (tipo II), confirmando su actividad con la observación de plántulas cloróticas a los 15 días; en la concentración más baja se observaron plántulas viables, que se incrementaron hasta valores medios en ese plazo (Figura 5.11a). Con el aceite de *R. officinalis*, la concentración más elevada no afectó a la viabilidad de las plántulas que se mantuvo a los 15 días de seguimiento (Figura 5.11b). En cuanto al aceite de *T. vulgaris*, en la concentración más alta se confirmó un nivel muy elevado de plántulas no viables; mientras que concentraciones más bajas no afectaron a la viabilidad a los 5 días, aunque sí en el plazo de 15 días, con pérdida total o parcial de esta viabilidad (observación de tipos cloróticos) en las siguientes concentraciones (Figura 5.11c). Con el aceite de *T. zygis* el nivel de plántulas no viables descendió a medida que lo hizo la concentración, de valores muy elevados a valores bajos a los 5 días de observación; para la segunda y tercera concentración, se mantuvo o se modificó la viabilidad a los 15 días, confirmando valores muy elevados de plántulas no viables en todo caso, lo que no ocurre en la concentración más baja, con la que se produjeron cambios en la viabilidad observada inicialmente (5 días) manteniendo un nivel medio de plántulas no viables (Figura 5.11d).

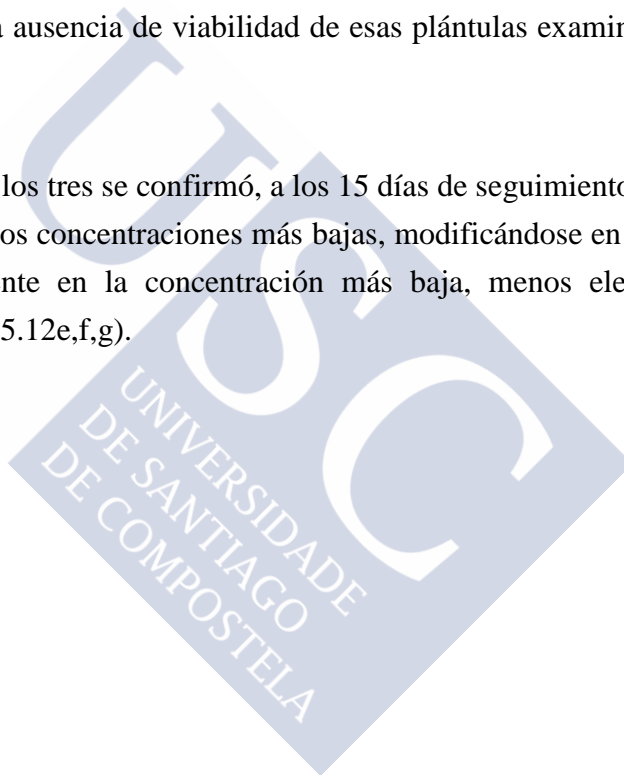
En cuanto a los hidrolatos, para los tres se confirmó, a los 15 días de seguimiento, el alto nivel de plántulas no viables observado inicialmente, en las dos concentraciones más elevadas; para la anterior concentración se observaron cambios en la viabilidad confirmándose un nivel muy elevado de plántulas no viables examinadas a los 15 días; para la menor concentración, las plántulas modificaron su elevada proporción inicial de plántulas viables, observando valores medios de plántulas no viables, siendo elevado en el caso del hidrolato de *T. vulgaris* (Figura 5.11e,f,g).

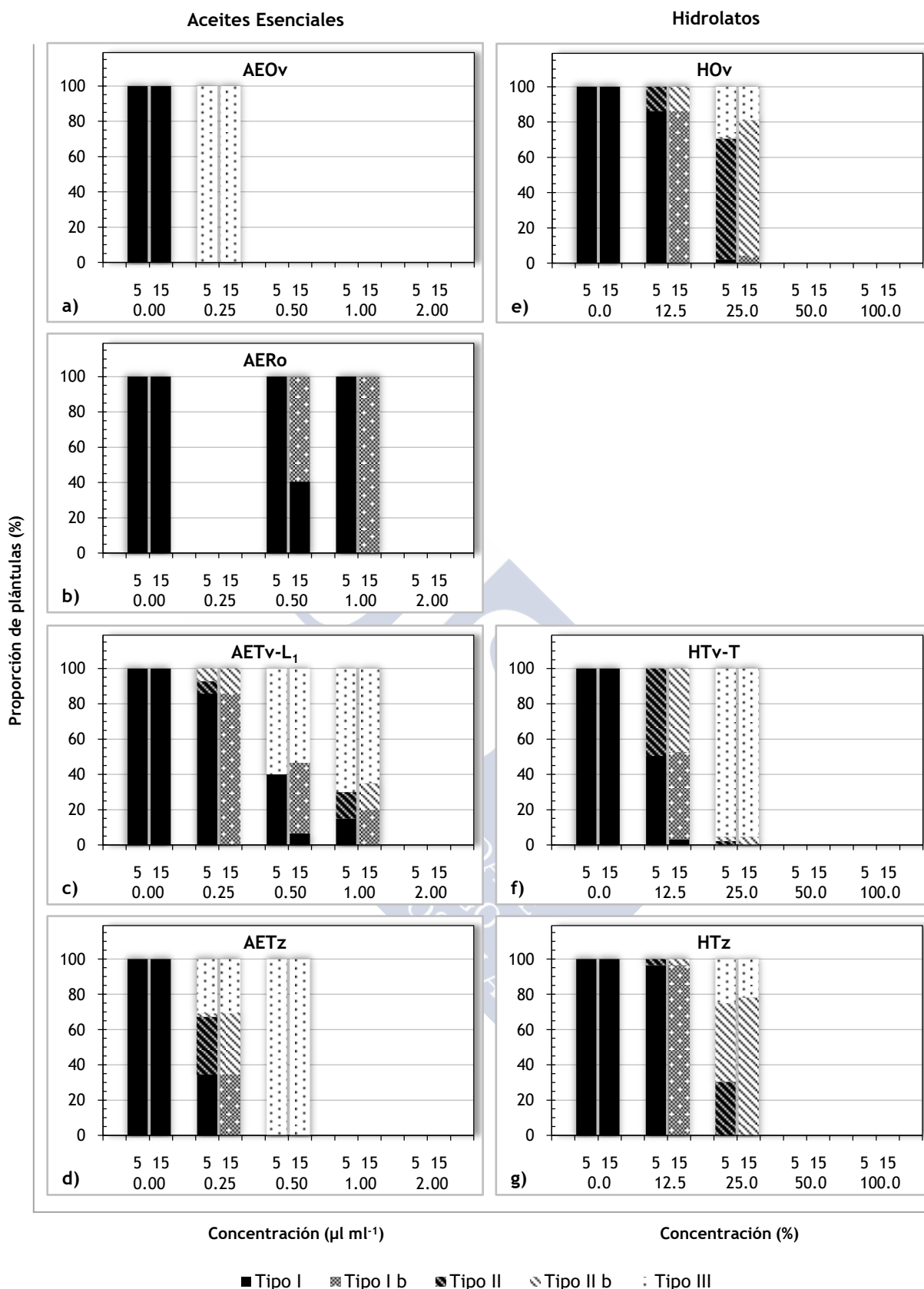


**Figura 5.11** Distribución de los tipos de plántulas (%) de *Rumex obtusifolius* a los 5 y 15 días para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas), en el control (0) y con concentraciones crecientes de los aceites esenciales (0.25, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) e hidrolatos (12.5, 25, 50 y 100%). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (c), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (d), HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* (e), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (f), HTz: hidrolato de *Thymus zygis* (g).

En relación a las categorías tipológicas de las plántulas de *S. arvensis* (Figura 5.12), para la Fase I-Inhibición, incluso la concentración más baja de aceite de *O. vulgare* ( $0.25 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) afectó a la viabilidad de las plántulas (tipo III), confirmando su actividad a los 15 días de observación (Figura 5.12a). Con el aceite de *R. officinalis*, ninguna de las dos concentraciones intermedias afectó inicialmente a la viabilidad de las plántulas que sí se modificó a los 15 días de observación, con niveles muy elevados de plántulas no viables en la segunda concentración, manteniéndose medios en la siguiente (Figura 5.12b). En cuanto al aceite de *T. vulgaris* el nivel de plántulas no viables a los 5 días disminuyó a medida que lo hizo la concentración; se confirmó en todo caso a los 15 días un elevado nivel de plántulas no viables, incluso en las concentraciones más bajas (Figura 5.12c). Finalmente, con el aceite de *T. zygis* se observó efecto inicial en la viabilidad de las plántulas, menor en la concentración más baja, si bien se confirmó la ausencia de viabilidad de esas plántulas examinadas a los 15 días (Figura 5.12d).

En cuanto a los hidrolatos, para los tres se confirmó, a los 15 días de seguimiento, el alto nivel de plántulas no viables, en las dos concentraciones más bajas, modificándose en todos ellos la viabilidad observada inicialmente en la concentración más baja, menos elevada para el hidrolato de *T. vulgaris* (Figura 5.12e,f,g).





**Figura 5.12** Distribución de los tipos de plántulas (%) de *Spergula arvensis* a los 5 y 15 días para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas), en el control (0) y con concentraciones crecientes de los aceites esenciales (0.25, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) e hidrolatos (12.5, 25, 50 y 100%). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (c), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (d), HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* (e), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (f), HTz: hidrolato de *Thymus zygis* (g).

### 5.4.2.3 Viabilidad de las semillas

En relación a la viabilidad de las semillas de *E. hirsutum* (Figura 5.13), al final de la Fase I-Inhibición, la concentración más baja de aceite de *O. vulgare* ( $0.25 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) afectó significativamente a la viabilidad de las semillas no germinadas, observándose una proporción elevada de no viables (85%), respecto a las semillas sin tratamiento (1%); con las otras tres concentraciones el estado de las semillas al final de esta fase es aparentemente viable (Figura 5.13a). Con el aceite de *R. officinalis*, se observaron valores similares al control para las dos concentraciones mayores (Figura 5.13b). En cuanto al aceite de *T. vulgaris*, en las tres concentraciones más bajas la proporción de semillas no viables fue similar al control, si bien en la concentración más elevada se observó nuevamente una alta proporción de semillas inicialmente con apariencia viable que no se mantuvo al final de la siguiente fase (Figura 5.13c). Con el aceite de *T. zygis*, la concentración más baja afectó significativamente a la viabilidad de las semillas no germinadas, aunque se observó una proporción baja de semillas no viables (16%), tal como se analizó para el aceite de orégano, con las otras tres concentraciones, se observó una proporción muy elevada de semillas aparentemente viables al finalizar la fase de inhibición, que no se mantuvieron como tales a la conclusión de la fase de recuperación (Figura 5.13d).

En cuanto a los hidrolatos, el de *O. vulgare* no afectó significativamente a la viabilidad de las semillas no germinadas (Figura 5.13e). El de *T. vulgaris* afectó en una proporción elevada a la viabilidad de las semillas (93%) en su tercera concentración (Figura 5.13f); en ambos hidrolatos, en las dos concentraciones más elevadas, se observa nuevamente un cambio de viabilidad de una alta proporción de semillas, viables al final de la primera fase, que no lo fueron cuando concluyó la segunda. Finalmente, el hidrolato de *T. zygis* afectó significativamente a la viabilidad en la segunda y tercera concentración (95 y 38% respectivamente de proporción de semillas no viables), que difirieron entre sí; en este caso en la concentración más elevada se repite el comportamiento anterior, es decir que las semillas pierden su viabilidad en una alta proporción al término de la segunda fase (Figura 5.13g).

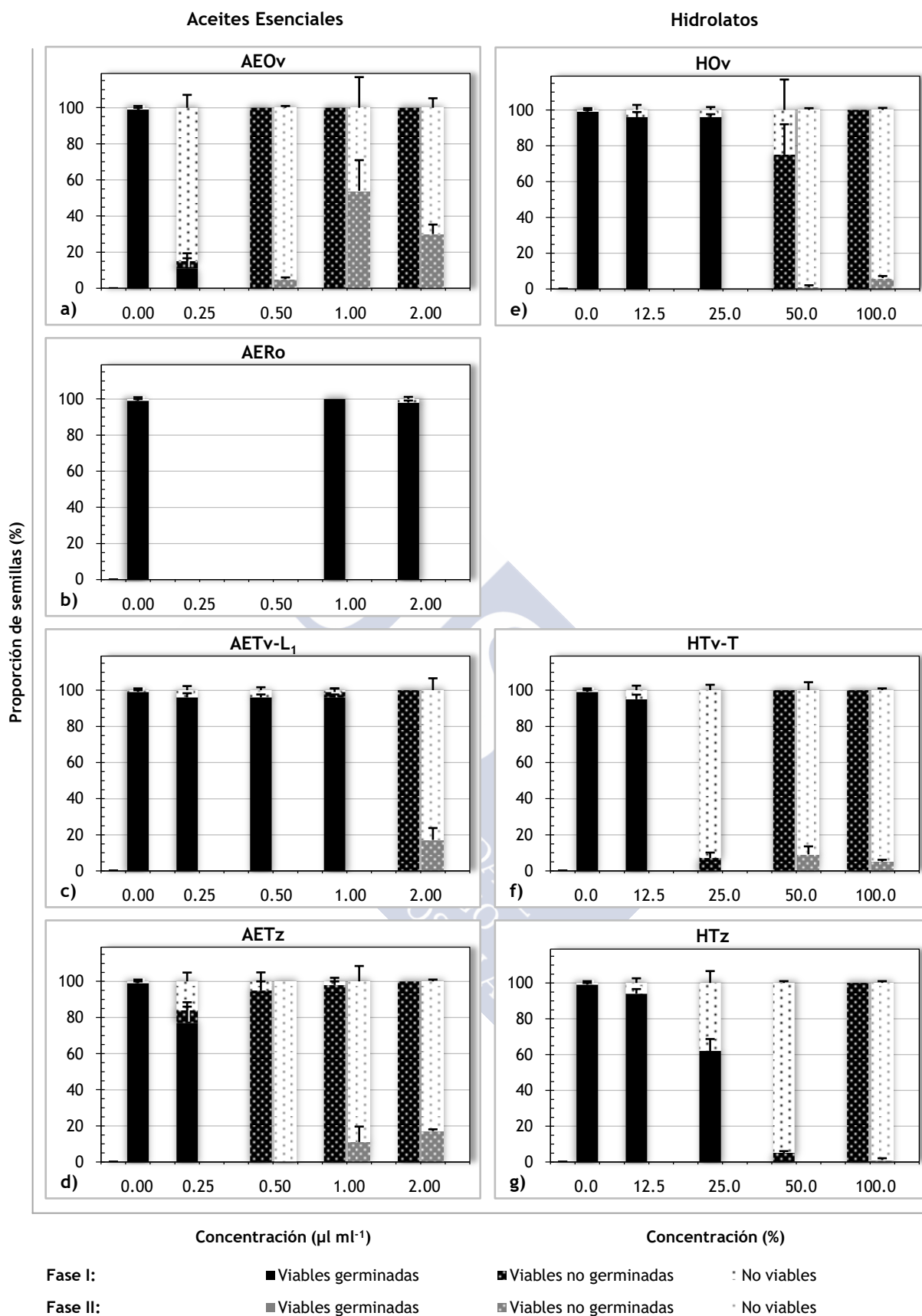
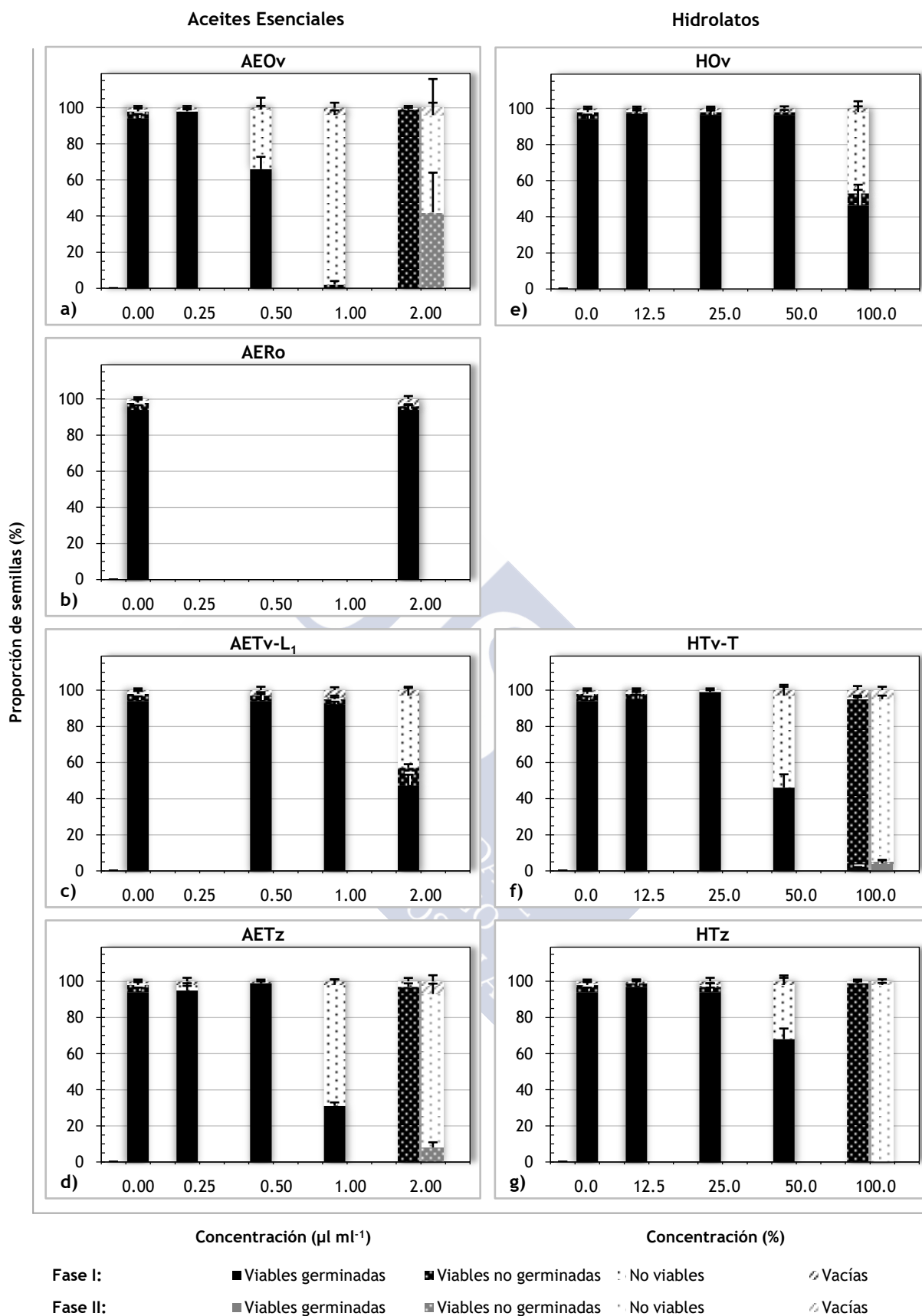


Figura 5.13 Estado final de las semillas (%), viables y no viables, de *Epilobium hirsutum* transcurrida la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, cuatro semanas más), en el control (0) y con concentraciones crecientes de los aceites esenciales (0.25, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) e hidrolatos (12.5, 25, 50 y 100%). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (c), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (d), HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* (e), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (f), HTz: hidrolato de *Thymus zygis* (g).

En relación a la viabilidad de las semillas de *R. obtusifolius* (Figura 5.14), al final de la Fase I-Inhibición, el aceite de *O. vulgare* afectó de manera significativa a partir de la segunda concentración a la proporción de semillas no viables (94%), respecto al control (1%), reduciéndose ese efecto a medida que bajó la concentración del aceite, hasta valores similares al control en la concentración más baja; en la concentración más elevada se observa como una alta proporción de semillas permanecen viables al final de la primera fase (Figura 5.14a). Con el aceite de *R. officinalis*, se observaron valores similares al control para la concentración más elevada (Figura 5.14b). En cuanto al aceite de *T. vulgaris*, afectó únicamente en la concentración más elevada de modo significativo a la viabilidad de las semillas aumentando la proporción de no viables (40%) (Figura 5.14c). Con el aceite de *T. zygis* la segunda concentración elevó la proporción de semillas no viables (67%), y en la mayor, la elevada proporción de semillas viables observadas en la primera fase perdió su viabilidad cuando fueron examinadas en la siguiente (Figura 5.14d).

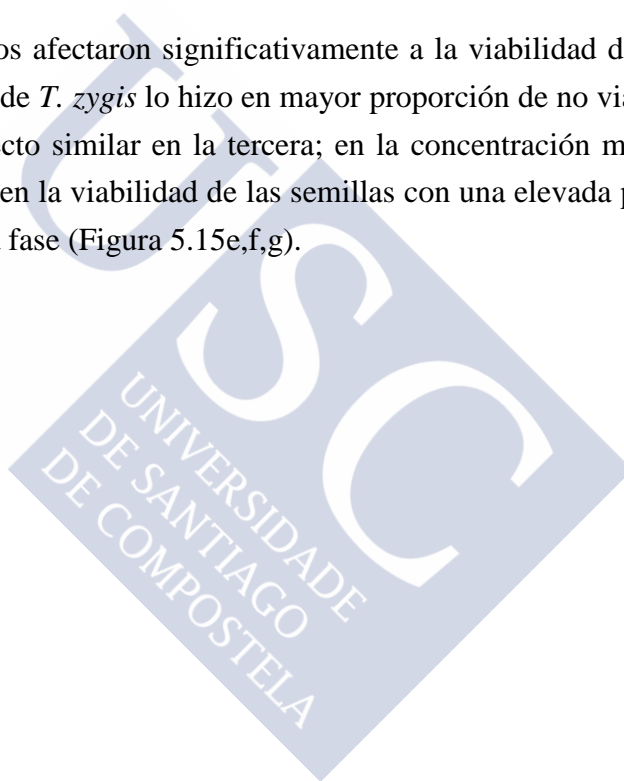
En cuanto a los hidrolatos, con las dos concentraciones más bajas se observó una proporción de semillas no viables similares al control, como en la segunda del hidrolato de *O. vulgare*; en este último sólo la concentración mayor afectó a la viabilidad de las semillas, con una proporción media de no viables (45%) (Figura 5.14e), similar a la observada en la segunda concentración de los hidrolatos de *T. vulgaris* (Figura 5.14f) y *T. zygis* (Figura 5.14g); la concentración más elevada de estos últimos no afectó a la viabilidad en una primera fase pero sí lo hizo en una proporción muy elevada en la segunda.

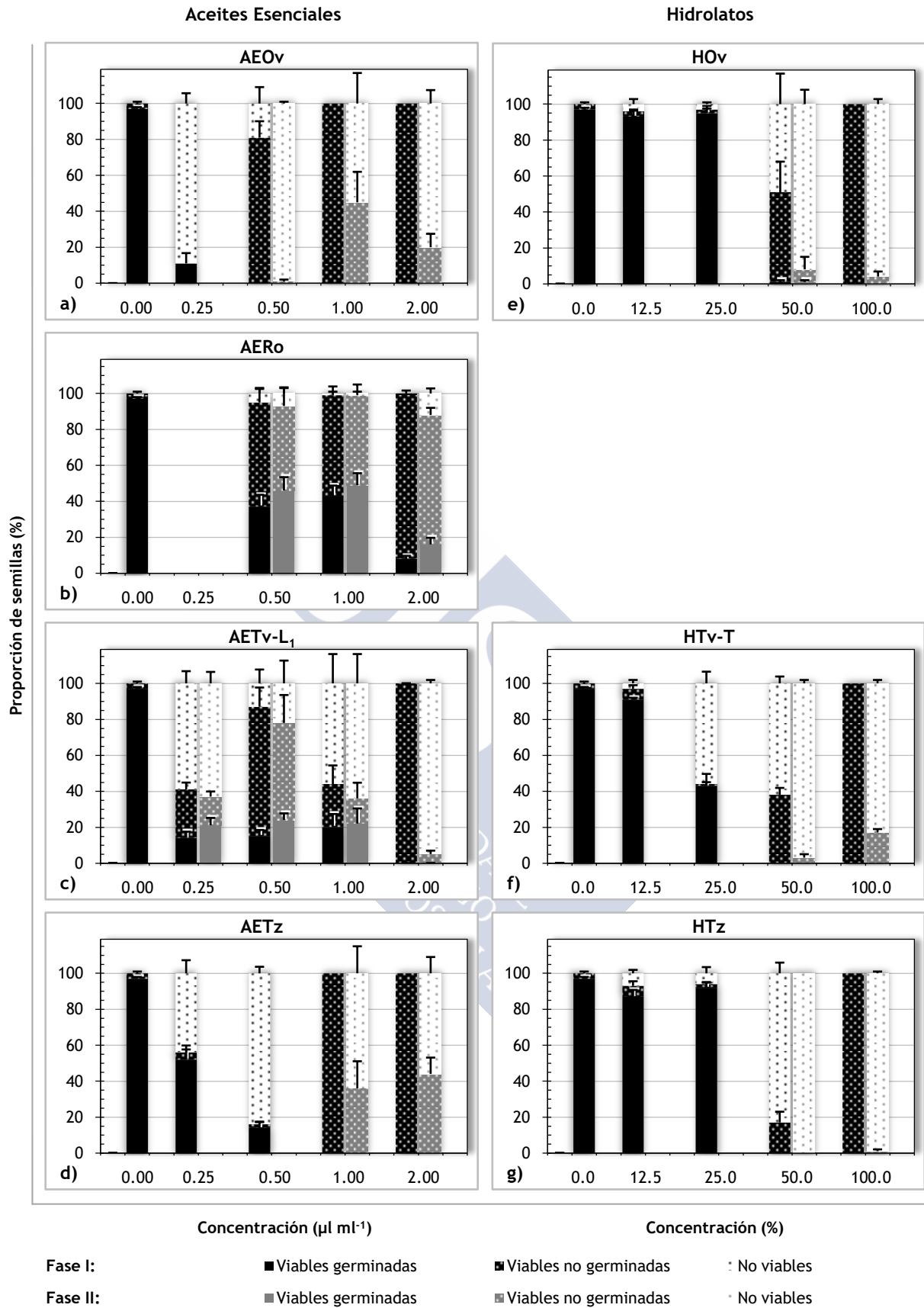


**Figura 5.14** Estado final de las semillas (%), viables, no viables y vacías, de *Rumex obtusifolius* transcurrida la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, cuatro semanas más), en el control (0) y con concentraciones crecientes de los aceites esenciales (0.25, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) e hidrolatos (12.5, 25, 50 y 100%). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (c), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (d), HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* (e), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (f), HTz: hidrolato de *Thymus zygis* (g).

En relación a la viabilidad de las semillas de *S. arvensis* (Figura 5.15), al final de la Fase I-Inhibición, las dos concentraciones más bajas de aceite de *O. vulgare* afectaron de manera significativa a la viabilidad de las semillas con una proporción elevada de no viables (89%) en la menor (Figura 5.15a). Con el aceite de *R. officinalis*, se observaron valores similares al control para las tres concentraciones (Figura 5.15b). En cuanto al aceite de *T. vulgaris*, afectó de modo significativo a la viabilidad de las semillas aumentando en la segunda y cuarta concentración; en la más elevada se observó una alta proporción de no viables al final de la segunda fase que no lo fueron concluida la anterior (Figura 5.15c). Con el aceite de *T. zygis*, las dos concentraciones más bajas afectaron a la viabilidad, en menor proporción a medida que bajó la concentración (Figura 5.15d).

En cuanto a los hidrolatos, todos afectaron significativamente a la viabilidad de las semillas en la segunda concentración, el de *T. zygis* lo hizo en mayor proporción de no viables (83%) y el de *T. vulgaris* mostró un efecto similar en la tercera; en la concentración más elevada se observó para ambos un cambio en la viabilidad de las semillas con una elevada proporción de no viables al final de la segunda fase (Figura 5.15e,f,g).





**Figura 5.15** Estado final de las semillas (%), viables y no viables, de *Spergula arvensis* transcurrida la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, cuatro semanas más), en el control (0) y con concentraciones crecientes de los aceites esenciales (0.25, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) e hidrolatos (12.5, 25, 50 y 100%). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (b), AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub> (c), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (d), HOv: hidrolato de *Origanum vulgare* (e), HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol (f), HTz: hidrolato de *Thymus zygis* (g).

### 5.4.3 Bioensayos de fitotoxicidad en invernadero

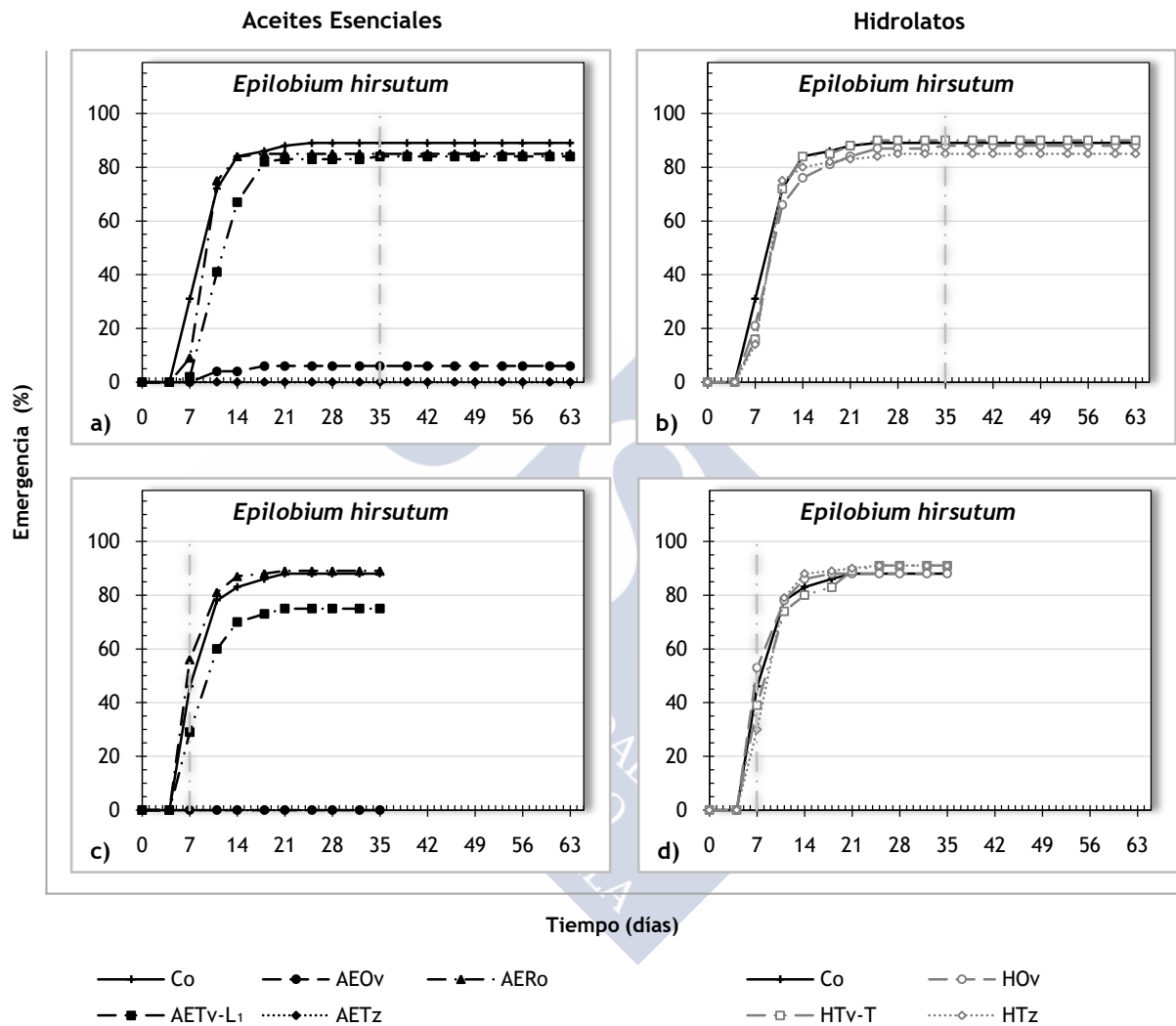
En relación con la dinámica de la emergencia de plántulas de *E. hirsutum* (Figura 5.16) alcanzó en el control un nivel muy elevado, que se produjo rápidamente (11 días) (Tabla 5.7). Tanto cuando se efectuó un lavado a medio plazo (35 días) como más prematuro (7 días), con los aceites de *O. vulgare* y *T. zygis* se produjo una reducción significativa de la emergencia de plántulas, presentando valores muy bajos o nulos, sin que el efecto de ambos aceites difiriera entre sí (Figura 5.16a,c). Con el resto de aceites e hidrolatos el nivel de emergencia fue elevado.

La dinámica de la emergencia de plántulas de *R. obtusifolius* (Figura 5.17) alcanzó en el control valores elevados, pero esta emergencia se produjo más lentamente (22 días) (Tabla 5.7). Los aceites de *O. vulgare* y *T. zygis* redujeron significativamente la emergencia de plántulas con un lavado temprano, presentando valores bajos y similares entre sí (Figura 5.17c), mientras que con el resto de aceites e hidrolatos se mantuvo en valores elevados. Dichos valores bajos y similares se mantuvieron con el aceite de *T. zygis* con un lavado más tardío (fase de recuperación), mientras que en el caso de aceite de *O. vulgare* se recuperó la emergencia hasta un nivel medio; en este caso la emergencia alcanzó también valores medios con el resto de los aceites y con los hidrolatos de *O. vulgare* y *T. vulgaris*, resultando significativas las diferencias únicamente en el aceite de *T. vulgaris*. Los tiempos medios de emergencia tras la exposición a todos los aceites e hidrolatos aumentaron ligeramente en algunos de ellos (aceite de *T. vulgaris*: 25 días, hidrolato de *O. vulgare*: 24 días e hidrolato de *T. vulgaris*: 25 días), sin que las diferencias resultaran significativas.

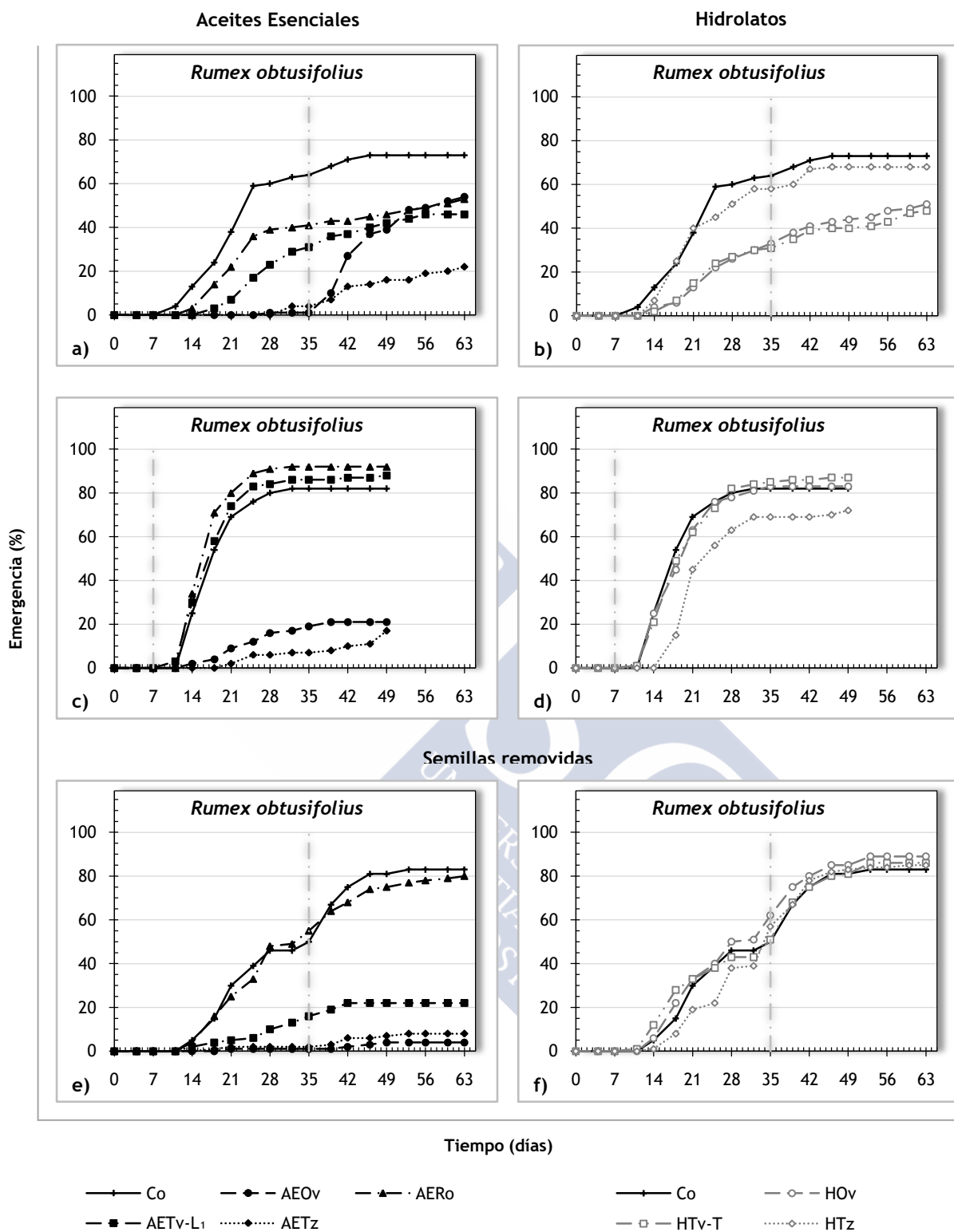
En esta especie, cuando las semillas permanecieron inicialmente enterradas y el lavado se produjo a los 35 días, los aceites de *O. vulgare*, *T. vulgaris* y *T. zygis* afectaron a la emergencia de plántula, reduciéndola significativamente hasta valores bajos (*T. vulgaris*) o muy bajos (*O. vulgare*, que difirió del anterior, y *T. zygis*) (Figura 5.17e). Con el resto de aceites e hidrolatos el nivel de emergencia fue elevado y, como en el control, se incrementó considerablemente tras la exposición de las semillas en superficie.

La dinámica de la emergencia de *S. arvensis* (Figura 5.18) alcanzó en el control niveles muy elevados que se produjeron rápidamente (9 días) (Tabla 5.7). Todos los aceites redujeron significativamente la emergencia, hasta valores muy bajos (*R. officinalis*) o inhibiéndola totalmente (*O. vulgare*, *T. vulgaris* y *T. zygis*) cuando el lavado se efectuó a los 35 días, sin diferir entre sí (Figura 5.18a); manteniendo su eficacia cuando el lavado se efectuó a los 7

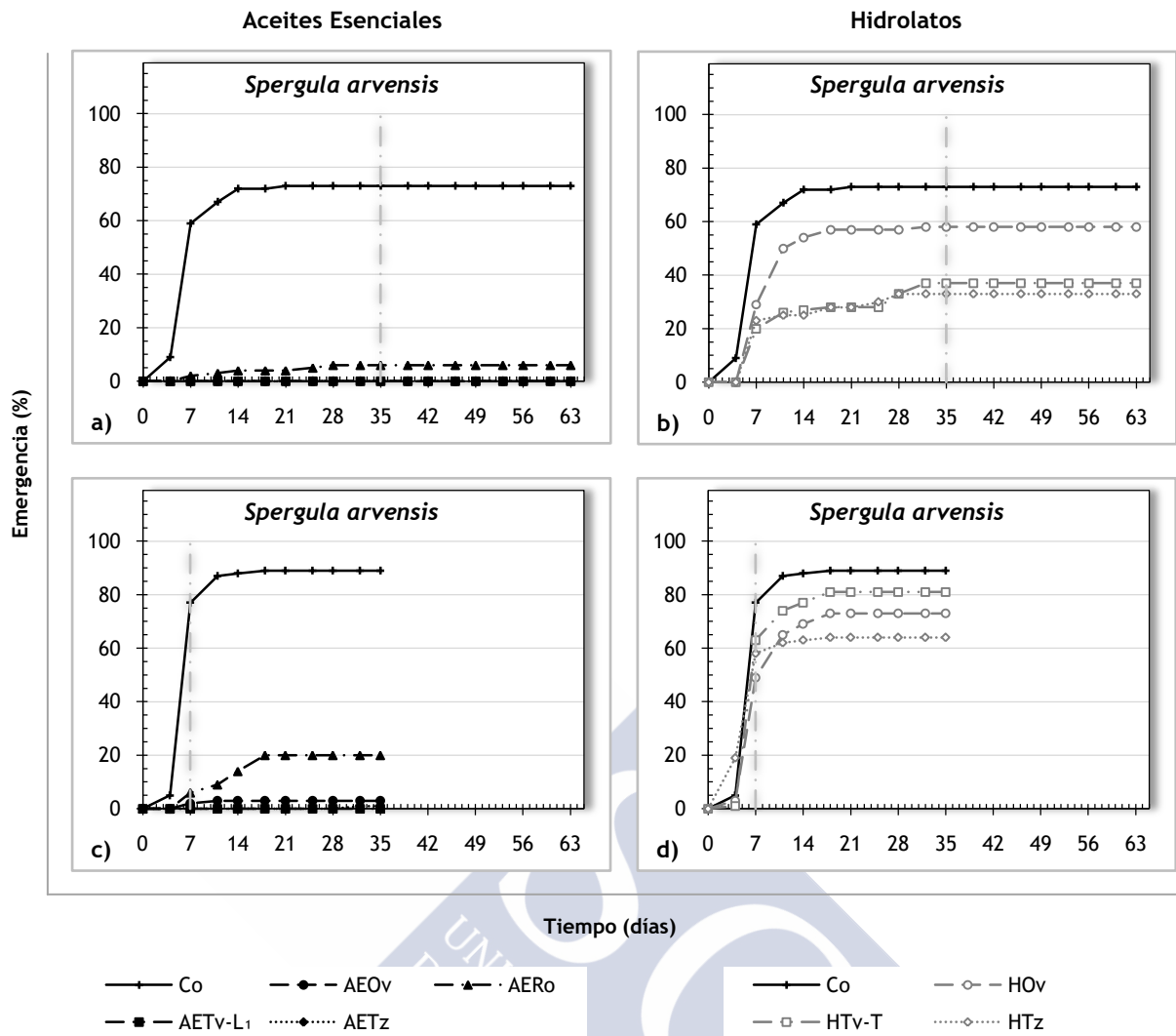
días (Figura 5.18c). Los hidrolatos de *T. vulgaris* y *T. zygis* redujeron significativamente la emergencia hasta valores medios-bajos y se mantuvo elevada con el lavado temprano. Los tiempos medios de emergencia tras la exposición a todos los aceites e hidrolatos se incrementaron en algunos casos (hidrolato de *T. vulgaris*: 17 días e hidrolato de *T. zygis*: 16 días), sin que las diferencias resultaran significativas.



**Figura 5.16** Emergencia media acumulada (%) de plántulas de *Epilobium hirsutum* en invernadero, para un lavado a medio plazo (35 días) (a y b) o prematuro (7 días) (c y d) y las cuatro semanas posteriores, en el control (Co) y con el tratamiento de los aceites esenciales e hidrolatos. AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare*, AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, AETv-L1: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub>, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis*, HOv: hidrolato de *Origanum vulgare*, HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis*.



**Figura 5.17** Emergencia media acumulada (%) de plántulas de *Rumex obtusifolius* en invernadero, procedentes de siembra en superficie, para un lavado a medio plazo (35 días) (a y b) o prematuro (7 días) (c y d) y las cuatro semanas posteriores, o de semillas enterradas inicialmente, para un lavado a medio plazo (cinco semanas) (e y f) y las cuatro semanas posteriores; en el control (Co) y con el tratamiento de los aceites esenciales e hidrolatos. AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare*, AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub>, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis*, HOv: hidrolato de *Origanum vulgare*, HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis*.



**Figura 5.18** Emergencia media acumulada (%) de plántulas de *Spergula arvensis* en invernadero, para un lavado a medio plazo (35 días) (a y b) o prematuro (7 días) (c y d) y las cuatro semanas posteriores, en el control (Co) y con el tratamiento de los aceites esenciales e hidrolatos. AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare*, AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub>, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis*, HOv: hidrolato de *Origanum vulgare*, HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis*.

**Tabla 5.7** Tiempo medio (días) de emergencia de las plántulas de *Epilobium hirsutum*, *Rumex obtusifolius* y *Spergula arvensis* (cinco semanas previas al lavado), procedentes de semillas sembradas en invernadero en condiciones favorables para su germinación, en el control (Co) y con el tratamiento de los aceites esenciales e hidrolatos. AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare*, AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub>, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis*, HOv: hidrolato de *Origanum vulgare*, HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis*.

	ACEITES ESENCIALES/HIDROLATOS		
	<i>Epilobium hirsutum</i>	<i>Rumex obtusifolius</i>	<i>Spergula arvensis</i>
Co	10.54 ± 0.49 a	21.65 ± 0.87 a	8.69 ± 1.40 a
<b>AEOv</b>			
AERo	10.96 ± 0.39 a	22.66 ± 1.46 a	12.33 ± 3.42 a
AETv-L <sub>1</sub>	13.70 ± 1.06 a	25.48 ± 0.81 a	
<b>AETz</b>			
HOv	11.91 ± 1.18 a	24.23 ± 0.85 a	11.23 ± 1.68 a
HTv-T	11.45 ± 0.47 a	24.75 ± 1.76 a	17.14 ± 3.97 a
HTz	11.18 ± 0.32 a	21.86 ± 0.70 a	15.55 ± 3.58 a

Valores medios ± error estándar y test *post hoc* DMS ( $p < 0.05$ ), o test correspondiente, letras iguales para una misma especie indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos (aceites esenciales/hidrolatos). Los valores medios se corresponden con los datos sin transformar, los resultados de la prueba ANOVA, o la correspondiente en su caso, y comparaciones *post hoc* se han interpretado a partir de datos previamente transformados.

## 5.5 DISCUSIÓN

Las condiciones controladas establecidas también han resultado muy adecuadas para la germinación de las semillas de *Epilobium hirsutum*, *Rumex obtusifolius* y *Spergula arvensis*, puesto que se ha alcanzado un nivel muy elevado con un rápido ritmo de germinación, con un tiempo medio menor de una semana en *Epilobium* y *Spergula*, entre una y dos semanas en *Rumex*, características muy apropiadas para la realización de bioensayos con aceites esenciales, cuya actividad es limitada debido a su volatilidad (Dayan *et al.*, 2009), como los que presentamos.

Además, en cuanto a la fenología de la germinación, las semillas mantienen a corto plazo (primeros 9 meses de almacenamiento en condiciones naturales) su potencialidad germinativa elevada o muy elevada (nivel y ritmo de germinación), en condiciones de fotoperiodo tanto con las temperaturas más favorables (22-16°C) como las que no lo son tanto (15-10°C), habituales en otoño; difiriendo en ambos casos en oscuridad, en la que ni las de *Epilobium* ni las de *Rumex* germinan. Son plantas cuyas semillas carecen de dormición, aunque dos de ellas requieren luz para germinar, como ocurre en numerosas especies arvenses (Baskin y Baskin, 1998). Esta fenología de la germinación, en el caso de *Spergula arvensis*, contribuye a la formación de un banco de semillas en el suelo transitorio, característico de aquellas especies cuyas semillas germinan en otoño; mientras que en el caso de *Epilobium hirsutum* y *Rumex obtusifolius* dicho banco será permanente (Thompson y Grime, 1979), almacenándose en él las semillas enterradas, en oscuridad, hasta que sean removidas y expuestas a la luz, en cuyo caso se producirá una germinación muy elevada y rápida (datos no presentados).

La evaluación de la dinámica de la germinación de las semillas de *E. hirsutum*, *R. obtusifolius* y *S. arvensis*, en los bioensayos de fitotoxicidad con aceites esenciales, quimiotipados (*R. officinalis*, *T. vulgaris*, *T. zygis*) o no (*O. vulgare*), e hidrolatos, quimiotipados (*T. vulgaris*, *T. zygis*) o no (*O. vulgare*) (Figura 5.6, Figura 5.7 y Figura 5.8), muestra que todos ellos son eficaces en condiciones de laboratorio, inhibiéndola totalmente a la máxima concentración (2  $\mu\text{l ml}^{-1}/100\%$ ) y reduciendo su ritmo cuando ésta tiene lugar.

El nivel de reducción de la germinación de cada una de las especies estudiadas se incrementa con la concentración de los aceites e hidrolatos, que a su vez difieren entre sí en este aspecto. Así, entre los aceites, los de *O. vulgare* y *T. zygis* son los más eficaces inhibiendo totalmente la germinación de *E. hirsutum* a 0.50  $\mu\text{l ml}^{-1}$  o superior, mientras que a dicha concentración los aceites de *T. vulgaris* y *R. officinalis* prácticamente no la afectan. Algo similar ocurre en el

caso de *S. arvensis*, en el que además los aceites de *T. vulgaris* y *R. officinalis* sí presentan efecto reductor; mientras que en *R. obtusifolius* la inhibición no es total a la mencionada concentración. Del mismo modo, en el grupo de los hidrolatos, resultan muy eficaces a concentraciones del 50% o superiores en *Epilobium* y *Spergula* y menos en el caso de *Rumex*.

Esta diferencia en el caso de *R. obtusifolius*, que se manifiesta en que comparativamente los aceites e hidrolatos resultan menos eficaces en cada concentración, puede atribuirse al mayor tamaño de sus frutos (peso de 100 frutos:  $185.8 \pm 0.4$  mg) que el que presentan las semillas de *Spergula* (peso de 100 semillas:  $23.6 \pm 1.6$  mg) y *Epilobium* (peso de 100 semillas:  $8.8 \pm 0.1$  mg). Esta característica del efecto diferencial sobre la germinación entre especies, incluso en cada compuesto ensayado, ha sido puesta de manifiesto por Argyropoulos *et al.* (2008) estudiando el efecto de siete aceites esenciales, entre ellos *O. vulgare*, sobre la germinación de algodón (*Gossypium hirsutum*), menos sensible que cinco arvenses, Grosso *et al.* (2010) con aceite de *T. vulgaris*, menos fitotóxico en plantas cultivadas (*Zea mays*, *Triticum durum*, *Pisum sativum* y *Lactuca sativa*), así como por Gitsopoulos *et al.* (2013) con el mismo aceite, resultando menos eficaz en plantas cultivadas como el trigo (*Triticum aestivum*) y la cebada (*Hordeum vulgare*) que en arvenses como el raigrás (*Lolium rigidum*) y alpiste (*Phalaris brachystachys*). Synowiec *et al.* (2017) también han encontrado una menor sensibilidad a los fitotóxicos en las plantas cultivadas (*Zea mays*, *Avena fatua*) que en las arvenses de semillas más pequeñas (*Amaranthus retroflexus* y *Centaurea cyanus*). Estos resultados evidencian, como han señalado los autores anteriormente mencionados, que los aceites e hidrolatos estudiados con potencialidad fitotóxica diferencial sobre la germinación según el tamaño de las semillas, podrían ser utilizados en cultivos de plantas con semillas grandes.

El efecto fitotóxico de los aceites e hidrolatos estudiados se evidencia, como en *Parietaria judaica*, no solamente por la mayor o menor inhibición de la germinación de las semillas, sino también porque el tiempo medio de germinación se incrementa (germinación más lenta) a medida que lo hace la concentración, tal como han detectado Angelini *et al.* (2003), destacando el aceite de *T. vulgaris* ( $t_m$  de 4-10 días en *Epilobium*, 7-12 días en *Rumex*, 2-18 días en *Spergula*); mientras que entre las especies es en *Rumex* en la que este efecto resulta más evidente.

La eficacia inhibitoria de la germinación de los aceites e hidrolatos estudiados guarda relación con su composición, destacando los que presentan elevada proporción de carvacrol y timol, incluso entre los hidrolatos (*O. vulgare*, *T. vulgaris*, *T. zygis*); como se ha puesto en evidencia en estudios previos, la mayoría de ellos muy recientes (Vokou *et al.*, 1993; Angelini *et al.*,

2003; Kordali *et al.*, 2008; Taban *et al.*, 2013; Vasilakoglou *et al.*, 2013; Kashkooli y Saharkhiz, 2014; Onaran *et al.*, 2014; Fouad *et al.*, 2015; Pinheiro *et al.*, 2015), confirmando así la potencialidad bioherbívora/herbívora natural de aquéllos compuestos mayoritariamente por monoterpenos oxigenados (Synowiec *et al.*, 2017). De modo complementario, entre las contribuciones recientes mencionadas, destacamos la nuestra, relativa a la potencialidad del aceite de *T. zygis*, de la que no hemos encontrado referencia.

Las curvas dosis-respuesta de análisis no lineal, obtenidas para los aceites e hidrolatos, y los valores de IC<sub>50</sub> contribuyen a la evaluación de su eficacia (Moreno *et al.*, 2001; Fagodia *et al.*, 2017; Synowiec *et al.*, 2017) (Figura 5.9); en nuestro caso la tendencia del efecto fitotóxico es común para las tres especies, en el caso de los aceites: *O. vulgare* > *T. zygis* > *T. vulgaris* (para *R. obtusifolius*) e hidrolatos: *T. vulgaris* > *T. zygis* > *O. vulgare*.

Es de destacar que los aceites e hidrolatos más eficaces en relación con la germinación de las semillas, como los de *O. vulgare* y *T. zygis*, también lo son en cuanto a su posibilidad de recuperación tras lavado, de modo que ésta no se ha producido ni en *Epilobium* ni en *Rumex*, especies en las que las semillas no germinadas (en proporción  $\geq 10\%$  establecida) han perdido la viabilidad; mientras que en *Spergula*, con los aceites de *R. officinalis* y *T. vulgaris*, de menor potencialidad, la recuperación es muy baja, lo que se ha mostrado de modo preliminar por Torres *et al.* (2017a). Analizando conjuntamente la Fase I-Inhibición y la Fase II-Recuperación, las tres especies estudiadas muestran diferente sensibilidad ante los aceites e hidrolatos: *Spergula*>*Epilobium*>*Rumex*.

En cuanto al desarrollo de las plántulas (Figura 5.10, Figura 5.11 y Figura 5.12), las de morfología no normal predominan en los aceites e hidrolatos más eficaces, confirmando dicha cualidad y contribuyendo a establecer su prelación; destacando el aceite de *O. vulgare* (70% carvacrol) que ya desde la concentración más baja no presenta plántulas de tipo normal ni en *Epilobium* ni en *Spergula*, y con una proporción baja en *Rumex*. Aplicando este criterio, le sigue el aceite de *T. zygis* (49% timol) también con elevada potencialidad, y con menor relevancia los hidrolatos de *T. vulgaris*, *T. zygis* y *O. vulgare*, y los aceites de *T. vulgaris* y *R. officinalis*, todos ellos con elevada proporción de plántulas viables en dicha concentración, o incluso en las siguientes, lo que se ha mostrado de modo preliminar por Torres *et al.* (2017b).

La evaluación de la morfología/desarrollo de las plántulas aplicando la tipología propuesta en este estudio contribuye a modular y ordenar la potencialidad como herbívoras naturales de los aceites e hidrolatos estudiados, tomando como referencia inicial la proporción de plántulas no

normales frente a las que lo son en la concentración más baja estudiada. En todos los casos dicha proporción se incrementa con la concentración, predominando las plántulas menos desarrolladas, especialmente el tipo III, en la concentración mayor.

Entre los aceites e hidrolatos, los más eficaces, con mayor potencialidad como herbicidas naturales, presentan mayor proporción de plántulas no normales de tipo III a partir de una concentración menor, como es el caso del aceite de *O. vulgare* con *Spergula*, la especie que muestra mayor sensibilidad, en el que todas lo son a una concentración de  $0.25 \mu\text{l ml}^{-1}$  (la concentración más baja estudiada), como ocurre también con el aceite de *T. zygis* y el hidrolato de *T. vulgaris* a  $0.50 \mu\text{l ml}^{-1}$  y 25%, respectivamente, mientras que en los menos eficaces dicho tipo puede ser muy escaso o incluso ausente, como en el aceite de *R. officinalis*.

Las especies también difieren entre sí en la proporción de cada tipo de plántulas no normales, en las diferentes concentraciones de aceites e hidrolatos, siendo *Spergula* la más sensible, seguida de *Epilobium* y finalmente *Rumex*. Entre ellas, diferentes especies de *Rumex* han sido incluidas en estudios de fitotoxicidad, entre ellos los de Setia *et al.* (2006) con *Rumex nepalensis*, cuya germinación y crecimiento resulta afectado por el aceite de eucalipto al 0,06% (la máxima estudiada) y Kordali *et al.* (2008) con *Rumex crispus*, con inhibición de la germinación y del crecimiento en aceite de *Origanum acutidens* a una concentración muy superior a la nuestra (10 mg/placa); mientras que no hemos encontrado referencias de estudios sobre *Epilobium* ni *Spergula*.

El seguimiento realizado del efecto fitotóxico en cada concentración de cada uno de los aceites e hidrolatos, incluyendo la Fase I (inhibición) y la Fase II (recuperación), de las tres especies estudiadas, ha permitido establecer finalmente, en relación con la viabilidad, el estado de sus semillas (Figura 5.13, Figura 5.14 y Figura 5.15). En el caso de los aceites con potencialidad inhibitoria de la germinación, en las concentraciones en las que ésta no se produce, generalmente las más altas, las semillas al finalizar la Fase I se presentan en su mayoría aparentemente viables, lo que se observa en las tres especies estudiadas; mientras que al finalizar la Fase II de recuperación se evidencia que en su mayoría realmente no lo son, lo que confirma el carácter permanente del efecto de dichos productos sobre la germinación.

En cuanto a la emergencia de plántulas en condiciones semicontroladas (invernadero) (Figura 5.16, Figura 5.17 y Figura 5.18) los aceites de *O. vulgare* y *T. zygis* también la reducen hasta niveles muy bajos o nulos, especialmente las de *E. hirsutum* y *S. arvensis*, manteniendo dicho

efecto si se produce un lavado temprano o más tardío; mientras que con los aceites restantes e hidrolatos dicho efecto es mucho menor o incluso inapreciable. Esta tendencia también se observa en el caso de *R. obtusifolius*, aunque con menor efecto especialmente con el lavado tardío, en el que se producen niveles elevados de recuperación en *O. vulgare* y *T. zygis*. Entre las especies, *S. arvensis*, en la que incluso se aprecia el efecto del *R. officinalis*, es la más sensible y *R. obtusifolius*, que muestra cierta capacidad de recuperación con los aceites más eficaces, la más resistente al efecto fitotóxico de los productos estudiados.

Estos resultados confirman, a diferencia de los de otros autores (Verdeguer, 2011), los obtenidos en los ensayos *in vitro*, tanto en los efectos de los diferentes aceites e hidrolatos sobre la emergencia, como en la diferente sensibilidad entre las especies estudiadas, lo que, como se ha señalado anteriormente (Argyropoulos *et al.*, 2008; Grosso *et al.*, 2010; Synowiec *et al.*, 2017), podría estar relacionado con su tamaño.

El efecto conjunto sobre la germinación de las semillas de *Epilobium hirsutum*, *Rumex obtusifolius* y *Spergula arvensis* y la viabilidad de plántulas (inhibición y recuperación) para el grupo de aceites e hidrolatos se resume en la Tabla 5.8, Tabla 5.9 y Tabla 5.10, respectivamente para cada especie.



**Tabla 5.8** Síntesis cualitativa del efecto fitotóxico inhibitor de los aceites esenciales e hidrolatos ensayados en concentraciones decrecientes (2, 1, 0.5 y 0.25  $\mu\text{l ml}^{-1}$  y 100, 50, 25 y 12.5%, respectivamente) sobre la germinación (G) de semillas de *Epilobium hirsutum*, evaluada al final de la Fase I-Inhibición (FI-cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (FII-cuatro semanas) de modo independiente, y la proporción de plántulas viables (P) en ambas fases. Co: control, AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare*, AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub>, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis*, HOv: hidrolato de *Origanum vulgare*, HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis*.

ACEITES ESENCIALES																		
		Co		AEOv			AERo				AETv-L <sub>1</sub>			AETz				
C	( $\mu\text{l ml}^{-1}$ )	0.00	2.00	1.00	0.50	0.25	2.00	1.00	0.50	0.25	2.00	1.00	0.50	0.25	2.00	1.00	0.50	0.25
		FI	G	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●
	P	●				●	●	●			●	●	●	●				●
FII	G		●	●	●					●					●	●	●	
	P																	
HIDROLATOS																		
		Co		HOv					HTv-T				HTz					
C	(%)	0.0	100.0	50.0	25.0	12.5					100.0	50.0	25.0	12.5	100.0	50.0	25.0	12.5
		FI	G	●	●	●	●	●				●	●	●	●	●	●	●
	P	●			●	●							●	●			●	●
FII	G		●	●						●	●				●			
	P																	

Fase I-Inhibición a) Germinación (%) ● Elevada ● Media ● Baja b) Proporción de plántulas viables (%) ● Elevada ● Media ● Baja; Fase II-Recuperación a) Germinación (%) ● Elevada ● Media ● Baja b) Proporción de plántulas viables (%) ● Elevada ● Media ● Baja □ Concentración de producto eficaz (inhibición de la germinación) □ Concentración de producto eficaz (plántulas no viables)

**Tabla 5.9** Síntesis cualitativa del efecto fitotóxico inhibitor de los aceites esenciales e hidrolatos ensayados en concentraciones decrecientes (2, 1, 0.5 y 0.25  $\mu\text{l ml}^{-1}$  y 100, 50, 25 y 12.5%, respectivamente) sobre la germinación (G) de semillas de *Rumex obtusifolius*, evaluada al final de la Fase I-Inhibición (FI-cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (FII-cuatro semanas) de modo independiente, y la proporción de plántulas viables (P) en ambas fases. Co: control, AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare*, AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub>, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis*, HOv: hidrolato de *Origanum vulgare*, HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis*.

ACEITES ESENCIALES																		
		Co	AEOv				AERo				AETv-L <sub>1</sub>				AETz			
C	( $\mu\text{l ml}^{-1}$ )	0.00	2.00	1.00	0.50	0.25	2.00	1.00	0.50	0.25	2.00	1.00	0.50	0.25	2.00	1.00	0.50	0.25
F I	G	●	●	●	●	●	●				●	●	●		●	●	●	●
	P	●			●	●	●				●	●	●			●	●	●
F II	G		●												●			
	P																	
HIDROLATOS																		
		Co	HOv				HTv-T				HTz							
C	(%)	0.0	100.0	50.0	25.0	12.5					100.0	50.0	25.0	12.5	100.0	50.0	25.0	12.5
F I	G	●	●	●	●	●					●	●	●	●	●	●	●	●
	P	●	●	●	●	●						●	●	●		●	●	●
F II	G										●				●			
	P																	

Fase I-Inhibición a) Germinación (%) ● Elevada ● Media ● Baja b) Proporción de plántulas viables (%) ● Elevada ● Media ● Baja; Fase II-Recuperación a) Germinación (%) ● Elevada ● Media ● Baja b) Proporción de plántulas viables (%) ● Elevada ● Media ● Baja □ Concentración de producto eficaz (inhibición de la germinación) □ Concentración de producto eficaz (plántulas no viables)

**Tabla 5.10** Síntesis cualitativa del efecto fitotóxico inhibitor de los aceites esenciales e hidrolatos ensayados en concentraciones decrecientes (2, 1, 0.5 y 0.25  $\mu\text{l ml}^{-1}$  y 100, 50, 25 y 12.5%, respectivamente) sobre la germinación (G) de semillas de *Spergula arvensis*, evaluada al final de la Fase I-Inhibición (FI-cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (FII-cuatro semanas) de modo independiente, y la proporción de plántulas viables (P) en ambas fases. Co: control, AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare*, AERo: aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, AETv-L<sub>1</sub>: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol<sub>1</sub>, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis*, HOv: hidrolato de *Origanum vulgare*, HTv-T: hidrolato de *Thymus vulgaris* timol, HTz: hidrolato de *Thymus zygis*.

ACEITES ESENCIALES																		
		Co		AEOv			AERo			AETv-L <sub>1</sub>				AETz				
C	( $\mu\text{l ml}^{-1}$ )	0.00	2.00	1.00	0.50	0.25	2.00	1.00	0.50	0.25	2.00	1.00	0.50	0.25	2.00	1.00	0.50	0.25
F I	G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	P	●				●		●	●			●	●	●			●	●
F II	G		●	●	●		●	●	●		●	●	●	●	●	●		
	P																	
HIDROLATOS																		
		Co		HOv			HTv-T				HTz							
C	(%)	0.0	100.0	50.0	25.0	12.5					100.0	50.0	25.0	12.5	100.0	50.0	25.0	12.5
F I	G	●	●	●	●	●					●	●	●	●	●	●	●	●
	P	●			●	●							●	●			●	●
F II	G		●	●							●	●			●	●		
	P																	

Fase I-Inhibición a) Germinación (%) ● Elevada ● Media ● Baja b) Proporción de plántulas viables (%) ● Elevada ● Media ● Baja; Fase II-Recuperación a) Germinación (%) ● Elevada ● Media ● Baja b) Proporción de plántulas viables (%) ● Elevada ● Media ● Baja □ Concentración de producto eficaz (inhibición de la germinación) □ Concentración de producto eficaz (plántulas no viables)

## 5.6 CONCLUSIONES

1. El estudio de la germinación de *Epilobium hirsutum*, *Rumex obtusifolius* y *Spergula arvensis*, que también resultó muy elevada y rápida, pone de manifiesto su idoneidad para la realización de bioensayos de fitotoxicidad con aceites esenciales e hidrolatos. Su fenología germinativa muestra que en el caso de *Spergula arvensis*, forma un banco transitorio de semillas, germinadora de otoño, época del año en la que resultaría posible realizar tratamientos de control eficaces sobre dicho proceso; mientras que en el caso de *Epilobium hirsutum* y *Rumex obtusifolius* dicho banco será en parte permanente, almacenándose en él las semillas enterradas, hasta que sean expuestas a la luz.
2. Los productos estudiados (aceites e hidrolatos) que han mostrado previamente su eficacia sobre la germinación de las semillas de *Parietaria judaica*, también la presentan sobre las tres especies estudiadas. En todos ellos existe una relación entre concentración y efecto fitotóxico (nivel de reducción), que nos permite realizar nuestra propuesta inicial, en cuanto a su mayor eficacia, para los aceites: *O. vulgare*, *T. zygis*, *T. vulgaris*, *R. officinalis*; e hidrolatos: *T. vulgaris*, *T. zygis*, *O. vulgare*, común para las tres especies. Éstas también mostraron diferente sensibilidad en cada producto, siendo *Spergula arvensis* la más sensible y *Rumex obtusifolius* la más resistente.
3. Los aceites e hidrolatos más eficaces en los bioensayos *in vitro* sobre la germinación de las semillas de *Epilobium hirsutum*, *Rumex obtusifolius* y *Spergula arvensis*, también lo son en condiciones semicontroladas (invernadero) sobre su emergencia; en las que también se manifiesta la diferente sensibilidad de la especies estudiadas, que podría estar relacionada con el tamaño de sus semillas/frutos.
4. La realización de los bioensayos de fitotoxicidad *in vitro*, ha permitido caracterizar la potencialidad herbicida de cada producto tanto por su reducción de la germinación, capacidad de recuperación, tipología de plántulas y estado final de las semillas; que se ha verificado mediante el protocolo establecido de evaluación *in situ*.





## Referencias bibliográficas



- Alcorta Irastorza EJ. 2008. La Muralla de Lugo. Un ejemplo de ingeniería militar romana bajo imperial. En Colegio de Ingenieros Técnicos de Obras Públicas (Madrid) (Eds.). *IV Congreso de las Obras Públicas en la Ciudad Romana: Lugo*. 1-50. Colegio de Ingenieros Técnicos de Obras Públicas (CITOP), Madrid.
- Ali IB, Bahri R, Chaouachi M, Boussaid M, 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.
- Andrés MF, González-Coloma A, Sanz J, Burillo J, Sainz P. 2012. Nematicidal activity of essential oils: a review. *Phytochemistry Reviews*, 11(4): 371-390.
- Angelini LG, Carpanese G, Cioni PL, Morelli I, Macchia M, Flamini G. 2003. Essential oils from mediterranean Lamiaceae as weed germination inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21): 6158-6164.
- Araniti F, Sorgona A, Lupini A, Abenavoli, MR. 2012. Screening of Mediterranean wild plant species for allelopathic activity and their use as bio-herbicides. *Allelopathy Journal*, 29(1): 107-123.
- Argyropoulos EI, Eleftherohorinos IG, Vokou D. 2008. In vitro evaluation of essential oils from Mediterranean aromatic plants of the Lamiaceae for weed control in tomato and cotton crops. *Allelopathy Journal*, 22(1): 69-78.
- Arminante F, De Falco E, De Feo V, De Martino L, Mancini E, Quaranta E. 2006. Allelopathic activity of essential oils from Mediterranean Labiatae. *Acta Horticulturae*, 723: 347-352.
- Azirak S, Karaman S. 2008. Allelopathic effect of some essential oils and components on germination of weeds species. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science*, 58: 88-92.

- Bacchetta G, Bueno Sánchez A, Fenu G, Jiménez-Alfaro B, Mattana E, Piotto B, Virevaire M. 2008. *Conservación ex situ de plantas silvestres*. Principado de Asturias/La Caixa, Asturias.
- Baskin CC, Baskin JM. 1998. Seeds. *Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Academic Press, San Diego.
- Bass DA, Clements A. 1990. Biology and control of *Parietaria judaica* L., an allergenic weed in south-eastern Australia. En Heap JW (Ed.). *Proceedings of the Ninth Australian Weeds Conference*. 516-520. Crop Science Society of South Australia Incorporated, Adelaide.
- Batish DR, Singh HP, Kohli RK, Kaur S. 2008. *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, 256: 2166-2174.
- Baylis AD. 2000. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Management Science*, 56(4): 299-308.
- Benchaa S, Hazzit M, Abdelkrim H. 2018. Allelopathic Effect of *Eucalyptus citriodora* Essential Oil and Its Potential Use as Bioherbicide. *Chemistry & Biodiversity*, 15(8): 1-9.
- Bisio A, Fraternali D, Giacomini M, Giacomelli E, Pivetti S, Russo E, Caviglioli G, Romussi G *et al.* 2010. Phytotoxicity of *Salvia* spp. exudates. *Crop protection*, 29(12): 1434-1446.
- Blázquez MA, Carbó E. 2015. Control of *Portulaca oleracea* by boldo and lemon essential oils in different soils. *Industrial Crops and Products*, 76: 515-521.
- Boojh R, Ramakrishnan PS. 1982. Growth strategy of trees related to successional status. I. Architecture and extension growth. *Forest Ecology and Management*, 4: 359-374.
- Bradbeer JW. 1988. *Seed Dormancy and Germination*. Blackie, Glasgow.

- Breitmaier E. 2006. *Terpenes. Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Buján M, Díaz-Vizcaíno EA, Cascudo A, Iglesia A, Rigueiro A. 1998. Composition floristique et abondance des mauvaises herbes des anciens remparts de Lugo, Galice, Espagne. EWRS (Ed.). *Proceedings of the 6ème Symposium Méditerranéen EWRS*. 221-222. EWRS, Doorwerth.
- Caneva G, Gori EG, Danin A. 1992. Contributo della pioggia battente alla colonizzazione biologica di superfici murarie di Roma. *Bollettino Geofisica*, 15(3): 119-131.
- Cavaliere A, Caporali F. 2010. Effects of essential oils of cinnamon, lavender and peppermint on germination of Mediterranean weeds. *Allelopathy Journal*, 25(2): 441-451.
- Chen F, Peng SL, Chen BM, Ni GY, Liao HX. 2013. Allelopathic potential and volatile compounds of *Rosmarinus officinalis* L. against weeds. *Allelopathy Journal*, 32(1): 57-66.
- Dayan FE, Cantrell CL, Duke SO. 2009. Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(12): 4022-4034.
- Dayan FE, Romagni J, Tellez M, Romano A, Duke S. 1999. Managing weeds with natural products-harnessing the power of natural products in weed management. *Pesticide Outlook*, 10: 185-188.
- De Almeida LFR, Frei F, Mancini E, De Martino L, De Feo V. 2010. Phytotoxic Activities of Mediterranean Essential Oils. *Molecules*, 15(6): 4309-4323.
- De Mastro G, Fracchiolla M, Verdini L, Montemurro P. 2006. Oregano and its potential use as bioherbicide. Proceedings of the 1st International Symposium on the Labiatae: advances in production, biotechnology and utilisation. *Acta Horticulturae*, 723: 336-345.

- Dudai N, Poljakoff-Mayber A, Mayer AM, Putievsky E, Lerner HR. 1999. Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. *Journal of Chemical Ecology*, 25(5): 1079-1089.
- Duke SO, Dayan FE, Romagni JG, Rimando AM. 2000. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. *Weed research*, 40: 99-111.
- Duke SO, Powles SB. 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64: 319-325.
- Ellis RH, Roberts EH. 1980. Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany*, 45(1): 13-30.
- Fagodia SK, Singh HP, Batish DR, Kohli RK. 2017. Phytotoxicity and cytotoxicity of *Citrus aurantiifolia* essential oil and its major constituents: Limonene and citral. *Industrial Crops and Products*, 108: 708-715.
- Feás X, Estevinho LM, Salinero C, Vela P, Sainz MJ, Vázquez-Tato MP, Seijas JA. 2013. Triacylglyceride, Antioxidant and Antimicrobial Features of Virgin *Camellia oleifera*, *C. reticulata* and *C. sasanqua* Oils. *Molecules*, 18(4): 4573-4587.
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171: 501-23.
- Fischer NH, Williamson GB, Weidenhamer JD, Richardson DR. 1994. In search of allelopathy in the Florida scrub: The role of terpenoids. *Journal of Chemical Ecology*, 20(6): 1355-1380.
- Fouad R, Bousta D, Lalami AE, Chahdi FO, Amri I, Jamoussi B, Greche H. 2015. Chemical Composition and Herbicidal Effects of Essential Oils of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, *Eucalyptus cladocalyx*, *Origanum vulgare* L. and *Artemisia absinthium* L. cultivated in Morocco. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(1): 112-123.

- Gawde AJ, Cantrell CL, Zheljzkov VD. 2009. Dual extraction of essential oil and podophyllotoxin from *Juniperus virginiana*. *Industrial Crops and Products*, 30(2): 276-280.
- Gitsopoulos TK, Chatzopoulou P, Georgoulas I. 2013. Effects of Essential Oils of *Lavandula x hybrida* Rev, *Foeniculum vulgare* Mill and *Thymus capitatus* L. on the Germination and Radical Length of *Triticum aestivum* L., *Hordeum vulgare* L., *Lolium rigidum* L. and *Phalaris brachystachys* L. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16(6): 817-825.
- Gouda NAA, Saad MMG, Abdelgaleil SAM. 2016. PRE and POST Herbicidal Activity of Monoterpenes against Barnyard Grass (*Echinochloa crus-galli*). *Weed Science*, 64(1): 191-200.
- Grosso C, Coelho JA, Urieta JS, Palavra AMF, Barroso JG. 2010. Herbicidal Activity of Volatiles from Coriander, Winter Savory, Cotton Lavender, and Thyme Isolated by Hydrodistillation and Supercritical Fluid Extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(20): 11007-11013.
- Güemes J. 2009. *Cymbalaria*. En Castroviejo S, Aedo C, Laínz M, Muñoz Garmendia F, Nieto Feliner G, Paiva J, Benedí C (Eds.). *Flora iberica*, 13: 210-215.
- Guja LK, Merritt DJ, Dixon KW. 2010. Buoyancy, salt tolerance and germination of coastal seeds: implications for oceanic hydrochorous dispersal. *Functional Plant Biology*, 37(12): 1175–1186.
- Hussain MI, Reigosa MJ. 2014. Evaluation of herbicide potential of sesquiterpene lactone and flavonoid: impact on germination, seedling growth indices and root length in *Arabidopsis thaliana*. *Pakistan Journal of Botany*, 46(3): 995-1000.
- International Seed Testing Association. 2003. *ISTA Handbook on Seedling Evaluation*. The International Seed Testing Association (ISTA), Bassersdorf.

- Jorda Pardo JF. 2011. Vegetation Management in Archaeological Areas and Properties of Cultural Interest. En Oosterbeek L, Fidalgo C (Eds.). British Archaeological Reports (BAR) International Series. *Proceedings of the 15th World Congress of the International Union for Prehistoric and Protohistoric Sciences*. 47: 149-154. BAR Publishing, Lisboa.
- Juhler RK, Sorensen SR, Larsen L. 2001. Analysing transformation products of herbicide residues in environmental samples. *Water Research*, 35(6): 1371-1378.
- Kalinova SK. 2010. Allelopathy and Organic Farming. *Sustainable Agriculture Reviews*, 3: 379-418.
- Kashkooli AB, Saharkhiz MJ. 2014. Essential Oil Compositions and Natural Herbicide Activity of Four Denai Thyme (*Thymus daenensis* Celak.) Ecotypes. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(5): 859-874.
- Kordali S, Cakir A, Ozer H, Cakmakci R, KesdeK M, Mete E. 2008. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresource Technology*, 99(18): 8788-8795.
- Leporatti ML, Corradi L. 2001. Ethnopharmacobotanical remarks on the Province of Chieti town (Abruzzo, Central Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, 74(1): 17-40.
- Lisci M, Monte M, Pacini E. 2003. Lichens and higher plants on stone: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(1): 1-17.
- López de Rego JI. 2005. La Muralla de Lugo. Sistema constructivo. *Boletín do Museo Provincial de Lugo*, 12(1): 71-108.
- López González G. 1991. *Rumex*. En Castroviejo S, Aedo C, Laínz M, Muñoz Garmendia F, Nieto Feliner G, Paiva J, Benedí C (Eds.). *Flora iberica*, 2: 595-634.

- Martin AC. 1946. The comparative internal morphology of seeds. *The American Midland Naturalist*, 36(3): 513-660.
- Martínez ML, Valverde T, Moreno-Casasola P. 1992. Germination response to temperature, salinity, light and depth of sowing of ten tropical dune species. *Oecologia*, 92(3): 343-353.
- Meteogalicia. Consellería de Medio Ambiente e Ordenación do Territorio. Xunta de Galicia. <http://www.meteogalicia.gal/web/index.action>. [Fecha de consulta 2013-2018].
- Miranda CASF, Cardoso MD, Carvalho MLM, Figueiredo ACS, de Andrade J. 2015. Chemical characterisation and allelopathic potential of essential oils from leaves and rhizomes of whitw ginger. *Revista Ciencia Agronomica*, 46(3), 555–562.
- Montgomery DC. 2017. *Design and analysis of experiments*. John Wiley & Sons, New York.
- Moore PD, Chapman SB. 1986. *Methods in Plant Ecology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Moreno JL, García C, Landi L, Falchini L, Pietramellara G, Nannipieri P. 2001. The ecological dose value (ED50) for assessing Cd toxicity on ATP content and dehydrogenase and urease activities of soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 33(4-5): 483–489.
- Mortensen DA, Bastiaans L, Sattin M. 2000. The role of ecology in the development of weed management systems: an outlook. Proceedings of the 11th Symposium of the European Weed Research Society on Towards 25 years. *Weed Research*, 40(1): 49-62.
- Nieto Feliner G. 2007. *Epilobium*. En Castroviejo S, Aedo C, Laínz M, Muñoz Garmendia F, Nieto Feliner G, Paiva J, Benedí C (Eds.). *Flora iberica*, 8: 101-131.
- Onaran A, Yilar M, Belguzar S, Bayan Y, 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(16): 5159–5164.

- Paiva J. 2005. *Parietaria*. En Castroviejo S, Aedo C, Laínz M, Muñoz Garmendia F, Nieto Feliner G, Paiva J, Benedí C (Eds.). *Flora iberica*, 3: 268-270.
- Papafotiou M, Kanellou E, Economou G. 2010. Alternative Practices for Vegetation Management in Archaeological Sites-The Case of Eleusis. Proceedings of the II International Conference on Landscape and Urban Horticulture. *Acta Horticulturae*, 881: 879-883.
- Pardo A, Ruiz MA. 2002. *SPSS 11.0: Guía para el análisis de datos*. McGraw-Hill, Madrid.
- Pérez JG, Torres S, Puente M, Aguilar R. 2002. Efecto alelopático del extracto acuoso de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) sobre ocho cultivos económicos. Documento online. <http://www.ucf.edu.cu/URBES/CD/ALELOPATIA%20DEL%20TABACO.htm>
- Pinheiro PF, Costa AV, Alves TD, Gaiter IN, Pinheiro CA, Pereira AF, Oliveira CMR, Fontes MMP. 2015. Phytotoxicity and Cytotoxicity of Essential Oil from Leaves of *Plectranthus amboinicus*, Carvacrol, and Thymol in Plant Bioassays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(41): 8981–8990.
- Powles SB. 2008. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. *Pest Management Science*, 64(4): 360–365.
- Puig CG, Goncalves RF, Valentao P, Andrade PB, Reigosa MJ, Pedrol N. 2018. The Consistency Between Phytotoxic Effects and the Dynamics of Allelochemicals Release from *Eucalyptus globulus* Leaved Used as Bioherbicide Green Manure. *Journal of Chemical Ecology*, 44(7-8): 658–670.
- Ramezani S, Saharkhiz MJ, Ramezani F, Fotokian MH. 2008. Use of Essential Oils as Bioherbicides. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11(3): 319-327.
- Ratter JA. 1991. *Spergula*. En Castroviejo S, Aedo C, Laínz M, Muñoz Garmendia F, Nieto Feliner G, Paiva J, Benedí C (Eds.). *Flora iberica*, 2: 145-149.

- Sáez F. 1995. Essential oil variability of *Thymus zygis* growing wild in Southeastern Spain. *Phytochemistry*, 40(3): 819-825.
- Salinero C, Feás X, Mansilla JP, Seijas JA, Vázquez-Tato MP, Vela P, Sainz MJ. 2012. H-1-Nuclear Magnetic Resonance Analysis of the Triacylglyceride Composition of Cold-Pressed Oil from *Camellia japonica* some weedy species. *Molecules*, 17(6): 6716-6727.
- Sauerborn J, Linke KH, Saxena MC, Koch W. 1989. Solarization-A Physical Control Method for Weeds and Parasitic Plants (*Orobancha* spp) in Mediterranean Agriculture. *Weed Research*, 29(6): 391–397.
- Setia N, Batish DR, Singh HP, Kohli RK. 2007. Phytotoxicity of volatile oil from *Eucalyptus citriodora* against some weedy species. *Journal of Environmental Biology*, 28(1): 63-66.
- Singh HP, Batish DR, Kaur S, Vaid S, Kohli R. 2004. Weed suppressing ability of some monoterpenes. *Journal of Plant Diseases and protection*, 19: 821–828.
- Singh HP, Batish DR, Setia N, Kohli R. 2005. Herbicidal activity of volatile oils from *Eucalyptus citriodora* against *Parthenium hysterophorus*. *Annals of Applied Biology*, 146: 89–94.
- Souza-Alonso P, González L, López-Nogueira A, Cavaleiro C, Pedrol N. 2018. Volatile organic compounds of *Acacia longifolia* and their effects on germination and early growth of species from invaded habitats. *Chemistry and Ecology*, 34(2): 126–145.
- Sun T, Zhang Z, Ning T, Mi Q, Zhang X, Zhang S, Liu Z. 2015. Colored polyethylene film mulches on weed control, soil conditions and peanut yield. *Plant Soil and Environment*, 61(2): 79–85.
- Synowiec A, Kalemba D, Drozdek E, Bocianowski J. 2017. Phytotoxic potential of essential oils from temperate climate plants against the germination of selected weeds and crops. *Journal of Pest Science*, 90(1): 407–419.

- Taban A, Saharkhiz MJ, Hadian J. 2013. Allelopathic potential of essential oils from four *Satureja* spp. *Biological Agriculture & Horticulture*, 29(4): 244-257.
- Thompsett PB, Pritchard HW. 1998. The effect of chilling and moisture status on the germination, desiccation tolerance and longevity of *Aesculus Hippocastanum* L. seed. *Annals of Botany*, 82(2): 249-261.
- Thompson K, Grime JP. 1979. Seasonal Variation in the Seed Banks of Herbaceous Species in Ten Contrasting Habitats. *Journal of Ecology*, 67(3): 893-921.
- Torres L, Díaz-Vizcaíno EA, Rigueiro A. 2014. Effect of blue gum, silver wattle and common gum cistus extracts on seed germination and seedlings development of *Parietaria judaica* L. En Pedrol N, Puig CG, Souza-Alonso P (Eds.). *Organic Agriculture International Symposium*. 36. Tórculo Comunicación Gráfica, Santiago de Compostela.
- Torres L, Díaz-Vizcaíno EA, Rigueiro A. 2016. Efecto de hidrolatos de romero y tomillo sobre la germinación y el desarrollo de plántulas de *Parietaria judaica* L. En Sociedad Española de Agricultura Ecológica/Sociedad Española de Agroecología (SEAE) (Ed.). *XII Congreso SEAE*. 200-207. IMAG-Impressions, Valencia.
- Torres L, Díaz-Vizcaíno EA, Rigueiro A. 2017a. Evaluación del potencial bioherbicida de orégano, romero y tomillo sobre la germinación de *Rumex obtusifolius* L. y *Spergula arvensis* L. En Royuela M, Zabalza A (Eds.). *XVI Congreso de la Sociedad Española de Malherbología*. 449-454. Rodona Industria Gráfica, Pamplona.
- Torres L, Rigueiro A, Díaz-Vizcaíno EA. 2017b. La evaluación del desarrollo inicial de plántulas contribuye a la determinación de la potencialidad bioherbicida de aceites e hidrolatos de especies aromáticas. En Royuela M, Zabalza A (Eds.). *XVI Congreso de la Sociedad Española de Malherbología*. 443-448. Rodona Industria Gráfica, Pamplona.
- Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. 2006. *Flora Europaea*. Cambridge University Press, Cambridge.

- Uremis I, Arslan M, Sangun MK. 2009. Herbicidal Activity of Essential Oils on the Germination of Some Problem Weeds. *Asian Journal of Chemistry*, 21(4): 3199-3210.
- Valiño E. 2013. *Estudio del potencial bioherbicida del hidrolato de Cistus ladanifer*. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Vigo.
- Vasilakoglu I, Dhima K, Wogiatzi E, Eleftherohorinos I, Lithourgidis A. 2007. Herbicidal potential of essential oils of oregano or marjoram (*Origanum* spp.) and basil (*Ocimum basilicum*) on *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. and *Chenopodium album* L. weeds. *Allelopathy Journal*, 20(2): 297-305.
- Verdeguer M. 2011. *Fitotoxicidad de aceites esenciales y extractos acuosos de plantas mediterráneas para el control de arvenses*. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Verdeguer M, Blázquez MA, Boira H. 2009. Phytotoxic effects of *Lantana camara*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Eriosephalus africanus* essential oils in weeds of Mediterranean summer crops. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37(4): 362-369.
- Verdeguer M, Blázquez MA, Boira H. 2012. Chemical composition and herbicidal activity of the essential oil from a *Cistus ladanifer* L. population from Spain. *Natural Product Research*, 26(17): 1602-1609.
- Vigna MR, Fernández OA, Brevedan RE. 1983. Germinación de *Solanum elaeagnifolium* Cav. *Studia Oecologica*, 2(2): 167-182.
- Vyvyan JR. 2002. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron*, 58: 1631-1646.
- Wilson CL, Solar JM, El Ghaouth A, Wisniewski ME. 1997. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant disease*, 81(2): 204-210.

