

El aceite esencial de *Carlina acaulis*: un potencial herbicida natural contra la mala hierba *Bidens pilosa*

Carlina acaulis essential oil: a potential natural herbicide against the weed *Bidens pilosa*

Sara Álvarez-Rodríguez^{1,*}, Eleonora Spinozzi², David López-González¹,
Adela M. Sánchez-Moreiras¹, Marta Ferrati², Filippo Maggi² & Fabrizio Araniti³

¹ Universidade de Vigo, Departamento de Biología Vexetal e Ciencias do Solo, Facultade de Biología, Campus Lagoas-Marcosende s/n, 36310, Vigo, Spain

² Chemistry Interdisciplinary Project Research Center, School of Pharmacy, University of Camerino, 62032 Camerino, Italy

³ Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali - Produzione, Territorio, Agroenergia, Università Statale di Milano, Via Celoria n°2, 20133 Milano, Italy

(*E-mail: sara.alvarez.rodriguez@uvigo.gal)

<https://doi.org/10.19084/rca.34938>

Recibido/received: 2024.01.15

Aceptado/accepted: 2024.02.28

RESUMEN

Gracias a su capacidad alelopática, la investigación de aceites esenciales (AE) como alternativas sostenibles para el control de malas hierbas ha despertado un considerable interés a lo largo de los últimos años. En este estudio, se ha evaluado la capacidad fitotóxica del AE extraído de *Carlina acaulis* L. (Apiaceae) en la mala hierba *Bidens pilosa* L. Este aceite, principalmente compuesto de óxido de carlina (98%), ha exhibido notables efectos fitotóxicos en el metabolismo de *Bidens pilosa*. Estos efectos incluyen necrosis en las hojas, reducción en el contenido relativo de agua y área foliar total, y un aumento en la relación peso seco/peso fresco, indicando una posible alteración en el estado hídrico de la planta. El análisis del sistema fotosintético reveló una significativa disminución en la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (Φ_{II}) y en la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (F_v/F_m) tras la aplicación del AE. En contraste, la energía disipada en forma de calor (Φ_{NPQ}) aumentó significativamente. El daño al fotosistema II coincidió con una disminución en las concentraciones de manganeso y calcio, sugiriendo una alteración en el clúster Mn_4Ca del fotosistema II. El análisis metabolómico reveló acumulación de isoleucina y valina, asociadas comúnmente con estrés osmótico, y una disminución general en el contenido de azúcares. Nuestros resultados indican que el AE de *C. acaulis* es un producto natural prometedor con un fuerte potencial fitotóxico contra *Bidens pilosa*, y se sugiere la exploración de sus efectos en otras malas hierbas.

Palabras clave: aceite esencial, óxido de carlina, fotosistema II, metabolómica

ABSTRACT

Due to its allelopathic capability, the investigation of essential oils (EO) as sustainable alternatives for weed control has gained considerable interest in the last years. In this study, we investigated the phytotoxic capacity of the essential oil extracted from *Carlina acaulis* L. (Apiaceae) on the weed *Bidens pilosa* L. This essential oil, mainly composed of carlina oxide (98%), has demonstrated remarkable phytotoxic effects on the metabolism of *Bidens pilosa*. These effects include leaf necrosis, a reduction in relative water content and total leaf area, and an increase in the dry weight/fresh weight ratio, indicating possible alteration in the plant's water status. After EO short-exposition, analysis of the photosynthetic system revealed a significant decrease in the photochemical efficiency of photosystem II (Φ_{II}) and the maximum photochemical efficiency of photosystem II (F_v/F_m). In contrast, the energy dissipated as heat (Φ_{NPQ}) increased significantly. Damage to photosystem II was accompanied by a decrease in manganese and calcium concentrations, suggesting an alteration in the Mn_4Ca cluster of photosystem II. Metabolomics analysis revealed a general decrease in sugar content and an accumulation of isoleucine and valine, commonly associated with osmotic stress situations. Our results indicate that the EO of *C. acaulis* is a promising natural product with strong phytotoxic potential against *Bidens pilosa*, and the exploration of its effects on other weeds is suggested.

Keywords: essential oil, carline oxide, photosystem II, metabolomics

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, las malas hierbas han desarrollado mecanismos de resistencia a los herbicidas convencionales, hasta el punto que la incorporación de productos respetuosos con el medio ambiente, como herbicidas naturales basados en metabolitos especializados, se ha convertido en uno de los principales intereses de los investigadores. Entre las distintas clases de metabolitos especializados, los poliacetilenos son compuestos alelopáticos que han demostrado eficacia frente al crecimiento y germinación de distintas especies, como fue recientemente relatado por Nishidono & Tanaka (2022). Muchos poliacetilenos son compuestos volátiles, que pueden encontrarse como constituyentes de los aceites esenciales (AE) de las plantas. Por ejemplo, las raíces de *Carlina acaulis* L. (Asteraceae) contienen alrededor de 1% de AE, que está prácticamente constituido por el óxido aromático poliacetileno de carlina, alcanzando 90% o más de la composición total del AE, como fue recientemente relatado por Pavela *et al.* (2021). Los AE de plantas también son conocidos por ser prometedores bioherbicidas debido a su capacidad para inhibir la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas, causando estrés oxidativo y alterando la maquinaria fotosintética, tal y como ya ha sido relatado por Verdeguer Sancho *et al.* (2020). De hecho, muchos AE y extractos de diferentes especies vegetales ya se han probado contra malezas problemáticas en todo el mundo, como *Bidens pilosa* L., con resultados prometedores en cuanto al posible desarrollo de nuevos herbicidas naturales (Pergo *et al.*, 2008). *Bidens pilosa* (Asteraceae) es una especie herbácea considerada una maleza problemática en muchos ecosistemas debido a su resistencia a herbicidas convencionales, fuerte adaptabilidad y alta invasividad. Dado el desconocimiento sobre la fitotoxicidad de este producto natural, en este trabajo hemos evaluado por primera vez la fitotoxicidad del AE de *C. acaulis* en plantas adultas de *B. pilosa*. Además, se evaluaron los efectos del AE en la maquinaria fotosintética y el perfil ionómico y metabólico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayos de fitotoxicidad con el AE

Se seleccionaron plantas adultas de *Bidens pilosa* previamente crecidas en macetas en condiciones de

invernadero con un fotoperiodo de luz natural. Se seleccionaron aquellas que habían alcanzado cuatro hojas verdaderas y se pulverizaron una sola vez con 10 mL de emulsión de AE a distintas concentraciones: 4, 8, 12 y 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Tras 48 horas de tratamiento con el AE, se cosechó material vegetal para evaluar los siguientes parámetros: área foliar total, contenido relativo de agua y peso seco/peso fresco.

Medidas de fluorescencia de la clorofila a

Se monitorizaron las variaciones en la maquinaria fotosintética de la planta tras 0, 6, 24 y 48 horas de exposición con el AE utilizando el medidor de fotosíntesis portátil Photosynq MultispeQ v2.0. En concreto, se midió la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (Φ_{II}), la disipación de energía regulada en forma de calor (Φ_{NPQ}), la disipación de energía no regulada (Φ_{NO}) y la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (F_v/F_m).

Análisis del perfil ionómico

Además, se comparó el perfil ionómico de plantas no tratadas plantas tratadas con 4, 8, 12 y 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ del AE de *C. acaulis* tras 48 h de exposición. El análisis ionómico se llevó a cabo mediante Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS), obteniéndose información de las concentraciones de Na, Mg, Al, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Zn, Se, Cd, y P.

Análisis del perfil metabólico

Por último, se realizó un análisis metabólico no dirigido mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS). Tras la extracción y derivatización de las muestras, utilizando el ribitol como estándar interno (0,2 mg/mL), se inyectaron en un cromatógrafo de gases Agilent (GC 7890 A) acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo único (MS 5975 C INERT XL MSD) y un auto-muestreador CTC ANALYTICS PAL. Para la cromatografía de la muestra se utilizó una columna MEGA-5MS (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm + 10 m de precolumna) (MEGA s.r.l., Milán, Italia) y como gas portador helio ultrapuro (6,0) con un caudal de 1 mL/min.

Análisis estadístico

Los datos de los experimentos fueron analizados utilizando el test Kruskal-Wallis ($p \leq 0.05$). Por otro lado, el análisis de datos de metabolómica se realizó primeramente con el *software* MS-DIAL y posteriormente en Metaboanalyst 6.0. Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) el análisis ortogonal de mínimos discriminantes parciales (OPLS-DA). Se llevó a cabo un *t-test* ($p \leq 0,05$) para analizar las diferencias estadísticas entre los metabolitos de las plantas control y las plantas tratadas con AE.

RESULTADOS

Tras el tratamiento con la emulsión del AE, las plantas de *B. pilosa* mostraron efectos tempranos como necrosis en las hojas (u hojas completamente secas en el caso de las concentraciones más altas ensayadas) (Figura 1), reducción significativa del área foliar total y reducción del peso fresco y peso seco.

Además, las plantas de *B. pilosa* mostraron un aumento progresivo del ratio peso seco/peso seco a



Figura 1 - Efectos fenotípicos ocasionados por el AE de *C. acaulis* en plantas adultas de *B. pilosa* tras 24 horas. De izquierda a derecha, tratamiento control (0 µL/mL), 12 µL/mL y 20 µL/mL.

medida que aumentaba concentración de AE, unido con la disminución significativa del contenido relativo en agua. Los resultados del análisis iónico revelaron que el AE redujo significativamente las concentraciones de Mn y Ca, entre otros. Sin embargo, los niveles de K y P aumentaron significativamente en comparación con las plantas control (Tabla 1).

Tras la monitorización de los parámetros fotosintéticos de la planta a las 0, 6, 24 y 48 horas, se observó que la eficiencia del fotosistema II (Φ_{II}) fue progresivamente disminuyendo a medida que aumentaba la concentración de AE (Figura 2A). Simultáneamente, la eficiencia máxima del fotosistema II en oscuridad (F_v/F_m) experimentó la misma tendencia (Figura 2D). La emisión de energía no regulada en exceso en forma de fluorescencia (Φ_{NO}) disminuyó significativamente en comparación con las plantas control (Figura 2B), mientras que la energía disipada en forma de calor (Φ_{NPQ}) aumentó significativamente tras la pulverización del AE de *C. acaulis* (Figura 2C).

El perfil metabolómico analizó un total de 444 metabolitos, de los cuales 97 fueron correctamente identificados. El análisis de componentes principales construido sobre la primera y la segunda componente, explicó una varianza total del 83,1% y reveló una clara separación entre grupos de muestras (Figura 3A). El *t-test* demostró que 62 metabolitos fueron alterados significativamente después de la exposición al AE. Los metabolitos alterados fueron principalmente aminoácidos (alanina, GABA, isoleucina), azúcares (fructosa, glucosa y manosa) y ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido fumárico, ácido glutárico), entre otros (Figura 3B). En general, los aminoácidos incrementaron su contenido tras el tratamiento con el AE de *C. acaulis* mientras que los azúcares disminuyeron en comparación con el tratamiento control. Por último, se

Tabla 1 - Contenido de iones de plantas adultas de *B. pilosa* tras 48 horas de exposición al AE de *C. acaulis*. De izquierda a derecha, tratamiento control (0 µL/mL), 4, 8, y 20 µL/mL

Elemento (µg/µgDW)	Tratamiento (µg/mL)				
	0	4	8	12	20
K	28099.33 ± 914.57	31842.43 ± 325.78*	31532.62 ± 743.03*	31709.27 ± 437*	30647.31 ± 1004.6*
P	7419.94 ± 158.28	7881.90 ± 760.18	8551.05 ± 577.72*	8176.64 ± 627.02	9592.04 ± 423.05*
Ca	20698.96 ± 1270.13	20169 ± 618.64	20029.34 ± 818.87	18908.18 ± 584.33	17098.22 ± 395.33*
Mn	252.97 ± 15.57	229.74 ± 5.27*	190.06 ± 14.62*	198.99 ± 8.61*	202.96 ± 5.73*

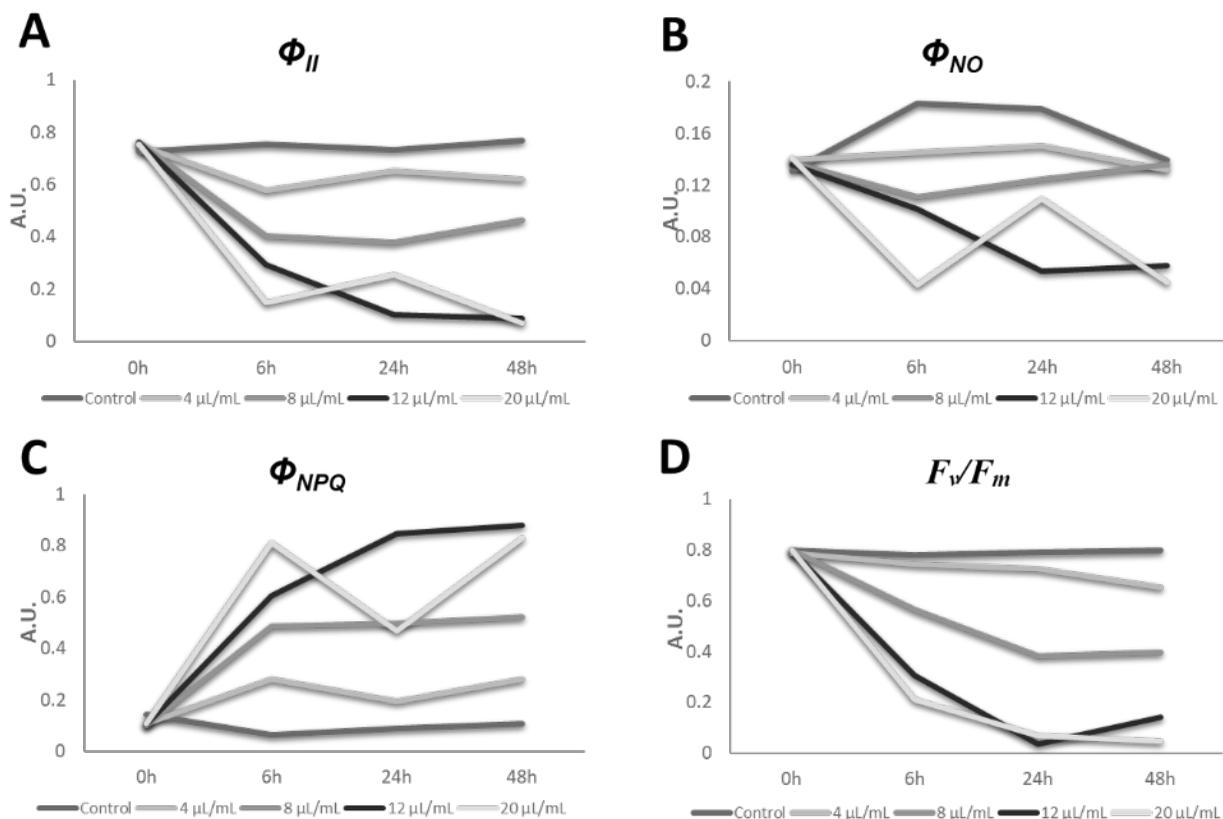


Figura 2 - Valores medios de la eficiencia del fotosistema II (Φ_{II}) (A), la energía no regulada en exceso en forma de fluorescencia (Φ_{NO}) (B), la energía disipada en forma de calor (Φ_{NPQ}) (C), y la eficiencia máxima del fotosistema II en oscuridad (F_v/F_m) (D) de plantas de *B. pilosa* expuestas a distintas concentraciones de AE (0, 4, 8, 12, and 20 µL/mL) durante 0, 6, 24 y 48 h. Los valores medios estaban expresados en unidades arbitrarias (A.U.).

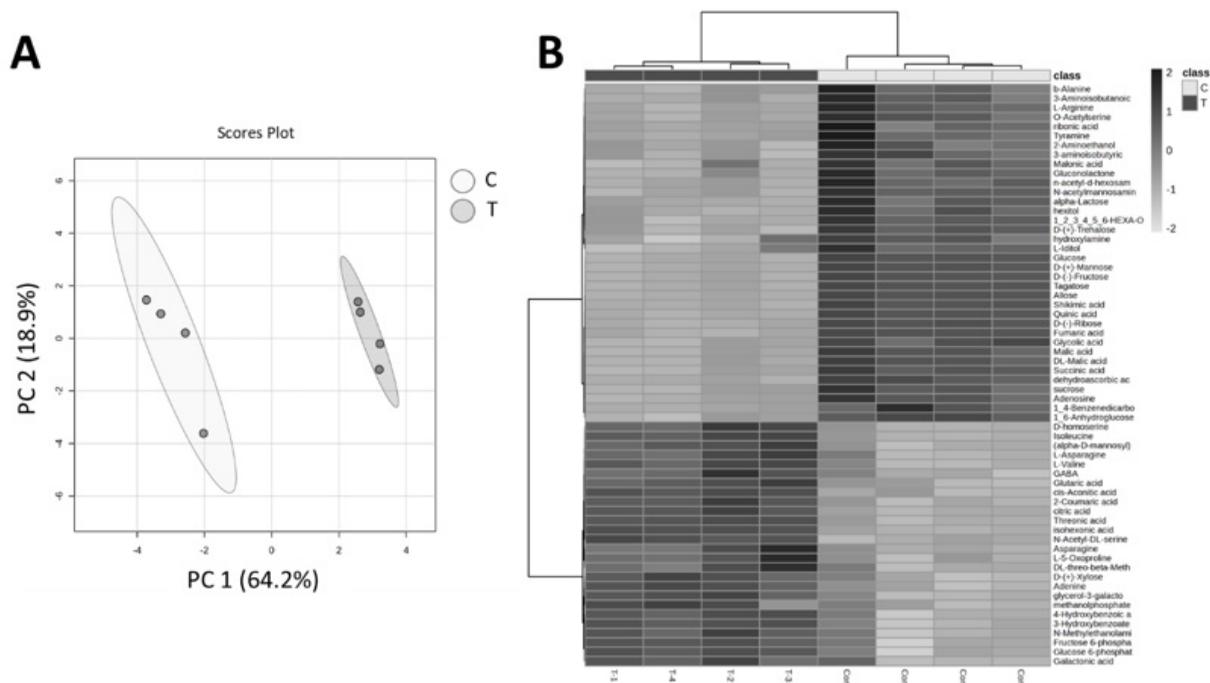


Figura 3 - Representación gráfica del análisis de componentes principales (PCA) (A) y el mapa térmico de los 62 metabolitos alterados significativamente tras el *t*-test (B). La 'C' representa plantas control y la 'T' las plantas tratadas con el AE.

evaluaron también las rutas metabólicas afectadas, obteniéndose un total de 41 rutas alteradas tras la exposición al AE. Entre ellas, las más impactadas fueron la ruta de la alanina, aspartato y glutamato, la ruta metabólica de la glicina, serina y treonina y la ruta metabólica del almidón y la sacarosa.

DISCUSIÓN

En este trabajo se ha evaluado el efecto fitotóxico del AE de *C. acaulis* contra la mala hierba *Bidens pilosa*. Como ya fue relatado por Benelli *et al.* (2022), la actividad biológica del AE de *C. acaulis* está principalmente ligada a la presencia de óxido de carlina como principal constituyente, que también fue demostrado en este trabajo mediante una hidrodestilación del AE. Los ensayos demostraron que el AE causó deshidratación de las hojas y necrosis foliar, también confirmado por el aumento del ratio peso seco/peso fresco. Resultados similares ya habían sido relatados por Diaz-Tielas *et al.* (2014) tras el tratamiento con *trans*-chalcona, sugiriendo alteraciones en el estado hídrico de la planta. Las plantas de *B. pilosa* experimentaron una disminución significativa de la eficiencia del fotosistema II (Φ_{II}) y de la eficiencia máxima del fotosistema II en oscuridad (F_v/F_m), sugiriendo un posible daño físico en el complejo antena del fotosistema II y causando una disminución de la eficiencia fotosintética, tal y como ya había sido relatado por Sánchez-Moreiras *et al.* (2020) y Álvarez-Rodríguez *et al.* (2023). El posible daño en el fotosistema II fue también demostrado con el análisis ionómico. Las plantas de *B. pilosa* experimentaron una reducción significativa del contenido en Mn, considerado como un componente principal del complejo evolutivo de oxígeno del fotosistema II. El cluster Mn_4Ca es el encargado de proteger frente a situaciones de estrés oxidativo y de impulsar la cadena de transporte de electrones (Schmidt *et al.*, 2016). Por lo tanto, una disminución en el contenido de Mn derivaría en una reducción del número de electrones que atraviesan el fotosistema, induciendo una disminución de la eficiencia fotosintética. En consecuencia, la deficiencia de Mn está directamente correlacionada con el parámetro F_v/F_m , que se reduce debido al estrés, como hemos observado en las plantas de *B. pilosa* tras la exposición al AE de *C. acaulis*. Como ya fue relatado por Schmidt *et al.* (2016), las hojas de *Hordeum vulgare* L. mostraron manchas marrones

necróticas como consecuencia de la deficiencia de Mn, síntoma también observado en las hojas de *B. pilosa* tras el tratamiento con AE de *C. acaulis*. Además, el análisis ionómico mostró disminución del contenido de Ca, también parte del cluster Mn_4Ca , y cuyo déficit afecta negativamente a la eficiencia fotosintética. El análisis metabolómico reveló que el AE de *C. acaulis* aumentó generalmente el contenido de aminoácidos con capacidad osmoprotectora (GABA, isoleucina, valina). Resultados similares fueron documentados por López-González *et al.* (2023) tras el tratamiento con citral y farnesene, sugiriendo que las plantas se estaban defendiendo del estrés con un incremento en la producción de estos aminoácidos con capacidad osmoprotectora. La acumulación de aminoácidos de cadena ramificada, como la isoleucina y la valina, ya se ha relacionado con respuestas a situaciones de estrés osmótico, principalmente debido a condiciones de estrés por sequía, como ha sido relatado por Huang and Jander (2017). Nuestros resultados sugieren que la exposición al AE de *C. acaulis* provoca una alteración del estado hídrico de la planta, induciendo alteraciones osmóticas y, como consecuencia, la acumulación de aminoácidos de cadena ramificada. Por último, las plantas de *B. pilosa* experimentaron una disminución generalizada del contenido de azúcares. Como ha sido relatado por Khan *et al.* (2020), frente a condiciones severas de estrés, las plantas pueden experimentar una disminución del contenido de azúcares. De hecho, ha sido relatado recientemente (López-González *et al.* 2023) que una reducción en el contenido de sacarosa puede estar relacionado con una disminución de la eficiencia fotosintética, ya que es el producto principal de la fotosíntesis. Esta situación estaría en relacionada con nuestros resultados, ya que el AE de *C. acaulis* alteró varios parámetros de fluorescencia de clorofila a, sugiriendo daños en la maquinaria fotosintética de las plantas de *B. pilosa*, reduciendo la eficiencia fotosintética.

CONCLUSIONES

El AE de *C. acaulis*, compuesto principalmente por óxido de carlina, ha demostrado tener un fuerte potencial fitotóxico contra plantas de *Bidens pilosa*. Los efectos provocados por este AE sugieren una posible alteración en el estado hídrico de la planta y daño físico en la maquinaria fotosintética.

La reducción de los niveles de azúcares, Mn y Ca confirmó aún más esos daños potenciales, sugiriendo una alteración en la correcta funcionalidad del cluster Mn₄Ca del PSII. Los resultados de este

trabajo sugieren que el AE de *C. acaulis* podría considerarse un producto fitotóxico prometedor para la gestión de malas hierbas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez-Rodríguez, S.; Alvite, C.M.; Reigosa, M.J.; Sánchez-Moreiras, A.M. & Araniti, F. (2023) - Application of Indole-Alkaloid Harmaline induces physical damage to photosystem II antenna complexes in adult plants of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 71, n. 15, p. 6073-6086. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c00531>
- Benelli, G.; Ceccarelli, C.; Zeni, V.; Rizzo, R.; Verde, G.L.; Sinacori, M.; Boukouvala, M.C.; Kavallieratos, N.G.; Ubaldi, M.; Tomassoni, D.; Benvenuti, F.; Proshanta, R.; Petrelli, R.; Cappellacci, L.; Spinozzi, E.; Maggi, F. & Canale, A. (2022) - Lethal and behavioural effects of a green insecticide against an invasive polyphagous fruit fly pest and its safety to mammals. *Chemosphere*, vol.287, art. 132089. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132089>
- Díaz-Tielas, C.; Sotelo, T.; Graña, E.; Reigosa, M.J. & Sánchez-Moreiras, A.M. (2014) - Phytotoxic potential of *trans*-chalcone on crop plants and model species. *Journal of Plant Growth and Regulation*, vol. 33, p. 181-194. <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9360-6>
- Huang, T. & Jander, G. (2017) - Abscisic acid-regulated protein degradation causes osmotic stress-induced accumulation of branched-chain amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, vol. 246, p. 737-747. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2727-3>
- Khan, N.; Ali, S.; Zandi, P.; Mehmood, A.; Ullah, S.; Ikram, M.; Ismail, Sahid, M.A. & Babar, M.A. (2020) - Role of sugars, amino acids and organic acids in improving plant abiotic stress tolerance. *Pakistan Journal of Botany*, vol. 52, n. 2, p. 355-363. [http://dx.doi.org/10.30848/PJB2020-2\(24\)](http://dx.doi.org/10.30848/PJB2020-2(24))
- López-González, D.; Graña, E.; Teijeira, M.; Verdeguer, M.; Reigosa, M.J.; Sánchez-Moreiras, A.M. & Araniti, F. (2023) - Similarities on the mode of action of the terpenoids citral and farnesene in *Arabidopsis* seedlings involve interactions with DNA binding proteins. *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 196, p. 507-519. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.02.004>
- Nishidono, Y. & Tanaka, K. (2022) - Comprehensive characterisation of polyacetylenes and diterpenes from the underground parts of *Solidago altissima* L. and their contribution to the overall allelopathic activity. *Phytochemistry*, vol. 193, art. 112986. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112986>
- Pavela, R.; Pavoni, L.; Bonacucina, G.; Cespi, M.; Cappellacci, L.; Petrelli, R.; Spinozzi, E.; Aguzzi, C.; Zeppa, L.; Ubaldi, M.; Desneux, N.; Canale, A.; Maggi, F. & Benelli, G. (2021) - Encapsulation of *Carlina acaulis* essential oil and carlina oxide to develop long-lasting mosquito larvicides: Microemulsions versus nanoemulsions. *Journal of Pest Science*, vol. 94, p. 899-915. <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01327-2>
- Sánchez-Moreiras, A.M.; Graña, E.; Reigosa, M.J. & Araniti, F. (2020) - Imaging of chlorophyll a fluorescence in natural compound-induced stress detection. *Frontiers in Plant Science*, vol. 11, art. 583590. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.583590>
- Schmidt, S.B.; Jensen, P.E. & Husted, S. (2016) - Manganese deficiency in plants: the impact on photosystem II. *Trends in Plant Science*, vol. 21, n. 7, p. 622-632. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.03.001>
- Verdeguer Sancho, M.M.; Sánchez-Moreiras, A.M. & Araniti, F. (2020) - Phytotoxic Effects and Mechanism of Action of Essential Oils and Terpenoids. *Plants*, vol. 9, n. 11, art. 1571. <https://doi.org/10.3390/plants9111571>
- Pergo, É.M.; Abraham, D.; Soares da Silva, P.C.; Kern, K.A.; Da Silva, L.J.; Voll, E. & Ishii-Iwamoto, E.L. (2008) - *Bidens pilosa* L. exhibits high sensitivity to coumarin in comparison with three other weed species. *Journal of Chemical Ecology*, vol. 34, p. 499-507. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9449-8>