

Influencia del estado fenológico de *Cistus ladanifer* L. sobre el potencial bioherbicida de su aceite esencial

Influence of the phenological stage of *Cistus ladanifer* L. on the bioherbicidal potential of its essential oil

C. Pérez-Izquierdo^{1,*}, P. Serrano-Pérez², M.D. Osuna³ & M.C. Rodríguez-Molina²

¹ Grupo de Investigación Forestal, INDEHESA, Universidad de Extremadura, España

² Área de Protección Vegetal. CAEM-CICYTEX, Plasencia, España

³ Área de Protección Vegetal. Finca La Orden-CICYTEX, Guadajira, España

(*E-mail: carlospi@unex.es)

<https://doi.org/10.19084/rca.34968>

Recibido/received: 2024.01.15

Aceptado/accepted: 2024.02.28

RESUMEN

La necesidad de obtener herbicidas de nueva generación basados en aleloquímicos ha impulsado en los últimos años el uso de productos naturales más sostenibles, como pueden ser los aceites esenciales de plantas. El estudio evaluó el impacto del estado fenológico de la planta sobre la composición química y el potencial bioherbicida del aceite esencial de *Cistus ladanifer* L. El aceite esencial fue extraído por hidrodestilación y analizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). La composición química varió en función del estado fenológico de la planta, pero el grupo más representativo de compuestos del aceite esencial fueron los sesquiterpenos oxigenados. El efecto herbicida se testó *in vitro* sobre la mala hierba *Echinochloa crus-galli* y en dos de sus respectivos cultivos asociados (arroz y tomate). Se ensayaron tres dosis crecientes de aceite esencial (0,022; 0,044 y 0,088 µl/mL de espacio libre en la placa Petri) y un control con agua destilada. Se prepararon 5 repeticiones por estado fenológico, dosis y especie, con 10 semillas en cada repetición. El análisis Anova de Rangos Alineados mostró un efecto significativo para los tres factores analizados (estado fenológico, dosis y especie). Sin embargo, este efecto fitotóxico dependiente de la dosis fue significativamente mayor sobre *Echinochloa crus-galli* en comparación con arroz y tomate a dosis medias y bajas (0,022 y 0,044 µl/ml). Además, el aceite esencial obtenido en octubre, con un mayor porcentaje de monoterpenos hidrocarbonados, mostró un efecto fitotóxico significativamente mayor que aquel obtenido en agosto. Por tanto, estos resultados muestran el elevado potencial del aceite esencial de *C. ladanifer* para su empleo como bioherbicida en agricultura.

Palabras clave: Aceite esencial, Bioherbicida, *Cistus ladanifer*, GC-MS.

ABSTRACT

The need to obtain new generation herbicides based on allelochemicals has prompted in recent years the use of more sustainable natural products, such as plant essential oils. This study evaluated the impact of plant phenological stage on the chemical composition and bioherbicidal potential of *Cistus ladanifer* L. essential oil. The essential oil was extracted by hydrodistillation and analysed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The oxygenated sesquiterpenes were the most representative group of the essential oil and the chemical composition varied according to the plant phenological stage. The bioherbicidal effect was tested *in vitro* on the weed *Echinochloa crus-galli* and two of its respective associated crops (rice and tomato). We tested three increasing doses of essential oil (0.022; 0.044 and 0.088 µl/mL of headspace in the Petri dish) and a control with distilled water. Five replicates per phenological stage, dose and species were prepared, with 10 seeds in each replicate. The Aligned Ranks Anova analysis showed a significant effect for the three factors analysed (phenological stage, dose and species). However, the dose-dependent phytotoxic effect was significantly higher on *Echinochloa crus-galli* compared to rice and tomato at medium and low doses (0.022 and 0.044 µl/ml). Furthermore, the essential oil extracted in October, with a higher percentage of hydrocarbon monoterpenes, showed a significantly higher phytotoxic effect than that obtained in August. Therefore, these results show the high potential of *C. ladanifer* essential oil for use as a bioherbicide in agriculture.

Keywords: Bioherbicide, *Cistus ladanifer*, Essential oil, GC-MS.

INTRODUCCIÓN

Las malas hierbas son consideradas una de las principales limitaciones de la producción agrícola, ya que interfieren o alteran las funciones de crecimiento y desarrollo de los cultivos (Laosinwattana *et al.*, 2018). La aplicación intensiva de herbicidas químicos con similares modos de acción ha aumentado el riesgo de toxicidad para los animales, las plantas, la salud humana y el medio ambiente (Petroski & Stanley, 2009), además de favorecer la aparición de resistencias (Dayan & Duke, 2014). Por lo tanto, existe una necesidad urgente de descubrir nuevos herbicidas basados en aleloquímicos con modos de acción novedosos, sostenibles y seguros (Dayan & Duke, 2014).

Cistus ladanifer L. (Cistaceae) es un arbusto nativo de la región Mediterránea, que se encuentra ampliamente distribuido en áreas degradadas y no cultivadas de la Península ibérica (Frazão *et al.*, 2018). En los últimos años, los productos derivados del metabolismo secundario de esta especie, entre los que destaca el aceite esencial, han despertado un gran interés, no solo por sus propiedades aromáticas y fijadoras, sino también por su importancia biológica para la industria farmacológica y agroalimentaria. En este sentido, aunque varios autores han evaluado el efecto fitotóxico del aceite esencial de *C. ladanifer* en algunas malas hierbas y cultivos (Verdeguer *et al.*, 2012; Benali *et al.*, 2020; Pérez-Izquierdo *et al.*, 2022), no hay estudios previos que evalúen este efecto sobre *Echinochloa crus-galli* y que, además, tengan en cuenta el estado fenológico de la planta en el momento de la extracción del aceite esencial. Por tanto, el objetivo principal de nuestro estudio fue evaluar el impacto del estado fenológico de la planta sobre la composición química y el potencial bioherbicida del aceite esencial de *Cistus ladanifer* L. sobre *E. crus-galli* así como la selectividad frente a cultivos donde esta mala hierba está presente, como son arroz y tomate.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal se recolectó en una población natural de *C. ladanifer* situada en el noroeste de Extremadura (Guijo de Granadilla, España). Se recolectaron las partes aéreas jóvenes de un mínimo de veinte plantas para dos estados fenológicos

muy contrastados (inicio y final de maduración del fruto, en agosto y octubre respectivamente). La extracción del material vegetal se llevó a cabo por hidrodestilación con un aparato tipo Clevenger. La duración de la extracción fue de 3 h y se emplearon aproximadamente 200 g de material vegetal seco. El aceite esencial se separó por decantación y se almacenó a -18°C hasta su uso. Los compuestos volátiles del aceite esencial se determinaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). La identificación individual de los compuestos se realizó comparando sus Índices de Retención con bibliografía y sus espectros de masas con librerías (NBS75K). El porcentaje de composición relativa (%) de cada compuesto individual se calculó dividiendo cada área de pico individual entre el área total del cromatograma.

Las semillas de *E. crus-galli* fueron proporcionadas por el Área de Protección Vegetal de CICYTEX, y provienen de prospecciones realizadas en diferentes cultivos en Extremadura. La actividad fitotóxica del aceite esencial sobre semillas de *E. crus-galli*, arroz (var. Gladio) y tomate se evaluó mediante bioensayos en placa Petri. Para ello, se colocaron lotes de diez semillas previamente desinfectadas en placas de Petri de 90 mm de diámetro sobre dos capas de papel de filtro Whatman nº 1. El papel de filtro se humedeció con 2 ml de agua destilada y el aceite esencial se depositó como una sola gota en el centro de las placas. Se ensayaron tres dosis crecientes de aceite esencial (0,022; 0,044 y 0,088 µl/mL de espacio libre en la placa Petri) y un control sin aceite esencial. Se prepararon 5 repeticiones por estado fenológico, dosis y especie. Las placas Petri se sellaron con Parafilm y se incubaron a 25 °C en oscuridad. Al cabo de 7 días, se registró el porcentaje de germinación y la longitud de las plántulas. Se calculó el índice de germinación (IG) para cada especie, según la siguiente fórmula: $IG = G/Gc \times L/Lc$, donde G y Gc son los porcentajes de germinación en las placas tratadas y control, respectivamente, y L y Lc son las longitudes medias de las plántulas en las placas tratadas y control, respectivamente.

Debido a la falta de normalidad y homocedasticidad en los datos, el efecto del tratamiento con hidrolato sobre el IG de las semillas se analizó mediante la prueba no paramétrica Anova de Rangos Alineados de dos vías (AnovaRA), incluyendo en

interacción los factores: estado fenológico, dosis y especie. Se empleó el test de Tukey (HSD) a un nivel de significación $P < 0,05$ para comparar las medias. Todos los análisis se realizaron con el software estadístico R Core Team (2022).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se identificaron un total 103 compuestos en el análisis GC-MS, de los que 21 fueron considerados mayoritarios (porcentaje relativo $\geq 1\%$) en el aceite esencial. Estos componentes mayoritarios representaban el 57,95 y 60,20 % del total integrado en el análisis cromatográfico y sus porcentajes relativos se detallan en la Tabla 1. El grupo más

Tabla 1 - Composición química (%) del aceite esencial de *Cistus ladanifer* para las tres fechas de recolección

Compuestos	IR	Agosto	Octubre
α-Pinoeno	936	3,38	12,91
canfeno	951	0,63	1,36
p-Cimeno	1026	1,36	1,62
2,2,6-trimetilciclohexano	1037	2,39	1,16
α -Camfolenal	1126	0,72	1,08
L-trans-pinocarveol	1139	3,91	3,76
pinocarvone	1162	1,40	1,72
borneol	1166	1,12	0,87
terpinen-4-ol	1177	0,64	1,24
bornil acetato	1285	3,19	2,98
aloaromadendreno	1454	1,09	1,21
viridifloreno	1488	1,59	1,28
δ -Cadineno	1518	0,56	0,80
espatulenol	1570	1,47	1,27
viridiflorol	1585	20,38	15,97
ledol	1594	8,92	7,26
1-epi-cubenol	1621	0,93	0,82
β -eudesmol	1641	1,29	1,14
cadaleno	1668	1,31	0,94
15-nor-labdan-8-ol	1961	2,12	1,26
16-kaureno	2020	1,04	0,81
Total Representado (%)		57,95	60,20
Total Identificado (%)		78,63	80,61
Monoterpenos hidrocarbonados	7,85	19,08	
monoterpenos oxigenados	14,77	15,99	
Sesquiterpenos hidrocarbonados	8,99	8,55	
Sesquiterpenos oxigenados	35,63	28,69	
Diterpenos hidrocarbonados	1,04	0,81	
Otros	10,36	7,48	

Componentes mayoritarios ($> 1\%$) listados por orden de elución en una columna apolar HP-5; IR: índices de retención de Kovats relativos a n-alcenos en una columna apolar HP-5; valores $\geq 5\%$ en negrita.

representativo del aceite esencial fueron los sesquiterpenos oxigenados (35,63-28,69 %), mientras que los principales componentes del aceite esencial fueron viridiflorol (20,38-15,97 %), α -pinoeno (3,38-12,91%) y ledol (8,92-7,26 %). De este modo, comparando nuestros resultados con los obtenidos en otras zonas cercanas de España y Portugal, los principales compuestos identificados son similares a los encontrados en otros estudios (Xavier *et al.*, 2021; Pérez-Izquierdo *et al.*, 2023), pero las proporciones de cada uno de ellos difieren significativamente. Finalmente, la composición química varió considerablemente entre los estados fenológicos testados.

La Figura 1 muestra el efecto del aceite esencial de *C. ladanifer* sobre el índice de germinación de las semillas de *E. crus-galli*, arroz y tomate. El Anova-RA de tres vías para el índice de germinación mostró un efecto significativo ($P < 0,05$) en los tres factores analizados, pero no para la interacción entre ellos ($F_{4,72} = 1,03$; $P = 0,396$). El aumento de la dosis de aceite esencial provocó un descenso progresivo en el índice de germinación en las tres especies testadas, alcanzando una inhibición prácticamente total a la dosis más elevada (0,08 $\mu\text{l/ml}$). Sin embargo, a dosis medias y bajas (0,022 y 0,044 $\mu\text{l/ml}$), este efecto fitotóxico fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en *E. crus-galli* comparado con arroz y tomate. Finalmente, el aceite esencial de muestras recolectadas en octubre, el cual presentaba porcentajes más elevados de monoterpenos hidrocarbonados, mostró un efecto significativamente mayor ($F_{1,72} = 25,55$; $P < 0,001$) sobre el índice de germinación que aquel proveniente de la recolección en agosto.

En general, nuestros resultados concuerdan con los mostrados en estudios anteriores, los cuales también evaluaron el potencial del aceite esencial de *C. ladanifer* para inhibir la germinación de semillas y el crecimiento temprano de plántulas. Así, se han descrito previamente efectos fitotóxicos del aceite esencial de *C. ladanifer* sobre tomate (Benali *et al.*, 2020), rabanito (Pérez-Izquierdo *et al.*, 2022) y malas hierbas (Verdeguez *et al.*, 2012). Hasta donde sabemos, algunos estudios han demostrado que los sesquiterpenos oxigenados son los principales responsables de los efectos fitotóxicos de los aceites esenciales (Elshamy *et al.*, 2019), mientras que otros autores han encontrado que los monoterpenos también son compuestos biológicamente activos

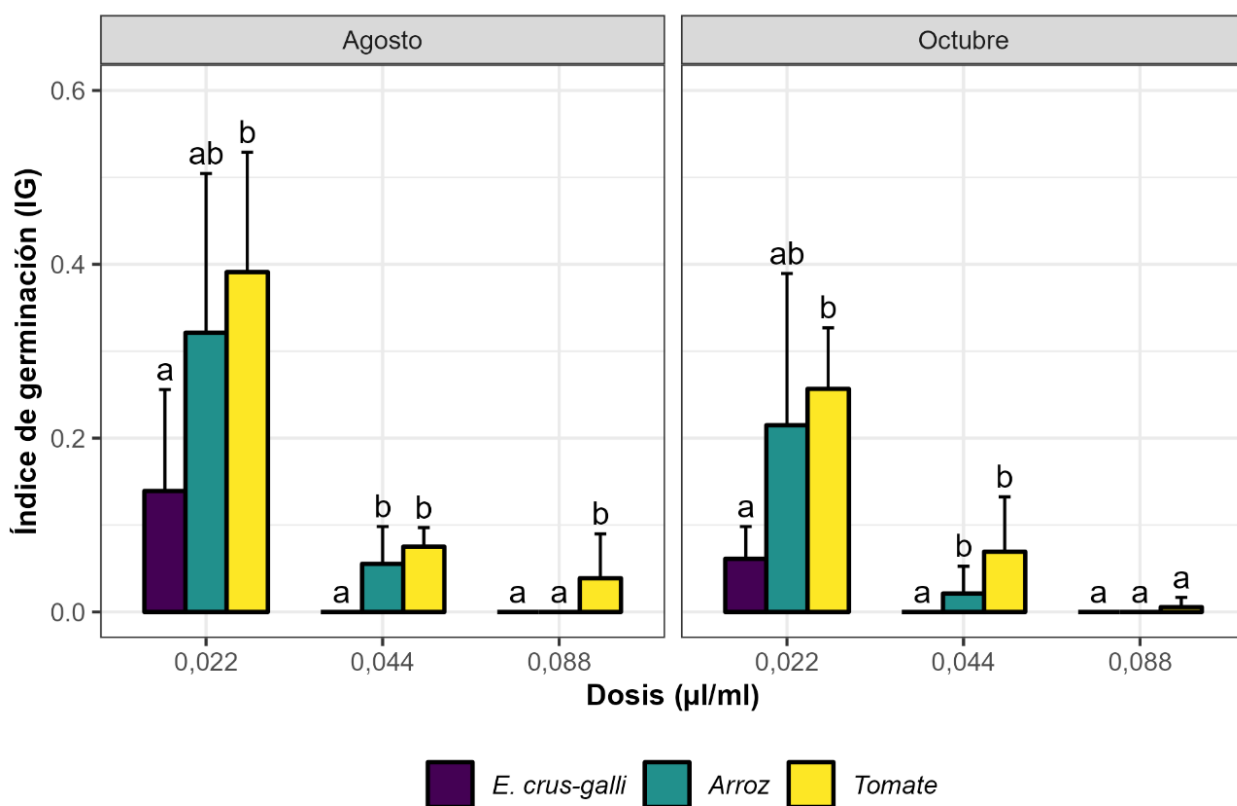


Figura 1 - Efecto de diferentes dosis (µl/ml) de aceite esencial de *Cistus ladanifer* extraído en dos fechas contrastadas sobre el índice de germinación de las semillas de *Echinochloa crus-galli*, arroz y tomate. Los valores se expresan como media ± sd (n = 5). Para cada fecha y dosis, letras diferentes indican diferencias significativas entre diferentes especies (AnovaRA seguido del test de Tukey (P<0,05)).

con potencial fitotóxico (Kordali *et al.*, 2007). En este sentido, es probable que el potencial efecto fitotóxico de los aceites esenciales no sea directamente atribuible a uno o varios compuestos principales, sino al efecto sinérgico o antagónico resultante de la interacción entre todos los compuestos presentes.

CONCLUSIONES

Los resultados derivados de este estudio muestran el elevado potencial del aceite esencial de *C. ladanifer* para su empleo como bioherbicida en agricultura. Además, estos resultados apuntan también al impacto que el estado fenológico puede tener, no sólo sobre la composición química, sino también sobre la actividad fitotóxica del aceite esencial y sus posibles aplicaciones industriales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Benali, T.; Bouyahya, A.; Habbadi, K.; Zengin, G.; Khabbach, A.; Achbani, E.H. & Hammani, K. (2020) - Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Cistus ladanifer* subsp. *ladanifer* and *Mentha suaveolens* against phytopathogenic bacteria and their ecofriendly management of phytopathogenic bacteria. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 28, art. 101696. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101696>
- Dayan, F.E. & Duke, S.O. (2014) - Natural Compounds as Next-Generation Herbicides. *Plant Physiology*, vol. 166, n. 3, p. 1090–1105. <https://doi.org/10.1104/pp.114.239061>
- Elshamy, A.I.; Abd-El Gawad, A.M.; El-Amier, Y.A.; Gendy, A.E.G.E. & Al-Rowaily, S.L. (2019) - Interspecific variation, antioxidant and allelopathic activity of the essential oil from three *Launaea* species growing naturally in heterogeneous habitats in Egypt. *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 34, p. 316–328. <https://doi.org/10.1002/ffj.3512>
- Frazão, D.F.; Raimundo, J.R.; Domingues, J.L.; Quintela-Sabarís, C.; Gonçalves, J.C. & Delgado, F. (2018) - *Cistus ladanifer* (Cistaceae): a natural resource in Mediterranean-type ecosystems. *Planta*, vol. 247, p. 289–300. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2825-2>
- Kordali, S.; Cakir, A. & Sutay, S. (2007) - Inhibitory Effects of Monoterpenes on Seed Germination and Seedling Growth. *Zeitschrift für Naturforschung C*, vol. 62, n. 3-4, p. 207–214. <https://doi.org/10.1515/znc-2007-3-409>
- Laosinwattana, C.; Wichittrakarn, P. & Teerarak, M. (2018) - Chemical composition and herbicidal action of essential oil from *Tagetes erecta* L. leaves. *Industrial Crops and Products*, vol. 126, p. 129–134.
- Pérez-Izquierdo, C.; Jordán Bueso, M.J.; Rodríguez-Molina, M. del C. & Pulido, F. (2023) - Spatial Variation in Yield, Chemical Composition, and Phytotoxic Activity of *Cistus ladanifer* Essential Oils. *Chemistry and Biodiversity*, vol. 20, n. 11, art. e202300995. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202300995>
- Pérez-Izquierdo, C.; Serrano-Pérez, P. & Rodríguez-Molina, M. del C. (2022) - Chemical composition, antifungal and phytotoxic activities of *Cistus ladanifer* L. essential oil and hydrolate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 45, art. 102527. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102527>
- Petroski, R.J. & Stanley, D.W. (2009) - Natural Compounds for Pest and Weed Control. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, n. 18, p. 8171–8179. <https://doi.org/10.1021/jf803828w>
- R Core Team (2022) - *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Verdeguer, M.; Blázquez, M.A. & Boira, H. (2012) - Chemical composition and herbicidal activity of the essential oil from a *Cistus ladanifer* L. population from Spain. *Natural Product Research*, vol. 26, n. 17, p. 1602–1609. <https://doi.org/10.1080/14786419.2011.592835>
- Xavier, V.; Finimundy, T.C.; Heleno, S.A.; Amaral, J.S.; Calhelha, R.C.; Vaz, J.; Pires, T.C.S.P.; Mediavilla, I.; Esteban, L.S.; Ferreira, I.C.F.R. & Barros, L. (2021) - Chemical and Bioactive Characterization of the Essential Oils Obtained from Three Mediterranean Plants. *Molecules*, vol. 26, n. 24, art. 7472. <https://doi.org/10.3390/molecules26247472>