VIGO · 8 - 10 octubre de 2019

XVII CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MALHERBOLOGÍA

LIBRO DE ACTAS

VIGO · 8 - 10 octubre de 2019

XVII CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MALHERBOLOGÍA

LIBRO DE ACTAS

En este libro se publican las comunicaciones presentadas al XVII Congreso de la Sociedad Española de Malherbología, celebrado en Vigo, entre los días 8 y 10 de octubre de 2019.

Título: Actas XVII Congreso de la Sociedad Española de Malherbología 2019
Editoras: Nuria Pedrol Bonjoch, Carolina González Puig
ISBN: 978-84-120734-3-0
Editorial: Linckia
Universidad de Vigo

XVII CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MALHERBOLOGÍA VIGO · 8 - 10 octubre SEMH 2019

COMITÉ ORGANIZADOR:

Coordinadora

Nuria Pedrol Bonjoch (Universidade de Vigo).

Secretaria

Carolina González Puig (Universidade de Vigo).

Miembros

Manuel J. Reigosa Roger, Adela M. Sánchez Moreiras, Luís González Rodríguez, Manuel Rey Fraile, Rogelio Santiago Carabelos, María Pardo Muras, X. Carlos Souto Otero, Emma Fernández Covelo, Purificación Marcet Miramontes, José María Sánchez Fernández, Luís Navarro Echeverría (Universidade de Vigo).
Pedro Revilla Temiño, Rosa Ana Malvar Pintos, Lorena Álvarez Iglesias, Bernardo Ordás López, Amando Ordás (Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Misión Biológica de Galicia).

Colaboradores

José Iglesias Rodríguez, Ana Canabal Abalo, Ana López Malvar.

COMITÉ CIENTÍFICO:

Joaquin Aibar (Universidad de Zaragoza), Fabrizio Araniti (Universitá de Reggio Calabria,Italia), Laura Armengot Martinez (Research Institute of Organic Agriculture - FiBL, Suiza), Fernando Bastida (Universidad de Huelva), Carlos Cavaleiro (Universidade de Coimbra, Portugal), Alicia Cirujeda (Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón - CITA), José Dorado (Instituto de Ciencias Agrarias - CSIC, Madrid), Diego Gómez de Barreda (Universitat Politècnica de València), Sebastián Guala (Universidad Nacional General Sarmiento, Argentina), Montserrat Jurado Expósito (Instituto de Agricultura Sostenible - IAS CSIC, Córdoba), Íñigo Loureiro (INIA, Madrid), Francisco Macías (Universidad de Cádiz), Ana Isabel Marí (Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón - CITA), Manuel J. Reigosa (Universidade de Vigo), Aritz Royo (Universitat de Lleida), Mercedes Royuela Hernando (Universidad Pública de Navarra), Ana Zabalza Aznárez (Universidad Pública de Navarra), Beatriz Cerqueira Cancelo (University of Aberdeen, Escocia), Verónica Asensio Fandiño (Universidade de São Paulo, Brasil), Andreu Taberner Palou (Universitat de Lleida), Joel Torra Farré (Universitat de Lleida), Helena Freitas (Universidade de Coimbra, Portugal).

ORGANIZAN

SEMh
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MALHERBOLOGIA

30 años SEMh

Universidade Vigo

MBG
MISIÓN BIOLÓGICA DE GALICIA

CITACA
Universidade Vigo

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

PATROCINAN

BAYER

FMC

syngenta

ADAMA

ASCENZA®

BASF
We create chemistry

CORTEVA™
agriscience
Agriculture Division of DowDuPont™

fts
AgroConsulting

BELCHIM
CROP PROTECTION

GALMEDIC
Material Médico y de Laboratorio

30 AÑOS
PHYTOMA

PAZO SEÑORANS
D.O. RÍAS BAIXAS

CONCELLO DE VIGO

XVII CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MALHERBOLOGÍA VIGO · 8 - 10 octubre SEMH 2019

ÍNDICE

CONFERENCIAS PLENARIAS

Modern Weed Science: Challenges, Research, and Management 17
NILDA R. BURGOS

The potential use of essentials oils and their constituents as bio-herbicides 17
FABRIZIO ARANITI

1989-2019: Logros de la SEMh y retos futuros 17
JORDI RECASENS

Las múltiples caras de una interacción planta-abejorro en Chile 17
RODRIGO MENDEL

COMUNICACIONES ORALES

Sesión 1: Control químico y resistencia a herbicidas

S1.O.01 Metabolismo aumentado a los herbicidas inhibidores de la ALS y las auxinas sintéticas en *Papaver rhoeas* 21
TORRA J, ROJANO-DELGADO A, MENENDEZ J, DE PRADO R, SALAS M

S1.O.02 Aptitud biológica de un biotipo de *Lolium rigidum* resistente a herbicidas inhibidores de la enzima acetolactato sintetasa 27
ESCORIAL MC, HORNOS Z, CHUECA MC, LOUREIRO I

S1.O.03 Resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS y ACCasa en poblaciones de *Leptochloa* spp. en arrozales de Extremadura 33
AMARO I, ROMANO Y, PALMERIN JA, QUILES JM, OSUNA MD

S1.O.04 Aproximación metabolómica para la mayor eficacia del glifosato tras su combinación con quinato en el control de *Amaranthus palmeri* 39
ZULET-GONZALEZ A, BARCO ANTOÑANZAS M, GIL-MONREAL M, SCHEEL D, GORZOLKA K, ZABALZA A, ROYUELA M

Sesión 2: Búsqueda de herbicidas con nuevos modos de acción

S2.O.01 Efecto herbicida, en condiciones controladas, de seis sustancias de origen natural 45
MONTULL JM, ARBONÉS A, RECASENS J

S2.O.02 Potencial bioherbicida de harmalina en el metabolismo de *Arabidopsis* 51
LÓPEZ-GONZÁLEZ D, ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ S,TEIJEIRA M, ARANITI F, REIGOSA MJ, SÁNCHEZ-MOREIRAS AM

S2.O.03 Potencial herbicida de aceites esenciales de plantas mediterráneas para el control de *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv 57
LLORENS JA, FÉRNANDEZ U, TORRES N, GÓMEZ DE BARREDA D, OSCA JM, SÁNCHEZ-MOREIRAS A, VERDEGUER M

S2.O.04 Aprendiendo de la amapola como asesina profesional 63
MUÑOZ-TRIVIÑO M, LIN Z, NOWACK M

Sesión 3: Manejo integrado

S3.O.01 ¿Reduce la rotación en el cultivo del arroz las infestaciones de *Echinochloa* spp.? Resultados de prospecciones en Aragón 67
PARDO G, MARÍ AI, AIBAR J, CIRUJEDA A

S3.O.02 Desarrollo y caracterización de acolchados biodegradables para el control de malas hierbas 73
MICO M, CLARAMUNT J, VERDÚ AMC, MAS MT

S3.O.03 Estudio del banco de semillas de malas hierbas presentes en dos agro-ecosistemas mediterráneos bajo condiciones edafo-climáticas distintas 78
GANDÍA ML, DEL MONTE JP, TENORIO JL, SANTÍN-MONTANYÁ MI

S3.O.04 Los musgos del olivar de Jaén: 1.-Influencia de factores agronómicos y ambientales sobre la cobertura y la riqueza de especies 84
RAMS S, ALCÁNTARA C, SAAVEDRA M

S3.O.05 Los musgos del olivar de Jaén: 2.-Influencia de factores agronómicos y ambientales sobre las especies más frecuentes 90
RAMS S, ALCÁNTARA C, SAAVEDRA M

Sesión 4: Estrategias eco-innovadoras

S4.O.01 Biomasa alelopática: aprovechando recursos agroforestales como herbicidas naturales 96
PARDO-MURAS M, PUIG CG, IGLESIAS-RODRÍGUEZ J, PEDROL N

S4.O.02 Efecto herbicida de diferentes compuestos orgánicos alternativos al glifosato para el control de *Conyza bonariensis* en viña 102
CABRERA C, VALENCIA-GREDILLA F, SALA A, SOLANS JR, RECASENS J

S4.O.03 Evaluación económica de acolchados biodegradables plásticos y papeles utilizados en cultivo de pimiento (*Capsicum annuum* L.) 108
MARÍ AI, PARDO G, CIRUJEDA A, MARTÍNEZ Y

S4.O.04 Sistemas de bajo coste para la reconstrucción tridimensional de plantas en estadio temprano 114
ANDÚJAR D, MARTÍNEZ-GUANTER J, RIBEIRO A, GERHARDS R, BENGOCHEA-GUEVARA JM, PETEINATOS G

S4.O.05 Estimación de la fecha óptima para cartografiar *Avena sterilis* L. en cultivos de trigo y cebada 120
PEÑA JM, FERNÁNDEZ-QUINTANILLA C, LIMA F, DORADO J

S4.O.06 Utilidad del jardín arvense para el estudio de la fenología de las malas hierbas y su aplicación en la agricultura 126
GÓMEZ-REGIFE Y, REBOLLO-VALERA M, SOUSA-ORTEGA C, URBANO JM

Sesión 5: Diversidad, estabilidad y servicios ecosistémicos

S5.O.01 Presencia de flora arvense en márgenes de campos recién instalados en una zona semiárida de Zaragoza 132
CIRUJEDA A, MARÍ AI, MURILLO S, PARDO G, AIBAR J

Sesión 6: Biología y manejo de especies invasoras

S6.O.01 Modelo bioeconómico para el control óptimo de la invasora *Zea mays* ssp. *mexicana ad. int.* en España 138
MARTÍNEZ Y, CIRUJEDA A, GÓMEZ MI, MARÍ AI, PARDO G

S6.O.02 ¿El efecto del fuego puede romper la latencia de las semillas de avena loca (*Avena sterilis ludoviciana* (Durieu) Nyman)? 144
GARNICA I, LEZÁUN JA, SEGURA A, GOÑI J

S6.O.03 ¿Deben los modelos de emergencia de *Lolium rigidum* adaptarse en función de las condiciones climáticas? 150
SOUSA-ORTEGA C, CHAMBER E, URBANO JM, IZQUIERDO J, ESCORIAL C, MARÍ-LEÓN AI, CORDERO F, VARGAS M, SAAVEDRA M, LEZÁUN JA, PARAMIO JA, FERNÁNDEZ JL, TORRA J, ROYO-ESNAL A

S6.O.04 Caracterización de las nuevas malas hierbas invasoras en Cataluña 156
LLENES JM, CONSOLA S, MONTULL JM, TABERNER A

PÓSTER

Sesión 1: Control químico y resistencia a herbicidas

S1.P.01 *Echinochloa* spp. en campos de arroz de Aragón y Navarra: Susceptibilidad actual a distintos tratamientos herbicidas en función de la especie y mutación 165
IBAÑEZ C, GARNICA I, MARÍ AI, CIRUJEDA A, ROMANO Y, OSUNA MD, PARDO G

S1.P.02 Mutaciones de lugar de acción presentes en poblaciones de *Lolium rigidum* resistentes a herbicidas inhibidores de la enzima acetolactato sintetasa 171
ESCORIAL MC, HORNOS Z, CHUECA MC, LOUREIRO I

S1.P.03 Potential basis of glyphosate resistance in *Lolium perenne* from Douro vineyards 177
MENDES A, PORTUGAL J, CALHA IM, ANDRADE E

S1.P.04 Estimación de las ocasiones favorables para realizar tratamientos herbicidas en cereales de invierno empleando datos meteorológicos. Aplicación en Aragón 183
SOLANO A, AIBAR J

S1.P.05 Resistencia a inhibidores de ALS en una población española de *Echinochloa cruss-galli* de un campo de maíz 189
TORRA J, MONTULL JM, ROYO-ESNAL A, TABERNER A, SALAS M

S1.P.06 Resistencias *Target site* en una población de *Amaranthus palmeri* con resistencia múltiple a Glifosato y a Piritiobac-Na. 195
BARCO-ANTOÑANZAS M, ZULET-GONZÁLEZ A, GIL-MONREAL M, ROYUELA M, ZABALZA A

Sesión 2: Búsqueda de herbicidas con nuevos modos de acción

S2.P.01 Norharmane, un alcaloide con potencial bioherbicida 201
LÓPEZ-GONZÁLEZ D, LEDO D, COSTAS-GIL A, GRAÑA E, REIGOSA MJ, SÁNCHEZ-MOREIRAS AM

S2.P.02 Estudio de la fitotoxicidad de diferentes herbicidas en el cultivo de la cebolla en siembra directa 207
GÓMEZ DE BARREDA FERRAZ D, MARTÍNEZ DESCALZO J, ROCHE TORRES A, DE LUCA FABRA V, VERDEGUER SANCHO M

S2.P.03 Acción fitotóxica de metabolitos secundarios de *Origanum vulgare* sobre *Arabidopsis thaliana* 213
CABEIRAS-FREIJANES L, REGUEIRA-MARCOS L, LAGO-DOPICO A, LÓPEZ-GONZÁLEZ D, REIGOSA MJ, VERDEGUER M, SÁNCHEZ-MOREIRAS AM

S2.P.04 Actividad herbicida de carvacrol sobre *Erigeron bonariensis, Erigeron canadensis* y *Portulaca oleracea* 219
MUÑOZ M, TORRES N, SALAMONE A, SÁNCHEZ-MOREIRAS A, VERDEGUER M

S2.P.05 Determinación de la actividad herbicida de *trans*-chalcona sobre la germinación de *Portulaca oleracea* L., *Amaranthus retroflexus* L., *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. y *Avena fatua* L. 225
TORRES N, VERDEGUER M, SÁNCHEZ-MOREIRAS A

Sesión 3: Manejo integrado

S3.P.01 Manejo, dinámica espacio-temporal y detección aérea de rodales de *Cynodon dactylon* en viñedos con cubierta vegetal 231
RECASENS J, CABRERA C, VALENCIA-GREDILLA F, DE CASTRO AI, ROYO-ESNAL A, TORRES-SÁNCHEZ J, CIVIT J, JIMÉNEZ-BRENES FM, LÓPEZ-GRANADOS, F

S3.P.02 Patrones de emergencia de 19 especies susceptibles de ser cubiertas vegetales en viñedos 237
CABRERA C, ROYO-ESNAL A

S3.P.03 Evaluación multi-criterio de tres estrategias de gestión de malas hierbas en sistemas cerealistas 243
FERNÁNDEZ-QUINTANILLA C, PEÑA JM, HERNAIZ P, DORADO J

S3.P.04 Supervivencia de rizomas y estolones de *Cynodon dactylon* en función de su estado vegetativo, tamaño y profundidad de enterramiento 249
VALENCIA-GREDILLA F, RECASENS J, ROYO-ESNAL A

S3.P.05 Is volunteer wheat a serious weed in annual winter wheat production? 254
BARROSO J, WUEST SB

S3.P.06 Residuos de raíces de *Vicia faba* L. para el control de malas hierbas 260
ÁLVAREZ-IGLESIAS L, SANTIAGO R, REVILLA P, PEDROL N

S3.P.07 Efecto de dos hidroacolchados en la emergencia de propágulos de cuatro especies arvenses y ruderales 266
MORALES I, MAS MT, VERDÚ AMC

S3.P.08 Diversidad y composición de la flora arvense según su manejo en campos de cítricos en la comarca de Camp de Túria (Valencia) 272
VERDEGUER M, MARTÍNEZ P, FERRIOL M

S3.P.09 Efecto de la aplicación de una enmienda orgánica sobre la eficacia de herbicidas y la producción en el cultivo del arroz 278
SANTÍN-MONTANYÁ MI, CONTRERAS JM, JIMÉNEZ-RUIZ J, PATIÑO-ROPERO MJ, SEVILLA-MORÁN B, SANDÍN-ESPAÑA P

S3.P.10 Proyecto IWMPRAISE: manejo integrado de malas hierbas, implementación práctica y soluciones para Europa 284
PEDRAZA V, GONZÁLEZ-ANDÚJAR JL, LEZÁUN JA, GARNICA I

Sesión 4: Estrategias eco-innovadoras

S4.P.01 Acolchado de aplicación líquida o hidroacolchados: primeros resultados sobre el control de malas hierbas en melocotoneros 290
BAQUERO R, PARDO G, MARÍ AI, AIBAR J, CIRUJEDA A

S4.P.02 Efecto fitotóxico de *Medicago* sp. sobre malas hierbas problemáticas en viñedo 296
VALENCIA-GREDILLA F, PEDROL N, IGLESIAS-RODRÍGUEZ J, CANABAL-ABALO A, SOUTO C, RECASENS J, PUIG CG

S4.P.03 Evaluación del intercultivo de pastos de verano y cultivos extensivos de invierno sobre el control de malas hierbas 302
LUNA IM, FERNÁNDEZ-QUINTANILLA C, PEÑA JM, DORADO J

S4.P.04 Determinación de la influencia de la trufa negra (*Tuber melanosporum* Vittad.) sobre la flora arvense asociada a los quemados de plantaciones truferas de la Comarca de la Ribagorza 308
BARRIUSO J, PASCUAL GIRÓN A, AIBAR J

S4.P.05 Uso de *Pilosella officinarum* como cubierta vegetal bajo las líneas de cultivo en viña ecológica 314
VALENCIA-GREDILLA F, FERNÁNDEZ-QUINTANILLA C, DORADO J, GUERRA JG, CABRERA C, RECASENS J

S4.P.06 "Humildad y fiereza en la misma pieza": uso del mastranzo (*Mentha suaveolens* Ehrh.) para control de malezas 320
IGLESIAS-RODRÍGUEZ J, PUIG CG, PARDO-MURAS M, PEDROL N

S4.P.07 La caracterización del estado final de las semillas contribuye a evaluar el potencial fitotóxico de los aceites esenciales 326
TORRES L, DÍAZ-VIZCAÍNO EA, RIGUEIRO A

S4.P.08 Mayor eficacia de aceites esenciales sobre la germinación de semillas de arvenses que de cultivadas 332
TORRES L, RIGUEIRO A, DÍAZ-VIZCAÍNO EA

S4.P.09 Utilización del jardín arvense para el estudio de las emergencias y sus aplicaciones para la agricultura 338
REBOLLO-VALERA M, GOMEZ REGIFE Y, SOUSA-ORTEGA C, URBANO JM

S4.P.10 Evaluación de métodos alternativos para el control de vegetación espontánea en márgenes de carreteras 344
MANSANET PEREA C, VARELA CASAL, N, ROMERO FRANCO R, FERNANDEZ LABRADA M, ILLERA VIVES M, LÓPEZ MOSQUERA ME

S4.P.11 ECOBREED: buscando variedades competitivas para el control de malas hierbas en la agricultura ecológica 350
VIEITES Y, HUSSAIN MI, SÁNCHEZ-MOREIRAS AM, REIGOSA MJ

S4.P.12 Ecophysiological plasticity in broad leaf weed *Rumex acetosa* under allelochemical stress 355
HUSSAIN MI, VIEITES Y, SÁNCHEZ-MOREIRAS AM, REIGOSA MJ

Sesión 5: **Diversidad, estabilidad y servicios ecosistémicos**

S5.P.01 Ni el número ni el peso: la medida adecuada de la abundancia de semillas para el cálculo de índices de diversidad es intermedia 361
BASTIDA F, GONZÁLEZ-ANDÚJAR JL

S5.P.02 Las semillas de malas hierbas acompañantes de la cosecha de cereal muestran respuesta funcional a los factores ambientales y de manejo agrícola 367
BARBA-RODRÍGUEZ A, GONZÁLEZ-ANDÚJAR JL, BASTIDA F

S5.P.03 Análisis funcional de la comunidad arvense presente en un viñedo mediterráneo según el sistema de manejo 373
GUERRA JG, CABELLO F, MARTÍN JM, CAMPOS D, FERNÁNDEZ-QUINTANILLA C, DORADO J

Sesión 6: **Biología y manejo de especies invasoras**

S6.P.01 Efecto de la longitud de las raíces de *Solanum elaeagonifolium* Cav. en su brotación 379
TOMAS J, MARÍ AI, PARDO G, CIRUJEDA A

S6.P.02 Desarrollo y validación de un modelo termal para describir la emergencia de *Lolium multiflorum* 385
PAGNONCELLI FDB, GONZALEZ-ANDUJAR JL, TREZZI MM, SALOMÃO HM, HARTMANN K

S6.P.03 Respuesta germinativa de distintas poblaciones de *Conyza bonariensis* a temperaturas constantes 391
VALENCIA-GREDILLA F, SUPICICHE ML, ROYO-ESNAL A

S6.P.04 Cruzabilidad entre maíz (*Zea mays*) y teosinte (*Zea mays* ssp. *mexicana* y *Zea mays* ssp. *parviglumis*) y caracterización morfológica de los híbridos obtenidos 396
ARIAS-MARTIN M, ESCORIAL MC, CHUECA MC, LOUREIRO I

S6.P.05 ¿Podemos implementar métodos eficaces para controlar la invasora *Acacia melanoxylon*? 402
RODRÍGUEZ J, LECHUGA-LAGO Y, GUISANDE-COLLAZO A, LORENZO P, GONZÁLEZ L

S6.P.06 Control y capacidad de rebrote de *Ailanthus altissima* 408
SOLER J, SOLER L, IZQUIERDO J, VILAMÚ J

ÍNDICE DE AUTORES 415

XVII CONGRESO DE MALHERBOLOGÍA

SEMH 2019

CONFERENCIAS PLENARIAS

Modern Weed Science: Challenges, Research, and Management

NILDA R. BURGOS

Presidenta de la International Weed Science Society. Department of Crop, Soil, and Environmental Sciences. University of Arkansas, USA

The potential use of essentials oils and their constituents as bio-herbicides

FABRIZIO ARANITI

Dipartimento AGRARIA, Università Mediterranea di Reggio Calabria, Italia

1989-2019: Logros de la SEMh y retos futuros

JORDI RECASENS

Grupo de Malherbología y Ecología Vegetal, Universitat de Lleida

Las múltiples caras de una interacción planta-abejorro en Chile

RODRIGO MENDEL

Departamento de Ecología, Universidad de Chile

XVII CONGRESO DE MALHERBOLOGÍA

SEMH 2019

COMUNICACIONES ORALES

Metabolismo aumentado a los herbicidas inhibidores de la ALS y las auxinas sintéticas en *Papaver rhoeas*

TORRA J[1]*, ROJANO-DELGADO A[2], MENENDEZ J[3], DE PRADO R[4], SALAS M[5]

[1] Agrotecnio, Universitat de Lleida, Lleida, SPAIN.
joel@hbj.udl.cat
[2, 4] Química Agrícola y Edafología, Universidad de Córdoba, Córdoba, SPAIN.
arakidonis@hotmail.com, qe1pramr@uco.es
[3] Ciencias Agroforestales, Universidad de Huelva, Huelva, SPAIN.
jmenend@uhu.es
[5] Corteva Agriscience™, Agriculture Division of DowDuPont™, Saint Quentin Yvelines, FRANCE.
maria.salas@corteva.com

Resumen: Las poblaciones de amapola (*Papaver rhoeas*) con resistencia múltiple a herbicidas inhibidores de la enzima acetolactato sintasa (ALS) y auxinas sintéticas (AS) son frecuentes en los cereales de invierno de España. Tanto mecanismos ligados al sitio de acción (diversas substituciones amino ácidas en la posición Pro197 del enzima) como no ligados al sitio de acción (NTSR), como el metabolismo aumentado, pueden contribuir a la resistencia a los inhibidores de la ALS. Por otro lado, la reducción en el transporte y el incremento en el metabolismo han sido citados como mecanismos responsables de la resistencia a AS en dos poblaciones, aunque su relación e importancia relativa como mecanismos NTSR aún no está clarificada. En este estudio, tres poblaciones más de *P. rhoeas* de cereales de invierno españoles con diferentes perfiles fueron analizadas en estudios de metabolismo para confirmar la presencia de este mecanismo tanto para los inhibidores de la ALS como para las AS. Los estudios de metabolismo de herbicidas se realizaron tanto para el 2,4-D (AS) como el imazamox (inhibidor de la ALS) mediante HPLC. En los dos casos se aplicaron los herbicidas a dosis de registro y se muestrearon por separado la parte aérea y las raíces de cada planta a las 96 y 168 horas después del tratamiento. Para el 2,4-D es estudiaron tres poblaciones, dos con resistencia múltiple a AS e inhibidores de la ALS, y una solo potencialmente resistente al 2,4-D. Para el imazamox se estudiaron cuatro poblaciones, tres con resistencia múltiple y una solo resistente a 2,4-D. Para los dos herbicidas se incluyó un estándar sensible conocido. Se confirmó la presencia de metabolismo aumentado a los dos modos de acción en tres poblaciones más resistentes de *P. rhoeas*, tanto en poblaciones con resistencia múltiple como en poblaciones solo con resistencia al 2,4-D. Se están llevando a cabo estudios de para entender el rol potencial de la familia enzimática del citocromo P450 en los mecanismos de degradación tanto de auxinas sintéticas como inhibidores de la ALS.

Palabras clave: Amapola, citocromo P450, inhibidor, mecanismo de resistencia fuera del sitio de acción

1. Introducción

En España se han seleccionando biotipos de amapola (*Papaver rhoeas* L.) resistentes a herbicidas como consecuencia del monocultivo de cereal y de una sistemática aplicación de herbicidas para su control. Además, son comunes las poblaciones con resistencia múltiple a herbicidas inhibidores de la enzima acetolactato sintasa (ALS) y auxinas sintéticas (AS) (Rey-Caballero et al., 2016; 2017; Torra et al., 2017). La resistencia de esta mala hierba a inhibidores de la ALS ha sido estudiada profundamente, y en diversos trabajos se han encontrado diferentes tipos de mutaciones en la posición Pro197 de la enzima ALS, además de evidencias de mecanismos no ligados al sitio de acción (Délye et al., 2011; Rey-Caballero et al., 2017). Al menos en una población española se constató la presencia de metabolismo aumentado como mecanismo de resistencia (Rey-Caballero et al., 2017). Por otro lado, por lo que a los mecanismos de resistencia al 2,4-D se refiere, una AS, en estudios previos se ha visto que las plantas resistentes de dos poblaciones no movilizan el herbicida de la misma manera que lo hacen los biotipos sensibles (Rey-Caballero et al., 2016) y que además presentan metabolismo aumentado por citocromo P450 (Torra et al., 2107).

Como hasta la fecha solo hay evidencias directas de metabolismo como mecanismo de resistencia a inhibidores de la ALS en una población de *P. rhoeas*, y en dos más, a AS, el objetivo de este trabajo es confirmar la presencia de este mecanismo a los dos modos de acción mediante estudios de metabolismo en más poblaciones de la especie con diferentes perfiles de resistencia.

2. Material y Métodos

2.1. Material vegetal. Se utilizaron seis poblaciones de amapola, una de ellas un estándar sensible (S-013). En el estudio con 2,4-D se utilizaron tres poblaciones con resistencia múltiple a inhibidores de la ALS y AS (R-114 y R-313) y una potencialmente resistente solo a AS (R-803). En el estudio con imazamox se utilizaron tres poblaciones con resistencia múltiple (R-114, R-213 y R-313), y una solo resistente a AS (R-703). La población sensible se usó en ambos estudios. Todos estos biotipos proceden de fincas comerciales de cereal localizados en la provincia de Lérida, excepto la R-313, que proviene de Burgos. A excepción de la población R-803, las demás han sido caracterizadas en estudios previos (Rey-Caballero et al., 2016; 2017; Torra et al., 2017).

2.2. Estudio de metabolismo al 2,4-D. La metodología empleada para llevar a cabo este ensayo fue la descrita por Torra et al. (2017). El 2,4-D (Esteron 60, 2,4-D al 60%, Dow) se aplicó a 600 g m.a. ha^{-1} (dosis de registro) y a dosis 0 (control). Las plantas control junto con las plantas tratadas (6 por tratamiento) fueron recolectadas a 96 y 168 horas después del tratamiento (HDT) y se almacenaron a -40ºC hasta su uso. El 2,4-D y los metabolitos fueron separados con una columna de cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HPLC) y se identificaron según tiempos de retención.

2.3. Estudio de metabolismo al imazamox. La metodología empleada para llevar a cabo este ensayo fue la descrita por Rojano-Delgado et al. (2014). El imazamox (Pulsar 40, imazamox al 40%, BASF) se aplicó a m.a. ha^{-1} (dosis de registro) y a dosis 0 (control). Las plantas control junto con las plantas tratadas fueron recolectadas a 96 y 168 HDT y se almacenaron a -40ºC hasta su posterior uso. El imazamox y sus metabolitos fueron identificados por cromatografía líquida con detector de diodos y se empleó una columna de cromatografía líquida de interacción hidrofílica para separar el herbicida y sus metabolitos.

2.4. Análisis estadístico. Los datos de los dos experimentos de metabolismo para el 2,4-D y el imazamox fueron analizados por separado. Se realizó un análisis de la varianza de cada herbicida para cada tiempo de muestreo y compuesto químico con el programa estadístico Sigmaplot 11.0, considerando un factor: las poblaciones de amapola, con cuatro niveles para el 2,4-D, y con cinco niveles para el imazamox. Ante la significación de los factores, se realizó una separación de medias mediante el test de Tukey ($P<0,05$).

3. Resultados y Discusión

3.1. Metabolismo al 2,4-D

Se detectaron metabolitos del 2,4-D en dos poblaciones de *P. rhoeas* adicionales (R-114 y R-313), respecto a estudios previos con resistencia múltiple a inhibidores de la ALS y a AS (Tabla 1).

Tabla 1. Cantidades de 2,4-D, sus metabolitos hidroxilados (2,3-D y 2,5-D) y su conjugado con un azúcar (MGlu) en μg g^{-1} de peso fresco por planta en cuatro poblaciones de *Papaver rhoeas* a las 96 y 168 HDT con el herbicida aplicado en post-emergencia a 600 g m.a. ha^{-1}. Detección por medio de HPLC en función de los tiempos de retención.

Tiempo (HDT)		Concentración de herbicida y metabolitos (μg g^{-1} de peso fresco por planta)							
		Hojas				Raíces			
	Población	2,4-D	2,3-D	2,5-D	MGlu	2,4-D	2,3-D	2,5-D	MGlu
96	S-013 (72)*	12.3 a	0.0 c	0.0 b	0.0 a	1.8 a	0.0 b	0.0 a	0.0 a
	R-803	10.6 b	0.0 c	0.0 b	0.0 a	1.2 b	0.0 b	0.0 a	0.0 a
	R-114	8.3 c	3.9 a	1.7 a	0.0 a	0.4 c	0.0 b	0.0 a	0.0 a
	R-313	9.8 b	3.3 b	0.1 b	0.0 a	0.0 d	0.7 a	0.0 a	0.0 a
168	S-013	10.2 b	0.0 b	0.0 c	0.0 a	3.6 a	0.0 b	0.0 b	0.0 a
	R-803	11.5 a	0.0 b	0.0 c	0.0 a	1.8 b	0.0 b	0.0 b	0.0 a
	R-114	0.0 c	9.8 a	4.2 a	0.0 a	0.0 c	0.1 b	0.0 b	0.0 a
	R-313	0.0 c	9.4 a	3.2 b	0.0 a	0.0 c	1.3 a	0.1 a	0.0 a

* Para esta población la evaluación se realizó a las 72 HDT.
Diferentes letras denotan diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones para un compuesto a un tiempo de muestreo mediante el test de Tukey.

Los metabolitos 2,3-D y 2,5-D se encontraron en las hojas ya a las 96 HDT en las dos poblaciones (R-114 y R-313). A las 168 HDT, ya no se detectó el herbicida en hojas, y en raíces, ya se detectaban los metabolitos en las dos poblaciones. En la población sensible (S-013) solo se detectó el herbicida y no se detectó ninguno de sus

metabolitos. En la población R-803, que era solo resistente a AS, no se detectaron indicios de metabolismo al 2,4-D. En este estudio no se detectó el conjugado del azúcar como en estudios anteriores, ya que en esos estudios solo se detectó cuando se aplicaba el 2,4-D a 2.400 g m.a. ha^{-1}, cuatro veces la dosis utilizada en el presente trabajo (Torra et al., 2017).

3.2. Metabolismo al imazamox

En el estudio de metabolismo al imazamox se detectó metabolismo diferencial en tres de las cuatro poblaciones resistentes de *P. rhoeas* estudiadas, dos con resistencia múltiple (R-213 y R-313) y la tercera (R-703) solo resistente a AS (Tabla 2). Estas tres poblaciones representan nuevos casos de poblaciones con metabolismo diferencial a imazamox.

Tabla 2. Cantidades de imazamox, su hidroxilado (MOH) y un conjugado con un azúcar (MGlu) en μg g^{-1} de peso fresco por planta en cinco poblaciones de *Papaver rhoeas* a las 96 y 168 HDT con el herbicida aplicado en post-emergencia a 50 g m.a. ha^{-1}. Detección por medio de HPLC en función de los tiempos de retención.

		Concentración de herbicida y metabolitos (μg g^{-1} de peso fresco por planta)					
Tiempo		Hojas			Raíces		
(HDT)	Población	Imazamox	MOH	MGlu	Imazamox	MOH	MGlu
96	S-013	78.3 a	0.0 c	0.0 b	30.0 a	0.0 b	0.0 a
	R-213	39.5 c	0.0 c	0.0 b	3.9 c	0.0 b	0.0 a
	R-313	22.4 e	20.2 a	1.2 a	0.0 e	3.5 a	0.0 a
	R-114	30.0 d	0.0 c	0.0 b	0.9 d	0.0 b	0.0 a
	R-703	43.4 b	0.9 b	0.0 b	8.1 b	0.0 b	0.0 a
168	S-013	54.8 a	0.0 d	0.0 c	58.0 a	0.0 c	0.0 b
	R-213	32.0 b	2.8 b	0.8 b	9.4 c	1.0 b	0.0 b
	R-313	5.2 d	24.5 a	10.6 a	1.0 e	3.9 a	5.0 a
	R-114	29.5 c	0.0 d	0.0 c	3.0 d	0.0 c	0.0 b
	R-703	31.4 b	1.2 c	0.0 c	21.0 b	0.0 c	0.0 b

Diferentes letras denotan diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones para un compuesto a un tiempo de muestreo mediante el test de Tukey.

En la parte foliar, ya se detectaba el hidroxilado a las 96 HDT en dos poblaciones (R-313 y R-703), mientras que a las 168 HDT se detectaba además en la población R-213. El conjugado con azúcar se detectó a las 96 HDT en la población R-313, y a las 168 HDT también en la población R-213. En raíces, el hidroxilado se detectó a las 96 HDT en la población R-313, mientras que a las 168 HDT, se detectó también en la R-213. El conjugado solo se detectó a las 168 HDT en la población R-313. En la población R-703 que era solo resistente a AS no se detectó el conjugado con azúcar. En la población sensible (S-013) solo se detectó el imazamox y nunca ninguno de sus productos de degradación.

Estos resultados indican que más poblaciones de *P. rhoeas*, además de las estudiadas hasta la fecha, con diferentes perfiles de resistencia (múltiple o solo a AS) y diferentes ritmos de detoxificación presentan un incremento en el metabolismo tanto a las AS como a inhibidores de la ALS como mecanismo de resistencia. Las poblaciones

R-114 y R-313 (resistencia múltiple) son dos nuevos casos de metabolismo diferencial al 2,4-D, y esas dos junto a la población R-703 (resistente solo a AS), nuevos casos de metabolismo diferencial al imazamox. Los metabolitos encontrados parecen indicar que el complejo enzimático P450 sería el responsable de la degradación de los dos herbicidas, 2,4-D e imazamox, aún siendo de dos modos de acción diferentes. Además, para el imazamox, también parece estar involucrada un enzima glicosiltransferasa (GS) en el conjugado con azúcar. Este tipo de metabolito también se ha descrito en estudios previos (Torra et al., 2017) para algunas de las poblaciones utilizadas en el presente trabajo. Una hipótesis podría ser que los productos de la reacción catalizada por el P450 serían posteriormente conjugados con un azúcar por la GS. Estas dos familias enzimáticas, junto con la glutatión-S-transferasa, son las principales responsables de la degradación de xenobióticos en plantas (Yuan et al., 2007). Hay que destacar que en este estudio la población R-313 presentaba metabolismo tanto a AS como inhibidores de la ALS, como también se ha confirmado para las poblaciones R-703 y R-213 entre este estudio y otros anteriores (Torra et al., 2017). Se desconoce si el citocromo P450 responsable de la degradación de los dos modos de acción es el mismo. En futuros estudios se pretende confirmar el rol de estos enzimas en el mecanismo de resistencia por metabolismo a inhibidores de la ALS y AS y elucidar si los enzimas implicados pudieran ser los mismos.

4. Conclusiones

Los datos de este estudio confirman la presencia de metabolismo como mecanismo de resistencia en más poblaciones de *Papaver rhoeas* con diferentes perfiles de resistencia a inhibidores de la ALS y/o AS.

5. Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por la empresa DuPont de Nemours SA.

Referencias

DÉLYE C, PERNIN F & SCARABEL L (2011). Evolution and diversity of the mechanisms endowing resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase (ALS) in corn poppy (*Papaver rhoeas* L.). *Plant Science* **180**, 333-342.

REY-CABALLERO J, MENÉNDEZ J, OSUNA MD, SALAS M & TORRA J (2017). Target-site and Non-target-site resistance mechanisms to ALS inhibiting herbicides in *Papaver rhoeas*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **138**, 57-65.

REY-CABALLERO J, MENENDEZ J, GINE-BORDONABA J, SALAS M, ALCÁNTARA R & TORRA J (2016). Unravelling the resistance mechanisms to 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) in corn poppy (*Papaver rhoeas*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **133**, 67-72.

ROJANO-DELGADO AM, PRIEGO-CAPOTE F, DE PRADO R & LUQUE DE CASTRO MD (2014). Ultrasound-assisted Extraction with LC–TOF/MS Identification and LC–UV Determination of Imazamox and its Metabolites in Leaves of Wheat Plants. *Phytochemical Analysis* **25**, 357–363.

TORRA J, ROJANO-DELGADO AM, REY-CABALLERO J, ROYO-ESNAL A, SALAS M & DE PRADO R (2017). Enhanced 2,4-D metabolism in two resistant *Papaver rhoeas* populations from Spain. *Frontiers in Plant Science* **8**, 1584.

YUAN JS, TRANEL PJ & STEWART CN (2007). Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends in Plant Science* **12**, 6–13.

Enhanced metabolism to ALS inhibitors and synthetic auxin herbicides in *Papaver rhoeas*

Summary: Corn poppy (*Papaver rhoeas*) populations multiple resistant to acetolactate synthase (ALS) inhibiting herbicides and synthetic auxin herbicides (SAH) are common in Spanish winter cereal fields. Both target-site (several amino acid substitutions in position 197 of the enzyme) and non-target site resistant (NTSR) mechanisms can contribute to resistance to ALS inhibitors, because metabolites have been found in at least one population. On the other hand, impaired transport and enhanced metabolism have been reported as responsible for resistance to SAH in two populations, though their relationship and relative importance as NTSR mechanism is not yet understood. In this study, three more *P. rhoeas* populations from Spanish winter cereal fields with different resistance profiles were analyzed in metabolism studies to further confirm the presence of this mechanism both for ALS inhibitors and SAH. Metabolism studies were carried out by means of HPLC both for 2,4-D (SAH) and imazamox (ALS inhibitor). In both cases, herbicides were applied at field rates and aerial parts and roots were sampled from each plant at 96 and 168 hours after treatments. For 2,4-D three populations were researched, two multiple resistant to ALS inhibitors and SAH and one potentially only SAH resistant. For imazamox four populations were researched, three multiple resistant and one only resistant to 2,4-D. For both herbicides a susceptible standard population was included. The presence of enhanced metabolism to both modes of action was confirmed in three more herbicide resistant *P. rhoeas* populations, whether multiple resistant or only resistant to SAH. Moreover, additional studies are under way to understand the potential role of cytochrome P450 in the degradation routes both for SAH and ALS inhibiting herbicides.

Keywords: Cytochrome P450, corn poppy, inhibitor, non-target site resistant mechanism.

Aptitud biológica de un biotipo de *Lolium rigidum* resistente a herbicidas inhibidores de la enzima acetolactato sintetasa

ESCORIAL MC, HORNOS Z, CHUECA MC, LOUREIRO I

Dpto. Protección Vegetal. INIA. Ctra. La Coruña Km.7,5 28040 Madrid, ESPAÑA.
escorial@inia.es, zeus.hornos@inia.es, chueca@inia.es, loureiro@inia.es

Resumen: Se ha evaluado si existe alguna asociación entre la presencia de la mutación de sitio de acción $Trp_{574}Leu$ en un biotipo de *Lolium rigidum* resistente a herbicidas inhibidores del enzima acetolactato sintetasa (ALS) y la posible variación en su aptitud biológica. El estudio se ha realizado durante 3 años con el biotipo resistente (plantas homocigotas para la mutación, RR) y sensible (plantas sin la mutación, SS) con un fondo genético similar ya que fueron seleccionados a partir de la misma población procedente de campo. Además, se han obtenido plantas heterocigotas (RS y SR) mediante cruzamiento en invernadero entre ambos biotipos. Se ha estudiado el efecto de la mutación sobre el número de tallos reproductivos y el peso de las plantas, y sobre producción y el peso de la semilla. A excepción del peso de la semilla, los valores medidos aumentan significativamente para el resto de parámetros cuando la mutación$Trp_{574}Leu$ está presente en homocigosis. Esta mutación es capaz de aumentar, en ausencia de herbicida, la aptitud biológica de las plantas resistentes en relación a las plantas sensibles carentes de la mutación y procedentes de la misma población.

Palabras clave: resistencia a herbicidas, ALS, mutación $Trp_{574}Leu$, vallico, *fitness*.

1. Introducción

El *fitness* o aptitud biológica se puede definir como la capacidad de establecerse, sobrevivir y reproducirse con éxito en un entorno determinado. Los primeros casos de resistencia a herbicidas, estudiados en biotipos de malas hierbas resistentes a atrazinas, se asociaron con una menor aptitud relativa de las plantas resistentes en relación a las sensibles en ausencia de herbicidas (Holt & Thill, 1994). Estos resultados contribuyeron a la idea generalizada de que cualquier nueva mutación que confiera resistencia a los herbicidas conllevaría efectos pleiotrópicos deletéreos en ausencia de herbicida, también conocidos como costes en la aptitud biológica de las plantas resistentes. Sin embargo, las poblaciones de malas hierbas resistentes no siempre muestran estos costes en campo y cada vez es más evidente que el impacto de la resistencia en el *fitness* puede variar según las especies, el mecanismo de resistencia y el ambiente (Vila-Aiub *et al.*, 2009).

Lolium rigidum Gaud. es la gramínea más frecuente y perjudicial en los cereales de invierno en España. Las infestaciones de *L. rigidum* se tratan frecuentemente con herbicidas y existen poblaciones que han desarrollado resistencia a los herbicidas que contienen ingredientes activos de los grupos A, B y C2 (CPRH, 2015). La mutación en el aminoácido triptófano en la posición 574 (Trp_{574}) del enzima acetolactato sintetasa (ALS) es, con la mutación en la prolina en posición 197 (Pro_{197}), una de las mutaciones más frecuentes en las poblaciones resistentes a herbicidas inhibidores de ALS (grupo B). Aunque en algunos estudios se ha detectado un coste de aptitud para la resistencia a inhibidores de ALS, numerosos otros no detectan ningún tipo de coste (Vila-Aiub *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010). Por tanto, es necesario conocer las consecuencias que puede tener la resistencia sobre el *fitness*, lo que puede tener implicaciones en la evolución y propagación de la resistencia, así como en el desarrollo de estrategias eficaces de control.

El objetivo de este estudio es determinar si una mutación de sitio de acción en Trp_{574} presente en un biotipo *L. rigidum* puede tener, en ausencia de herbicida, efectos pleiotrópicos sobre el *fitness* vegetativo y reproductivo en relación a las plantas carentes de la mutación procedentes de la misma población.

2. Material y Métodos

2.1. Material vegetal. Se han utilizado plantas de *L. rigidum* población 128 (número de referencia colección laboratorio Malherbología del INIA). Este biotipo se recogió en un campo de cereal de la provincia de Zamora y es resistente a herbicidas inhibidores de ALS. Se ha empleado la población 314 de *L. rigidum* como referencia sensible a los herbicidas empleados.

2.2. Selección de fenotipos y caracterización de genotipos. En 2010, se sembraron semillas de las poblaciones 314 y 128 de *L. rigidum*, se germinaron y se llevaron a plántula. En el caso de la población 128, cuando las plántulas tenían 3 hijuelos, éstos se separaron, se trasplantaron, se identificaron y se dejaron crecer durante una semana. Transcurrido este tiempo, un clon de cada planta se dejó como control, otro se pulverizó con 15 g m.a. ha^{-1} de clorsulfuron 75% (Glean®, DuPont) y otro con 50 g m.a. ha^{-1} de imazamox 4% (Pulsar®, BASF). Los tratamientos se realizaron con un pulverizador automático (Devries Manufacturing, Hollandale, EEUU) equipado con una boquilla plana Teejet 8002-E calibrado para pulverizar 175 $L.ha.^{-1}$ a 130 kPa. A las tres semanas de los tratamientos, cuando los herbicidas habían hecho su efecto en una población sensible incluida como control, se identificaron fenotipos sensibles y resistentes a imidazolinonas. Estos ensayos se realizaron en cámara con un fotoperíodo de 16 horas de luz (250-300 $\mu E\ m^{-2}s^{-1}$ PAR) a 22±1°C y 8 de oscuridad a 16±1°C. Se secuenció la ALS y se identificó la mutación que confiere la resistencia, que presenta polimorfismo en una base que cambiaba el aminoácido triptófano en posición 574 (TGG) en la proteína sensible por leucina (Leu, TTG). Se caracterizaron individuos resistentes portadores de la mutación Trp_{574} en homocigosis (RR), en heterocigosis (RS) e individuos sensibles silvestres sin la

mutación (SS), mediante la técnica de dCAPs (*derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*) y utilizando los cebadores y las condiciones descritas por Délye *et al.* (2009).

2.3. Obtención de sub-poblaciones. Diez plantas de *L. rigidum* caracterizadas como SS y 10 mutantes homocigóticas RR se seleccionaron como plantas madre para crear las sub-poblaciones SS y RR, respectivamente. Para crear la sub-población heterocigota se cruzaron 5 plantas RR con 5 SS. . Los cruzamientos se realizaron en compartimentos separados en invernadero y aislando las plantas con doble visillo para evitar contaminación por polen no deseado. Se recolectó la semilla madura de todas las plantas de cada sub-población, que se almacenó a 4ºC hasta su utilización. El genotipo heterocigoto para la mutación se diferenció en RS y SR en función de las plantas maternas. Puesto que las sub-poblaciones proceden de la misma población original, compartían un fondo genético.

2.4. Análisis de la aptitud biológica. Se analizaron parámetros relacionados con el crecimiento vegetativo y reproductivo de 10 plantas de cada sub-población SS, RR, SR y RS durante 2013, 2014 y 2015. Estas plantas se cultivaron en un jaulón al aire libre en el INIA (40º 28´N; 3º 45´O). En el momento de la floración y puesto que *L. rigidum* es una especie alógama, cada planta se cruzó con una planta SS con objeto de producir semilla. Los genotipos SS y RR se cruzaron además con otras 10 plantas RR homocigotas. Una vez finalizada la polinización cruzada, se contó para cada planta el número de tallos con espiga y se embolsaron las espigas de cada planta. Una vez maduras, se determinó su biomasa vegetativa. Se trillaron manualmente las semillas de las espigas, se contó el número total de semillas producidas por planta y se determinó el peso por semilla para cada planta.

2.5. Análisis estadístico. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial para evaluar el efecto de los factores genotipo y año, así como de su posible interacción, sobre los parámetros evaluados de *fitness* vegetativo y reproductivo. Se utilizó el test de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls (SNK, P=0,05) para detectar diferencias entre las medias para ambos factores. La correlación entre los parámetros vegetativos y reproductivos se evaluó mediante el coeficiente de correlación lineal de Pearson (r).

3. Resultados y Discusión

En el caso de los parámetros que afectan al *fitness* vegetativo de las plantas, existen diferencias significativas entre los genotipos estudiados para la producción de tallos (Tabla 1). El genotipo RR homocigoto para la mutación en Trp_{574} produjo mayor número de tallos por planta (12,7) que los SS, SR y RS que no se diferenciaron entre sí para este parámetro (8,7 tallos por planta para el genotipo SS y 9,6 para los genotipos heterocigotos SR y RS) (Figura 1A). El factor año fue significativo en la producción de tallos por planta, que fue menor en 2014 que en 2013 y 2015, que no fueron diferentes entre sí. La interacción entre los factores año y genotipo no fue significativa (Tabla 1). Existen

diferencias significativas entre genotipos para el peso seco de las plantas, que fue mayor para las plantas del genotipo RR (Figura 1B). Ambos parámetros, nº de tallos y peso seco están correlacionados (r=0,65). El año de crecimiento afectó al peso seco de las plantas, mientras que la interacción entre los factores años y genotipo no fue significativa (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen del ANOVA multifactorial para evaluar el efecto de los factores genotipo y año, así como de su interacción, sobre los parámetros de *fitness* vegetativo (producción de tallos y peso seco) y reproductivo (producción de semilla y peso de la semilla). * P<0,05.

		Producción de tallos		Peso seco por planta	
Factor	gl	F	*P*	F	*P*
Genotipo (G)	3	6,29	0,0001*	9,89	0,0192*
Año (A)	2	20,13	0,0006*	4,10	0,0001*
G x A	6	1,62	0,1476	1,83	0,1001
		Producción de semilla		Peso semilla	
	gl	F	*P*	F	*P*
Cruzamiento (C)	5	4,74	0,0005*	3,05	0,0125*
Año (A)	2	8,83	0,0003*	2,33	0,1016
G x A	10	0,41	0,9392	3,57	0,0004*

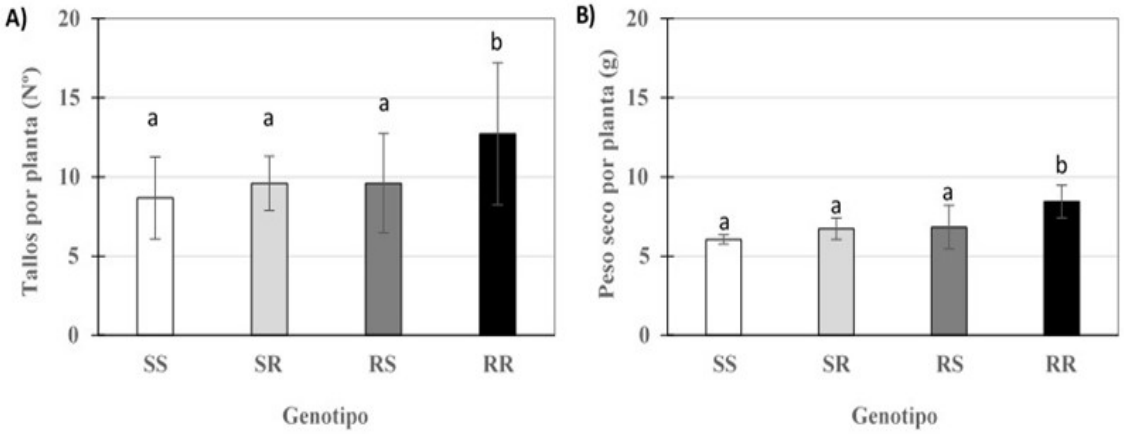


Figura 1. Parámetros relacionados con el *fitness* vegetativo: producción de tallos reproductivos por planta (A) y peso seco por planta (B), para los genotipos homocigotos para la mutación $Trp_{574}Leu$ (RR), heterocigotos (RS y SR) y silvestre carente de la mutacion (SS). Letras iguales indican promedios iguales entre genotipos para los tres años de ensayo, según la prueba de SNK, P=0.05.

Se evaluó la producción de semilla de los genotipos SS y RR cruzados con plantas de su mismo genotipo (SSxSS y RRxRR) o entre sí (SSxRR y RRxSS), y de los heterocigotos cruzados con el sensible (SRxSS y RSxSS). La producción de semilla fue significativamente diferente en los cruzamientos realizados (Tabla 1). El menor número de semilla, con un promedio de 304 semillas por planta para los 3 años, se obtuvo para el cruzamiento de plantas SS entre sí. Este dato no fue significativamente diferente del obtenido para el resto de cruzamientos en los que estaba implicado el genotipo SS, pero si fue menor que las 547 semillas por planta obtenidas en el cruzamiento de plantas RR entre sí (Figura 2A). El año de cruzamiento influyó en la producción de semilla (Tabla 1). En 2014 se produjo menor número de semillas por planta (296) que en 2013 y 2015 (460 y 464, respectivamente). No hay interacción entre los factores año y genotipo. Para el parámetro peso por semilla para cada genotipo (Figura 2B), no existen diferencia significativas entre años, sí entre los cruzamientos entre genotipos (Tabla 1). La interacción entre los dos factores fue significativa. La interacción muestra que el año afectó de forma diferente a la producción de semilla, con menor producción en 2014 para todos los cruzamientos menos para el RR x RR.

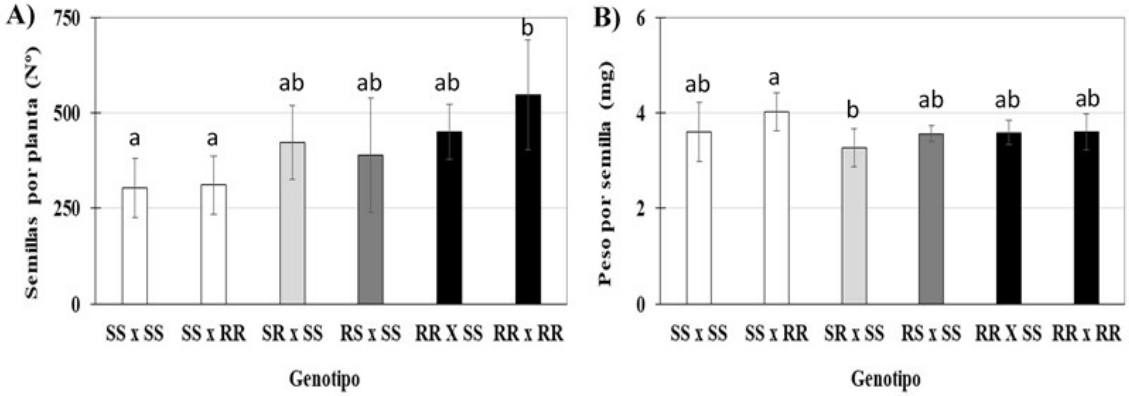


Figura 2. Parámetros relacionados con el *fitness* reproductivo de las plantas: nº de semillas por planta (A) y peso por semilla (B), para los genotipos homocigoto para la mutación $Trp_{574}Leu$ (RR) y sensible carente de mutación, cruzados con plantas de su mismo genotipo (SSxSS y RRxRR), entre sí (SSxRR y RRxSS), y para los genotipos heterocigotos cruzados con el sensible (SRxSS y RSxSS). Letras iguales indican promedios iguales entre genotipos para los tres años de ensayo, SNK, P=0.05.

La mutación $Trp_{574}Leu$ se ha asociado con un fuerte efecto pleiotrópico en el crecimiento de plantas resistentes en otras especies como *Amaranthus powellii* (Tardif *et al.*, 2006), si bien este efecto no se ha descrito para esta mutación en *L. rigidum*, ni en la funcionalidad de la enzima ALS ni en el crecimiento de plantas en invernadero (Yu *et al.*, 2010). En nuestro estudio de un biotipo *L. rigidum*, esta mutación no está asociada con costes en la aptitud biológica con respecto a la producción de tallos reproductivos, biomasa y producción de semilla en condiciones no competitivas. Además, los resultados muestran que cuando la mutación $Trp_{574}Leu$ que se encuentra en homocigosis, los valores de los parámetros de *fitness* evaluados son mayores que los del biotipo carente de la mutación y que comparte fondo genético con el resistente. Este incremento del *fitness* se ha detectado en otras especies de malas hierbas como en un biotipo de *Setaria italica* resistente al herbicida setoxidim inhibidor del enzima acetil-CoA carboxilasa (ACCasa)

(Wang *et al.*, 2010). Este factor ha podido y puede contribuir a una rápida evolución y dispersión de la resistencia, con las subsecuentes implicaciones para la sostenibilidad agrícola.

Referencias

CPRH, Comité Prevención Resistencia Herbicidas (2015) Resistencia a los herbicidas. *Lolium rigidum* (vallico) ¿Cómo manejar una población de vallico (*Lolium rigidum*) resistente en cereal de invierno?. http://semh.net/wp-content/uploads/2016/01/Ficha-Lolium-CPRH-definitiva.pdf

DÉLYE C, BOUCANSAUD K, PERNIN & V LE CORRE (2009) Variation in the gene encoding acetolactate-synthase in *Lolium* species and proactive detection of mutant, herbicide-resistant alleles. Weed Research **49**, 226-236.

HOLT JS & THILL DC (1994) Growth and productivity of resistant plants. In: *Herbicide Resistance in Plants. Biology and Biochemistry* (eds SB Powles & JAM Holtum), 299-316. Lewis Publishers, USA.

TARDIF FJ, RAJCAN I & COSTEA MA (2006) A mutation in the herbicide target site acetohydroxyacid synthase produces morphological and structural alterations and reduces *fitness* in *Amaranthus powellii*. New Phytologist **169**,251-64.

VILA-AIUB MM, NEVE P & POWLES SB (2009) *Fitness* costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. New Phytologist **184**, 751-767.

YU Q, HAN H, VILA-AIUB MM & POWLES SB (2010) AHAS herbicide resistance endowing mutations: effect on AHAS functionality and plant growth. Journal of Experimental Botany **61**, 3925-3934.

WANG T, PICARD JC, TIAN X & DARMENCY H (2010).A herbicide- resistant ACCase 1781 *Setaria* mutant shows higher *fitness* than wild type. Heredity **105**, 394-400.

Fitness of a *Lolium rigidum* biotype resistant to acetolactate synthase inhibitor herbicides

Summary: We have evaluated whether the presence of the Trp_{574}Leu target site mutation present in *Lolium rigidum* biotype resistant to acetolactate synthase (ALS) herbicide inhibitors is associated with any variation in the *fitness*. This 3-year study was conducted using homozygous plants for the mutation (RR) and non-mutated plants (SS), selected from the same field population in order to obtain resistant and sensitive biotypes with a similar genetic background. In addition, heterozygous plants (RS and SR) were obtained by crossing both biotypes in the greenhouse. We studied the effect of the mutation on the number of reproductive tillers, plant weight, seed production and seed weight. Except for the seed weight, the values of the measured parameters were significantly higher when Trp574Leu mutation is in homozygosis. This mutation can increase the *fitness* of the resistant plants, in the absence of herbicide, in relation to the non-mutated plants of the same population.

Keywords: Herbicide resistance, ALS, Trp_{574}Leu mutation, rigid ryegrass, *fitness*.

Resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS y ACCasa en poblaciones de *Leptochloa* spp. en arrozales de Extremadura

AMARO I[1], ROMANO Y[1], PALMERIN JA[2], QUILES JM[3], OSUNA MD[1a]

[1]Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), Guadajira (Badajoz);
[a]*mariadolores.osuna@juntaex.es*
[2]Servicio de Sanidad Vegetal (Junta de Extremadura), Don Benito (Badajoz)
[3]Servicio de Producción Agraria (Junta de Extremadura), Mérida (Badajoz)

Resumen: El género *Leptochloa* incluye especies de malas hierbas muy problemáticas en el cultivo del arroz. En la actualidad, los herbicidas autorizados en España para controlar esta mala hierba en arroz pertenecen, principalmente, a 2 modos de acción: inhibidores de la ALS (acetolactato sintasa) e inhibidores de la ACCasa (acetil coenzima A carboxilasa). El uso repetido y continuado de estos herbicidas puede conllevar la aparición de resistencias. En este trabajo se realizaron prospecciones de *Leptochloa* spp. durante varios años en arrozales de Extremadura donde existían fallos de control utilizando herbicidas autorizados. De las 42 poblaciones estudiadas, se ha confirmado en laboratorio distintos tipos de mutaciones en las secuencias en ambas enzimas (ALS y ACCasa). En ALS la mutación predominante fue Pro197Ser, mientras que en ACCasa fue Ile1781Leu. Asimismo, se detectaron poblaciones con mutaciones en los dos genes. A la vista de las mutaciones encontradas, se aconseja un control integrado de malas hierbas (CIM) utilizando, además de los herbicidas disponibles, técnicas alternativas para evitar el incremento de biotipos resistentes en la región.

Palabras clave: *Leptochloa*, arroz, resistencia, mutación, ALS, ACCasa, sitio de acción, control integrado de malas hierbas.

1. Introducción

El arroz es un cultivo fundamental y un alimento básico en todo el mundo. En España, Extremadura es la segunda comunidad de mayor producción de arroz después de Andalucía. Según (MAPAMA 2018), Extremadura tuvo una superficie cultivada de 24,700 ha y una producción de 175,000 toneladas en 2017. Debido a la importancia de este cultivo, existe una preocupación creciente sobre el control de malas hierbas, ya que éstas constituyen un problema serio en cuanto a la producción de los campos de arroz (*Oryza sativa* L.) de todo el mundo (OSCA 2013, SAITO 2010). En este sentido, se sabe que las malas hierbas pertenecientes a la familia de las gramíneas reducen el rendimiento del arroz más que las malas hierbas de hoja ancha o la juncia (SMITH 1988).

Una gramínea que reduce considerablemente la producción de este cultivo en Extremadura es el género *Leptochloa.* Éstas, son plantas anuales de primavera muy comunes en América y Asia (TEHRANCHIAN ET AL. 2016), pero no fue hasta los años 80 cuando se detectaron por primera vez en España dentro de Extremadura. La primera especie descrita en esta región fue *Leptochloa fascicularis*, siendo una de las gramíneas de arroz más dañinas (SAAVEDRA ET AL. 1995, SMITH 1988). De las especies de *Leptochloa* que aparecen en el arroz en Extremadura, *L. fascicularis* y *L. uninervia* son las más comunes (OSUNA ET AL. 2012) debido a que están bien adaptadas a condiciones de inundación o suelo saturado.

El control químico contra estas malas hierbas es bastante eficiente en este cultivo (TALBERT AND BURGOS 2007, TEHRANCHIAN ET AL. 2016). De este modo, los herbicidas más utilizados para ello, pertenecen principalmente a dos grupos de herbicidas: inhibidores de la ALS (acetolactato sintasa) e inhibidores de la ACCasa (acetil-CoA carboxilasa) (OSUNA ET AL. 2012, TEHRANCHIAN ET AL. 2016).

El uso repetido y continuado de herbicidas con un mismo modo de acción está dando lugar a numerosos casos de resistencias en distintas especies. Hasta la fecha, 160 especies diferentes de malas hierbas han desarrollado resistencia a los herbicidas inhibidores de la ALS y 48 han mostrado resistencia a herbicidas inhibidores de la ACCasa (HEAP 2019). El primer caso de resistencia a herbicidas inhibidores de la ACCasa en *Leptochloa* spp. (*L. chinensis* L.) fue descrito por MANEECHOTE ET AL. (2005). Sin embargo, no hay casos documentados de herbicidas inhibidores de la ALS y ACCasa en *L. fascicularis* y *L. uninervia* (HEAP 2019). El mecanismo más común por el que una planta puede desarrollar resistencia a un herbicida es por mutación en el sitio de acción del mismo (gen ALS y/o ACCasa).

Por todo lo expuesto anteriormente, los objetivos de este trabajo son (1) realizar prospecciones en campos de arroz de Extremadura donde los agricultores describieron fallos en el control de *Leptochloa* spp. con herbicidas y (2) analizar las secuencias de la ALS y ACCasa buscando la existencia de posibles mutaciones que pudieran explicar dichos fallos de control.

2. Material y Métodos

2.1- Prospecciones

Se realizaron prospecciones desde 2009 hasta 2016 en campos de arroz de Extremadura. Se contó para ello con el asesoramiento de técnicos del servicio de Sanidad Vegetal de la Junta de Extremadura que eran conocedores de la existencia de fallos de control de *Leptochloa* spp. en este cultivo. Así, se llevaron a cabo los muestreos de poblaciones de este género en arrozales de la región donde se sospechaban casos de resistencias. Todas las muestras recogidas fueron georreferenciadas.

2.2- Material vegetal

Las semillas de las poblaciones de *Leptochloa* spp. estudiadas fueron germinadas en macetas de 7x7x9 cm. utilizándose un sustrato de turba-vermiculita en una proporción 3:1 en invernadero con condiciones controladas de humedad y temperatura,

2.3- Caracterización molecular y morfológica

Las muestras fueron caracterizadas a nivel de especie mediante el uso de marcadores moleculares AFLP usando la metodología de ROMANO ET AL. (2017). Estas poblaciones se clasificaron en *L. fascicularis* o *L. uninervia*. Los resultados del estudio molecular se contrastaron con una caracterización morfológica siguiendo la metodología de FERNÁNDEZ-CAVADA ET AL. (2008). Según este autor, *L. fascicularis* se distingue *L. uninervia* por sus espiguillas más aristadas.

2.4- Extracción del ADN y reacciones de PCR

Cuando se obtuvo suficiente material vegetal (60-100mg), se procedió a la extracción del ADN utilizándose para ello el kit de extracción de ADN para plantas de BIOTOOLS siguiendo el protocolo del fabricante. Una vez extraído, se cuantificó utilizando el NANODROP 1000 (Thermo Scientific) para asegurarnos unas condiciones adecuadas de concentración y pureza. A continuación, se hicieron diluciones a 10 ng/µl (concentraciones utilizadas en las posteriores PCR). El ADN se conservó a -21 ºC hasta su utilización en los análisis.

En la secuencia de la **ACCasa** se estudiaron 8 codones: ile1781, trp1999, trp2027, Ile2041, asp2078, lys2080, ser2088 y gly2096 utilizando los cebadores de la Tabla 1.

En la secuencia de la **ALS** se estudiaron 2 zonas: la CAD (incluye los codones ala122, pro197, ala205), y la BE (incluye los codones trp574 y ser653). Los cebadores utilizados para esta secuenciación quedan reflejados en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de los cebadores utilizados para la secuenciación de los genes ALS y ACCasa y los codones estudiados

Cebador	Secuencia	Tamaño fragmento (bp)	Codones estudiados
Gen ACCasa			
CRUSS-F	5´-GATTGGCATAGCCGATGAAG-3´	474	Ile1781
CRUSS-R	5´-TGGACAACACCATTGGTAGC-3´		
AC6F	5´-AGCTTGGAGGAATCCCTGTT-3´	496	Trp1999, Trp2027, Ile2041, Asp2078, Lys2080, Ser2088 Gly2096
AC6R	5´-GGGTCAAGCCTACCCATACA-3´		
Gen ALS			
PALI-1F	5'-CGACGTCTTCGCCTACCC-3'	455	Zona CAD: Ala122, Pro197, Ala205
PALI-2R	5'-ATCTGCTGCTGGATGTCCTT-3´		
BE-1	5-GTCTTGGGGCTATGGGATTT-3´	594	Zona BE: Trp574 y Ser653
BE-2	5´-CGACAGAACAAGGGAGAACA-3´		

Para la reacción de PCR, la mezcla de los reactivos utilizada fue de 1,125µl de cada primer (10pmol/ µl), 2,4 µl de la mezcla de dNTP (2.5mM), 3 µl de Buffer 10X, 0.3µl de Taq polimerasa (5U/ µl) y se completó con agua de PCR hasta un volumen final de

30 µl. El ciclo de PCR llevado a cabo para todas las parejas de cebadores fue el mismo variando únicamente la temperatura de unión de los cebadores: 95ºC 5min (x1); 95ºC 30seg, XºC 30seg, 72ºC 1min (x35) y 72ºC 5min (x1), manteniéndose a 4ºC al final del ciclo. Así, para las parejas CRUSS-F/ R, AC-6F/R, y PALI-1F/1R la temperatura de unión de los cebadores fue de 57ºC; para la pareja BE-1/2 esta temperatura fue de 61ºC**.**

2.5- Electroforesis en gel de agarosa y purificación de las bandas de interés

Los productos de ADN amplificados mediante la técnica de PCR explicada en el apartado anterior, fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.3% y visualizados mediante el transiluminador Alpha Innotech. El gel de agarosa fue teñido con Red Safe (20.000X; INTRON). Las bandas esperadas, se cortaron y purificaron utilizando el Kit de Purificación de ADN de BIOTOOLS (según las indicaciones del fabricante).

2.6- Secuenciación de los fragmentos amplificados.

Tras purificar las bandas, éstas fueron enviadas para su secuenciación al STAB (Servicio de Técnicas Aplicadas a la Biociencia) de la Universidad de Extremadura. Las secuencias, fueron visualizadas utilizando el programa CHROMAS y fueron alineadas mediante el programa CLUSTAL OMEGA.

3. Resultados y Discusión

Un total de 42 poblaciones de *Leptochloa* spp. fueron utilizadas en este estudio, abarcando desde muestras recogidas en 2009 hasta 2016.

Mediante la caracterización molecular ROMANO ET AL. (2017) y morfológica (artículo por publicar) se determinó que todas las poblaciones estudiadas pertenecieron a dos especies: *L. fascicularis* o *L. uninervia*. (datos no especificados/mostrados).

Respecto al análisis de las secuencias de genes de la ALS y la ACCasa, las muestras que presentaron mutación se distribuyen en Extremadura como se detalla en la Figura 1. De las 42 muestras estudiadas, 6 de ellas mostraron mutación en el gen de la ALS, 13 poblaciones con mutaciones en el gen de la ACCasa y 3 poblaciones que presentaron mutaciones al mismo tiempo en ambos genes como se puede observar en la Tabla 2.

Tabla 2. Porcentaje de mutaciones encontradas en cada población

Mutación	**Porcentaje de muestras encontradas**
Gen ALS	**14,29%**
Pro197Ser	7,14%
Pro197Leu	7,14%
Gen ACCasa	**30,95%**
Ile1781Leu	28,57%
Trp1999Cys	2,38%
En ambos genes a la vez	**7,14%**
Pro197Ser y Trp1999Cys	4,76%
Pro197Ser y Trp2027Cys	2,38%

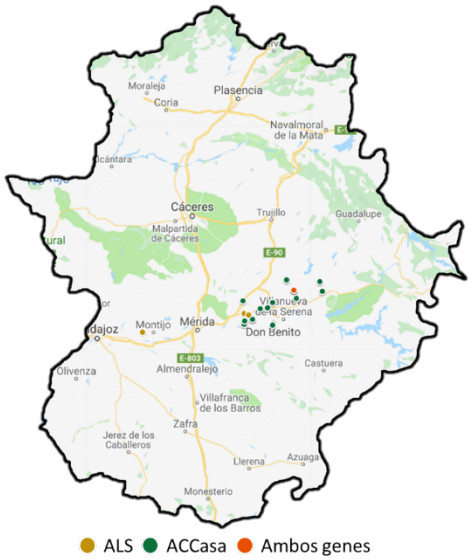


Figura 1. Distribución de poblaciones de *Leptochloa* spp. con mutación en gen de la ALS, ACCasa o en ambos en Extremadura

Debido a que el arroz es uno de los cultivos con mayor escasez de materias activas disponibles y, a la vista de los resultados obtenidos en cuanto a mutaciones se refiere, se aconseja un control integrado de malas hierbas (CIM) utilizando, además de los herbicidas disponibles, técnicas alternativas para evitar el incremento de biotipos resistentes en la región.

Agradecimientos

Se ha recibido financiación del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) con la Beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI-INIA) otorgada a Ignacio Amaro Blanco, el proyecto INIA RTA2014-00033-C03-01 y el apoyo del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del proyecto AGROS (CCESAGROS)

Referencias

FERNÁNDEZ-CAVADA S, CIRUJEDA A, CARMELO M, SALAS I, AIBAR J, & ZARAGOZA C (2008) Leptocloa. *Leptochloa uninervia* (C. Presl) Hitch. & Chase. Dirección General de Alimentación. Centro de Producción Vegetal. Gobierno de Aragón

HEAP I (2019) The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. http://www.weedscience.org. Accessed February 14, 2019

MANEECHOTE C, SAMANWONG S, ZHANG X-Q, & POWLES SB (2005) Resistance to ACCase-inhibiting herbicides in sprangletop (*Leptochloa chinensis*). *Weed Sci* **53**:290–295

MAPAMA (2018) Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente

OSCA JM (2013) Expansion of *Leptochloa fusca ssp. uninervia* and *Leptochloa fusca ssp. fascicularis* in rice fields in Valencia, eastern Spain. *Weed Res* **53**:479–488

OSUNA MD, ROMANO Y, & QUILES JM (2012) Principales malas hierbas y métodos de control en el cultivo de arroz en España. *Vida Rural* **339**:74–77

ROMANO Y, MENDOZA F, PALMERÍN JA, QUILES JM, AMARO-BLANCO I, & OSUNA MD (2017) Uso de marcadores moleculares para la caracterización de malas hierbas del cultivo del arroz en Extremadura: "*Echinochloa* spp." y "*Leptochloa* spp." Pages 337–342 *in* XVI Congreso de la Sociedad Española de

Malherbología: actas: Pamplona-Iruña, 25-27 octubre, 2017. Servicio de Publicaciones de la Universidad Pública de Navarra

SAAVEDRA M, CORTÉS JA, GÓMEZ DEBD, RODRÍGUEZ-BERNABÉ JA, TABENER A, CASTEJÓN M, MONTSERRAT A, & ZARAGOZA C (1995) Malas hierbas de difícil control. *Minist Agric Pesca y Aliment Madrid*

SAITO K (2010) Weed pressure level and the correlation between weed competitiveness and rice yield without weed competition: An analysis of empirical data. *F Crop Res* **117**:1–8

SMITH RJ (1988) Weed thresholds in southern US rice, *Oryza sativa*. *Weed Technol* **2**:232–241

TALBERT RE & BURGOS NR (2007) History and management of herbicide-resistant barnyardgrass (Echinochloa crus-galli) in Arkansas rice. *Weed Technol* **21**:324–331

TEHRANCHIAN P, NORSWORTHY JK, KORRES NE, MCELROY S, CHEN S, & SCOTT RC (2016) Resistance to aryloxyphenoxypropionate herbicides in Amazon sprangletop: Confirmation, control, and molecular basis of resistance. *Pestic Biochem Physiol* **133**:79–84

Resistance to ALS- and ACCase-inhibiting herbicides in *Leptochloa* spp. in rice fields from Extremadura

Summary: The genus *Leptochloa* includes very problematic weed species in rice cultivation. Currently, the authorized herbicides in Spain to control this weed in rice belong mainly to 2 modes of action: ALS (acetolactate synthase) inhibitors and ACCase (acetyl coenzyme A carboxylase) inhibitors. The repeated and continuous use of these herbicides can lead to the appearance of resistance. In this work, surveys of *Leptochloa* spp. were carried out for several years in paddy fields from Extremadura where there were control failures using authorized herbicides. Out of the 42 populations studied, different types of mutations in the sequences in both enzymes (ALS and ACCase) have been confirmed in laboratory. In ALS the predominant mutation was Pro197Ser, while in ACCase it was Ile1781Leu. Also, populations with mutations in the two genes were detected. Due to the mutations found, an integrated weed management (IWM) is recommended, using, in addition to the available herbicides, alternative techniques to avoid the increase of resistant biotypes in the region.

Keywords: *Leptochloa*, resistance, mutation, ALS, ACCase, target-site, integrated weed management.

Aproximación metabolómica para la mayor eficacia del glifosato tras su combinación con quinato en el control de *Amaranthus palmeri*

ZULET-GONZALEZ A[1], BARCO ANTOÑANZAS M[1], GIL-MONREAL M[1], SCHEEL D[2], GORZOLKA K[2], ZABALZA A[1], ROYUELA M[1].

[1] Institute for Multidisciplinary Research in Applied Biology, UPNA, Pamplona, SPAIN.
[2] Leibniz Institute for Plant Biochemistry, Halle (Saale), GERMANY.
ainhoa.zulet@unavarra.es

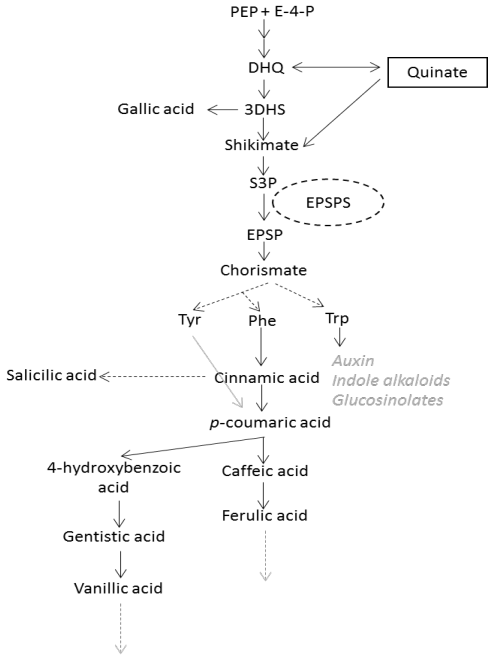
Resumen: En este estudio se valora la posible utilización del quinato como potenciador del efecto fitotóxico del glifosato al aplicarlos de forma conjunta en la mala hierba *Amaranthus palmeri.* Se aplicó quinato, glifosato en dos dosis (recomendada y una cuarta parte de la misma) y quinato junto con la dosis baja de glifosato. Se evaluaron los efectos visuales y el perfil metabólico de la ruta del siquimato mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas. El glifosato provocó acumulación de los compuestos previos a su diana, la enzima EPSPS. La aplicación conjunta de quinato y glifosato provocó una exacerbación de la acumulación de quinato y de cuatro derivados del mismo respecto a las aplicaciones aisladas. Este comportamiento podría estar relacionado con la mayor fitotoxicidad detectada en el tratamiento combinado, que resultó tan letal como la dosis alta de glifosato. Así, se puede plantear la aplicación conjunta para una reducción de las dosis empleadas en campo para el control de esta especie.

Palabras clave: *Amaranthus palmeri*, glifosato, quinato, ruta del siquimato, GC-MC, metabolómica.

1. Introducción

El glifosato es el herbicida más utilizado a nivel mundial. Es un herbicida total, del grupo de las glicinas, cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), enzima clave en la ruta de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos (Figura 1). Como consecuencia del bloqueo de la EPSPS se produce un aumento en la ruta de ciertos metabolitos, como el siquimato (De Maria et al., 2006), y el quinato (Orcaray et al., 2010). El quinato es un metabolito formado en una ramificación lateral de la misma ruta (ruta de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos) el cual se ha demostrado que se incorpora a la ruta si se aplica exógenamente (Zulet et al., 2013). Con estos antecedentes se planteó el estudio del posible efecto potenciador de la toxicidad del glifosato con la aplicación posterior de quinato aplicado exógenamente. Se trata de bloquear la ruta del siquimato con una dosis reducida de herbicida e inmediatamente re-alimentarla con quinato. En este ensayo se aborda dicho objetivo desde una perspectiva

metabólica sobre la posible utilización en *Amaranthus palmeri,* una de las peores malas hierbas a nivel mundial en la actualidad.



Esquema 1. Representación simplificada de la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Fosfoenol piruvato (PEP); eritrosa-4-fosfato (E-4-P); dehidroquinato (DHQ); 3-dehidrosiquimato (3DHS); siquimato-3-fosfato (S3P); 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS); enolpirilsiquimato-3-fosfato (ESPS). Tirosina (Tyr), Fenilalanina (Phe), Triptófano (Trp).

2. Material y Métodos

Las plantas de *A. palmeri* (Facilitadas por el Dr. Todd A. Gaines; Colorado State University, Fort Collins, CO, USA) se cultivaron en cultivo hidropónico (Fernández-Escalada et al., 2016). Se pulverizaron los siguientes tratamientos a plantas de 21 días: el quinato se aplicó a una dosis de 400 mM y el glifosato se aplicó de manera aislada a dos diferentes dosis: 0,25x y 1x la dosis recomendada en campo (DR) de 0.84 kg/ha. El tratamiento combinado se llevó a cabo aplicando quinato 24 h después de la dosis baja (0,25 DR), para poder valorar si el quinato produce un efecto potenciador (Zulet-González et al., 2019). Se realizó un seguimiento visual del estado de las plantas durante 15 días y las hojas de las plantas fueron cosechadas tres días después de la aplicación del herbicida y fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y guardadas a -80ºC hasta su análisis. Se llevó a cabo una determinación de los metabolitos mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GCMS) según el método descrito por Gorzolka et al. (2012).

3. Resultados y Discusión

Se realizó un seguimiento del estado de las plantas y se evaluó la letalidad para cada uno de los tratamientos durante los 15 días posteriores a aplicarlos. El tratamiento de quinato aplicado de forma aislada no produjo ningún efecto letal sobre las plantas, si bien en el momento del muestreo (tres días) las plantas presentaban unas manchas ya descritas anteriormente en otros estudios en *Pisum sativum* (Zulet et al., 2013).

La dosis de herbicida de 0.25DR no resultó letal, mientras que la DR provocó la muerte de las plantas en siete días (Figura 1). El tratamiento combinado de la dosis baja de

herbicida con quinato, fue letal ya a los siete días, siendo la respuesta similar a la dosis DR de glifosato (Figura 1). La aplicación exógena de quinato convierte en letal una dosis de herbicida que aplicada de forma aislada no lo es, por lo que esta combinación podría ser un método de control válido en esta especie, reduciendo un 75% la dosis de herbicida a aplicar.



Figura 1. Aspecto visual de las plantas de *Amaranthus palmeri* siete días después de aplicar los tratamientos. Las plantas fueron no tratadas (Control), o tratadas con Quinato, 0.25 la dosis recomendada en campo de glifosato de forma aislada (Glp 0.25DR) o en combinación con quinato (Glp 0.25DR+Q), y la dosis recomendada en campo de herbicida (Glp DR).

En este estudio se ha realizado un perfil metabólico no dirigido que permitió detectar 130 metabolitos en las hojas, de los cuales fueron identificados 106. De todos los metabolitos identificados en el estudio metabolómico a continuación se presentan el quinato y sus derivados (Figura 2) y los intermediarios de la ruta del siquimato anteriores a la enzima diana del glifosato (EPSPS) (Figura 3). El alto contenido de quinato detectado en los tratamientos en los cuales se aportó exógenamente demostró que el compuesto es absorbido por la planta (Figura 2A). De los tratamientos que sólo llevaban glifosato (GLY0, 25RD y GLYDR) fue la dosis letal (DR) la que produjo un incremento significativo del contenido de quinato en las plantas, resultado que concuerda con estudios realizados anteriormente en otras especies (Orcaray et al., 2010; Serra et al., 2015). La mayor acumulación de quinato se detectó en el tratamiento combinado, lo que parece indicar que la inhibición previa de la enzima EPSPS por el glifosato dificulta la incorporación del compuesto en la ruta metabólica. Este mismo patrón fue detectado en tres de los cuatro metabolitos derivados del quinato (Figura 2B, C, D, E). La concentración de los derivados tres y cuatro del quinato fue muy superior en el tratamiento combinado que en el resto de tratamientos.

Se ha descrito en la bibliografía que la inhibición de la enzima EPSPS por el glifosato provoca una gran acumulación de los metabolitos previos a esta enzima en hojas (Esquema 1), principalmente siquimato, y acido gálico (Lydon and Duke, 1988; Becerril et al., 1989; Hernandez et al., 1999; Orcaray et al., 2010, 2012) y también de siquimato 3-fosfato (Siehl, 1997). En concordancia con ello, en este ensayo se detectó un incremento tras el tratamiento con glifosato en los tres metabolitos de la ruta principal: siquimato, 3-dehidrosiquimato y siquimato-3- fosfato y en el metabolito secundario ácido gálico (Figura 3B y D). Para los cuatro intermediarios de la ruta del siquimato, el incremento detectado fue proporcional a la dosis de herbicida aplicada, siendo así mayor el incremento con la DR que con la 0.25DR para todos los compuestos. El mayor nivel de inhibición de la enzima parece sería la causa de esta mayor acumulación con la dosis alta de glifosato. La aplicación de quinato no modificó el contenido de estos compuestos, ni

al ser aplicado de manera aislada ni modificando el efecto del herbicida al aplicarlo de manera conjunta con éste.

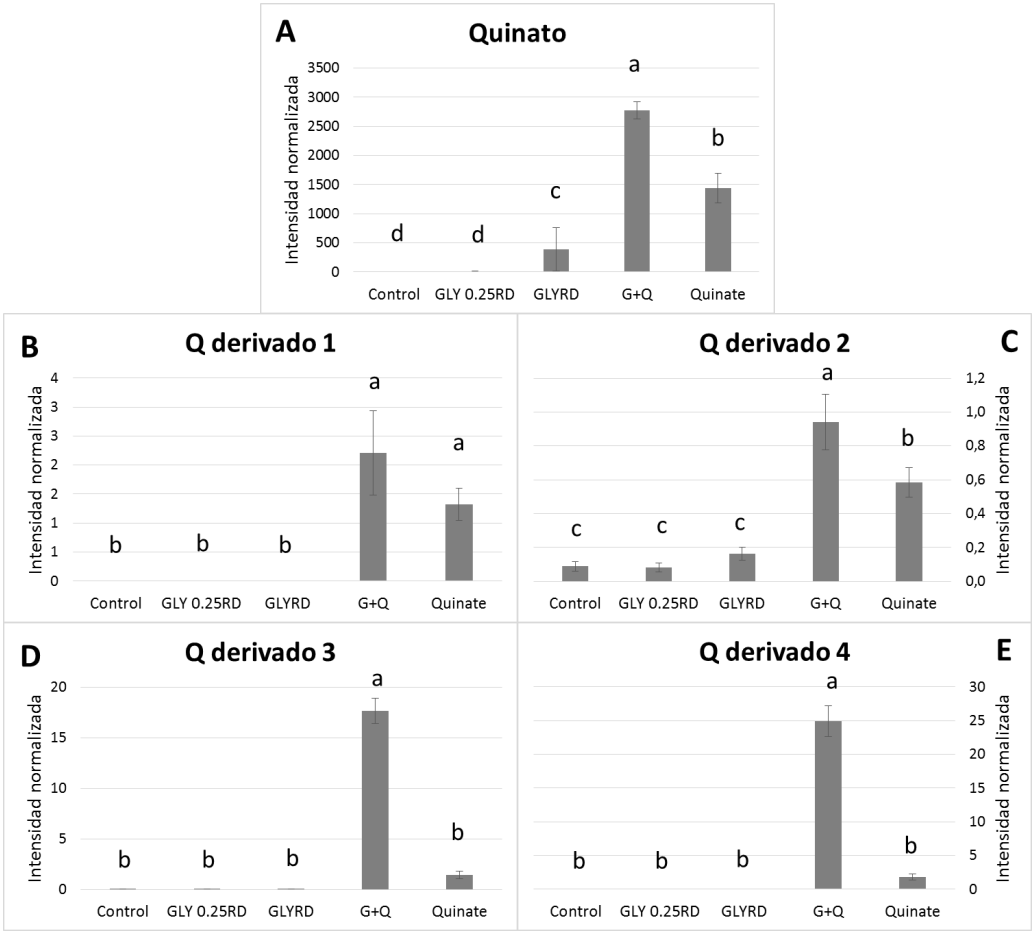


Figura 2. Contenido en quinato (A) y cuatro derivados del mismo (B, C, D, E), expresado como valores de intensidad normalizada, en plantas de *Amaranthus palmeri* no tratadas (Control) o muestreadas tres días después de aplicar los tratamientos: Glifosato a 0,25 o una veces la dosis recomendada en campo (GLY 0.25DR; GLY DR); tratamiento combinado de Glifosato a 0,25 DR y Quinato (G+Q) y Quinato (Q). Letras diferentes significan diferencias significativas para una $p<0.05$.

4. Conclusiones

El glifosato aplicado de forma aislada provocó en las plantas tratadas una acumulación proporcional a la dosis aplicada de los metabolitos de la ruta anteriores a su diana: quinato, siquimato, 3-dehidrosiquimato, siquimato-3-fosfato y ácido gallico. El tratamiento conjunto de quinato con un cuarto de la dosis recomendada de glifosato fue tan letal como la dosis recomendada de herbicida y dicho incremento de la fitotoxicidad del herbicida podría estar relacionado con un incremento en el contenido de quinato y sus compuestos derivados, ya que su acumulación fue máxima en la aplicación conjunta. Así, el bloqueo de la enzima EPSPS previa a la aplicación de quinato podría estar generando que el quinato se transforme en sus derivados y fuera esta la causa del incremento de su concentración y quizá de la mayor toxicidad del herbicida.

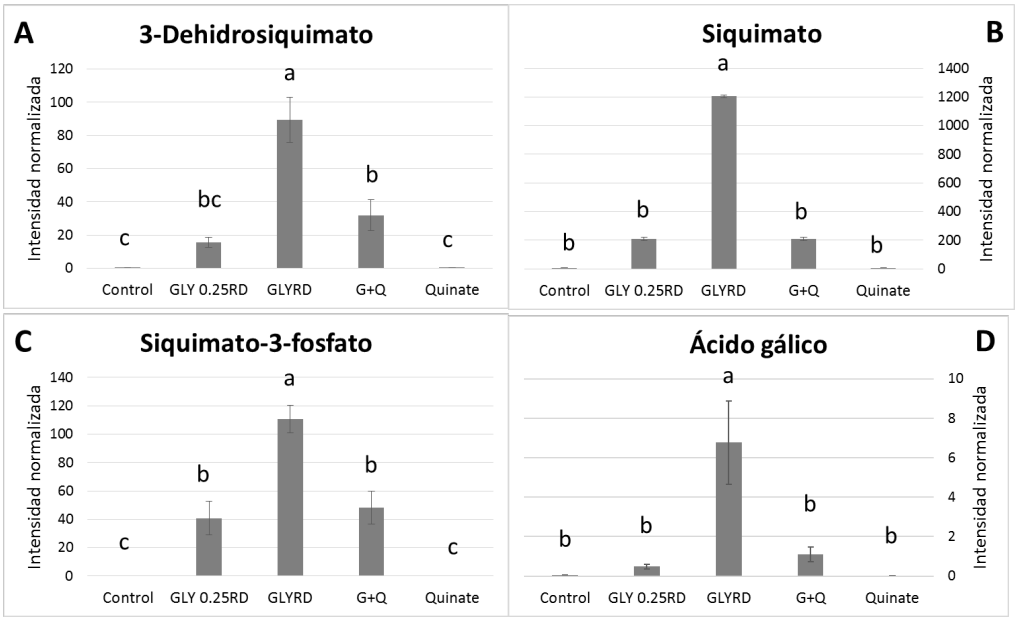


Figura 3. Contenido en 3-dehidrosiquimato (A), siquimato (B), siquimato-3-fosfato (C) y ácido gálico (D) expresado como valores de intensidad normalizada, en plantas de *Amaranthus palmeri* tres días después de aplicar los tratamientos: Biopower (Control); Glifosato a 0,25 o una veces la dosis recomendada en campo (GLY 0.25DR; GLY DR); tratamiento combinado de Glifosato a 0,25DR y Quinato (G+Q) y Quinato (Q). Letras diferentes significan diferencias significativas para una $p<0.05$.

5. Agradecimientos

A Z-G y M B-A son beneficiarias de una beca predoctoral de la UPNA. Proyecto financiado con el proyecto AGL2016-77531-R. La movilidad fue financiada por la Escuela de Doctorado de Navarra y ERASMUS+. Agradecemos la colaboración de Julia Taubert su asistencia técnica y al Leibniz Institute for Plant Biochemistry (Halle (Saale), Alemania) todas las facilidades para este estudio.

Referencias

BECERRIL J.M., DUKE S.O. & LYDON J. (1989). Glyphosate effects on shikimate pathway products in leaves and flowers of velvetleaf. *Phytochemistry*, **28,** 695-699.

DE MARIA N, BECERRIL J, GARCIA-PLAZAOLA J, HERNANDEZ A, DEFELIPE MR & FERNANDEZ PASCUAL M. (2006). New insights on glyphosate mode of action in nodular metabolism: Role of shikimate accumulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54,** 2621-2628.

FERNÁNDEZ-ESCALADA M., GIL-MONREAL M., ZABALZA A. & ROYUELA M. (2016). Characterization of the *Amaranthus palmeri* physiological response to glyphosate in susceptible and resistant populations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **64,** 95-106.

GORZOLKA K, LISSEL M, KESSLER N, LOCH-AHRING S & NIEHAUS K. (2012). Metabolite fingerprinting of barley whole seeds, endosperms, and embryos during industrial malting. *Journal of Biotechnology*, **159**, 177–187.

LYDON J. & DUKE S.O. (1988). Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **36,** 813-818.

HERNÁNDEZ A, GARCÍA-PLAZAOLA J.I. & BECERRIL J.M. (1999). Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47,** 2920-2925.

ORCARAY L, IGAL M, MARINO D, ZABALZA A & ROYUELA M. (2010). The possible role of quinate in the mode of action of glyphosate and acetolactate synthase inhibitors. Pest Management Science, **66,** 262-269.

ORCARAY L. ZULET A., ZABALZA A. & ROYUELA M. (2012). Impairment of carbon metabolism induced by the herbicide glyphosate. *Journal of Plant Physiology*, **169,** 27-33.

SERRA A, COUÉE I, RENAULT D, GOUESBET G & SULMON C (2015) Metabolic profiling of *Lolium perenne* shows functional integration of metabolic responses to diverse subtoxic conditions of chemical stress. *Journal of Experimental Botany*, **66,** 1801-1816.

SIEHL, D. L. (1997). *Hebicide activity: Toxicology, biochemistry and molecular biology*. (ROE RM, BURTON JD & KUHR RJ), 37-67. IOS Press, Amsterdam, Netherlands.

ZULET A, ZABALZA A & ROYUELA M. (2013). Phytotoxic and metabolic effects of exogenous quinate on *Pisum sativum* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, **3**, 779-788.

ZULET-GONZÁLEZ A, FERNÁNDEZ-ESCALADA M, ZABALZA A & ROYUELA M (2019). Enhancement of glyphosate efficacy on *Amaranthus palmeri* by exogenous quinate application. *Pesticide Biochemistry and Physiolog.* In press.

Metabolic approach of the increased glyphosate efficacy by combined application with quinate in the control of *Amaranthus*

Summary: In this study, the possible use of quinate as an enhancer of glyphosate efficacy was evaluated on *Amaranthus palmeri* weed plants. Plants were treated with quinate, two different glyphosate doses (the quarter or the full recommended field dose) and the combination of quinate and the lower glyphosate dose. Visual effects were assessed and metabolites of the shikimate pathway were investigated by gas chromatography-mass spectrometry. A dose dependent increase of the metabolites upstream EPSPS was observed after glyphosate applied alone. The combined treatment provoked an enhancement of quinate and four quinate derivates accumulated in comparison with the individual treatments. This might be related to higher toxicity of the combined treatment, which was as lethal as the recommended dose of glyphosate. Therefore, quinate would be an enhancer of glyphosate efficacy and lethality, and could be used to reduce the doses applied to control this weed.

Keywords: *Amaranthus palmeri*, glyphosate, quinate, shikimate pathway, GC-MS metabolite profiling.

Efecto herbicida, en condiciones controladas, de seis sustancias de origen natural

MONTULL JM, ARBONÉS A, RECASENS J

Grupo de Malherbología y Ecología vegetal. Dpto. Hortofruticultura, Botánica y Jardinería.
ETSEA-Agrotecnio. Universitat de Lleida.
josemontull@hbj.udl.cat, ama266@gmail.com, jrecasens@hbj.udl.cat

Resumen: En un ensayo, desarrollado en invernadero, se evaluó el efecto herbicida de seis productos naturales y a distintas dosis, sobre dos estados fenológicos de desarrollo,F1 (12-13) y F2 (14-15 BBCH), de tres malas hierbas: *Astersquamatus*, *Conyzabonariensis*y *Kochiascoparia*. Estas especies suelen ser frecuentes bajo la línea del cultivo en viñedos y frutales de regadío y muestran serias dificultades de control mediante algunos herbicidas de síntesis. Las sustancias de origen natural utilizadas corresponden a las siguientes formulaciones: ácido acético; ácido acético + solución nitrogenada N32; solución salina de NaCl; solución salina de metabisulfito potásico; extracto de aceite de camelina y, finalmente, mezcla de ácidos fúlvicos y húmicos. A los 21 días después de cada aplicación se estimó la eficacia mediante la reducción de peso seco respecto al testigo. En estado fenológico F1 y según la especie de mala hierba, las sustancias utilizadas mostraron una eficacia del 100% a las menores dosis (1x y 2x). Para el conjunto de especies y ambos estados fenológicos, los compuestos que mostraron mayor eficacia fueron la mezcla de ácidos fúlvicos y húmicos y la mezcla de ácido acético + solución nitrogenada N32.

Palabras clave: Bioherbicidas, dosis, eficacia, fenología, *Conyza bonariensis, Aster squamatus, Kochia scoparia*

1.Introducción

Ciertas especies de malas hierbas muestran una clara adaptación al tipo de manejo llevado a cabo. En sistemas en espaldera como el caso de frutales, olivos, viñedos, etc. el manejo de la vegetación bajo la línea del cultivo suele realizarse mediante tratamientos herbicidas, siendo el glifosato uno de los más utilizados. La recurrencia de estos tratamientos conlleva ciertos riesgos, por un lado favoreciendo un cambio de flora hacia especies de mayor dificultad de control, o bien facilitando la instalación de especies de fácil dispersión y colonización y con débil sensibilidad a ciertos herbicidas. Buenos ejemplos de esta situación son las especies *Conyzabonariensis, Astersquamatus* y *Bassiascoparia*(Recasens et al., 2018). Además, para *C. bonariensis* se conocen casos

donde la reiteración del uso del glifosato ha conllevado la selección de biotipos resistentes a este herbicida (Urbano, 2007). Por otro lado, en cultivos ecológicos, especialmente en viñedos, este manejo bajo las líneas del cultivo se realiza de forma mecánica mediante pases de intercepas. Estas intervenciones, siendo mayoritariamente eficaces, implican por un lado, riesgos de erosión del suelo, mayor consumo de combustible y emisiones de CO2, y por otro, posibles daños en infraestructuras tales como soportes, puntos de conexión o los propios tubos de riego por goteo.

La búsqueda de alternativas a estos métodos mecánicos así como a los herbicidas de síntesis de amplio espectro -como el glifosato-, deviene una necesidad y a su vez un reto. Con este objetivo se plantea un estudio experimental, en condiciones controladas en invernadero, con el fin de evaluar la eficacia de diferentes sustancias de origen natural con potencial efecto herbicida sobre tres especies de malas hierbas *C.bonariensis, A.squamatus y K.scoparia*.

2. Material y Métodos

El ensayo se llevó a cabo en invernadero, donde se pusieron a germinar semillas recién recolectadas de las especies *A.squamatus*, *C.bonariensis* y *K.scoparia* en bandejas con un sustrato mezcla de 40% de turba y un 60% de suelo agrícola esterilizado. Tras su germinación y en un estado de una hoja (BBCH 11) se trasplantaron cinco individuos de cada especie en diferentes macetas de 4 x 4 cm. Para cada especie se prepararon un total 280 macetas de acuerdo a los dos momentos de tratamiento, seis productos más testigo, cinco dosis y cuatro repeticiones. Se consideraron dos momentos de aplicación, un estado precoz (F1) sobre plántulas en estados fenológicos de dos-tres hojas (BBCH 12-13) y otro ligeramente más avanzado (F2) sobre rosetas con 5-6 hojas (BBCH15-16).

Los seis productos de origen natural considerados fueron:ácido acético 20%; ácido acético 20% + N32; solución salina de NaCl; solución de matabisulfito de potasio ($K_2S_2O_5$); aceite de camelina y una mezcla de ácidos húmicos 7% y fúlvicos 80%. En la tabla 1 se detallan las dosis empleadas para cada uno de los productos aplicados. Para cada momento de aplicación, se mantuvieron también cuatro macetas testigo para cada especie.Los tratamientos se realizaron en invernadero con un pulverizador manual de 250 ml, asegurando la homogeneidad y la dosificación. La evaluación de eficacia se realizó 21 días después de cada tratamiento, estimando el peso seco de las plantas tras ubicarlas en una estufa a 80ºC durante 48h.

Tabla 1.Sustancias naturales aplicadas y dosis de tratamiento

Sustancia	Dosis aplicadas				Unidad
Ácido acético 20%	175	350	700	875	L/ha
Mezcla ácido acético 20% (70%) + N32 (30%)	175	350	700	875	L/ha
Solución salina- NaCl	35	70	140	175	kg/ha
Solución metabisulfito potásico	35	70	170	175	kg/ha
Aceite de camelina	250	500	1000	1250	L/ha
Mezcla de ácidos húmicos 7% y fúlvicos80%	8.75	17.5	35	43.75	L/ha

3. Resultados y Discusión

La figura 2muestra, por separado y para cada producto de origen natural utilizado, los resultados de eficacia obtenidos, en las tres especies y en ambos estados fenológicos.

Para el ácido acético 20%, en las tres especies la eficacia aumenta con la dosis aplicada y, a su vez, esta resulta mayor cuando las plantas se encuentran en estado fenológico más precoz (F1). Cabe destacar, que a la menor dosis ensayada (175 L/ha) se obtienen eficacias superiores al 97% en F1 y F2 para *C. bonariensis*, y superiores al 90% en F1 en *A. squamatus*. La dosis de 350 L/muestra una eficacia del 100%, o cercana a ella, en todos los casos (figura 1).

La mezcla de ácido acético y solución nitrogenada N32 mejora la eficacia del ácido acético aplicado solo. Este efecto sinérgico se detecta de manera especial a partir de la dosis de 350 L/ha donde se obtienen unos valores de eficacia superiores al 92% para todas las especies y en ambas fenologías (F1 y F2). A esta dosis la eficacia es del 100% para *C. bonariensis*. Estos resultados parecen indicar que la adición de N32 mejora la absorción y en consecuencia el efecto del ácido acético.

El tratamiento son solución salina (NaCl) muestra unos resultados muy distintos en función de la especie considerada. En *C. bonariensis* las eficacias son muy buenas en F1 y a la dosis menor (35 kg/ha), y también en F2 a partir de 70 kg/ha. Sin embargo, en las otras especies solo se detecta cierta eficacia (entre un 75 y 85%) a la mayor concentración salina (175 kg/ha) y cuando las plantas están en F2, posiblemente debido a una mayor capacidad de absorción foliar. Es conocida la tolerancia a las sales por parte de *B. scoparia* y *A. squamatus*, por lo que la posible aplicación sobre la planta resulta poco eficaz.

La solución de metabisulfito de potasio, ha resultado altamente eficaz (100%) a la menor dosis (35 kg/ha) en *C. bonariensis* en F1. Sin embargo, en *A. squamatus*y *B. scoparia*, la dosis de 70 kg/ha ha resultado más eficaz en F2 que en F1, con valores superiores al 96%. Al igual que en el caso anterior, un mayor desarrollo foliar podría permitir mayor superficie de contacto y aumentar el efecto del producto. Para el resto de casos, se observan eficacias muy buenas (>97%) a la mayor dosis ensayada (175 kg/ha).

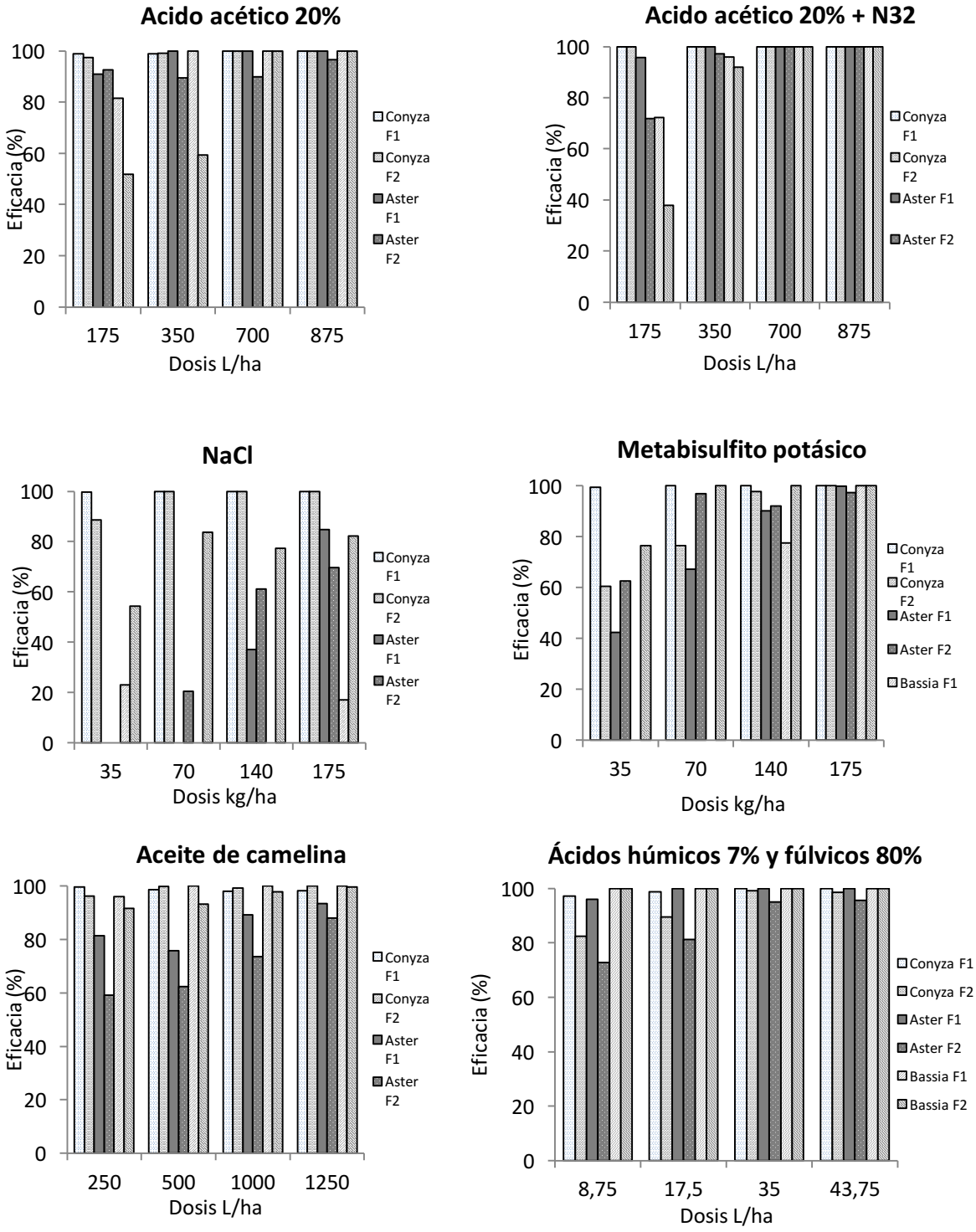


Figura 2. Porcentaje de eficacia delos distintos productos orgánicos ensayados a las diferentes dosis y para cada especie, en dos estados fenológicos: F1 (BBCH 11) y F2 (BBCH 12-13).

El aceite de camelina, a la menor dosis (250 L/ha) ha tenido muy buen comportamiento frente a *C. bonariensis* y *B. scoparia* con eficacias, respectivamente, del 99 y 96% en F1, y del 96 y del 91% en F2. En *Astersquamatus* se alcanzan eficacias cercanas al 90% en F1 a la dosis de 1000 L/ha y en F2 a la dosis máxima de 1250 L/ha.

La mezcla de ácidos húmicos y fúlvicos ha mostrado, en F1 de las tres especies, valores de eficacia comprendidos entre el 96% y el 100% a la menor dosis ensayada (8,75 kg/ha). En F2, para*C. bonariensis* y *A. squamatus*se requieren dosis de 35 kg/ha para alcanzar, respectivamente, eficacias del 99% y 95%.



Figura 3. Izquierda: tratamiento de *Aster squamatus* enfenología F2 (BBCH 15-15) con ácidoacético + N32 a diferentes dosis:0 (testigo), 175, 350, 700 y 850 L/ha. Derecha: tratamiento de *Conyzabonariensis* en fenología F2 (BBCH 14-15) con Metabisulfito potásico a distintas dosis: 0 (testigo), 35, 70, 140 y 175 kg/ha

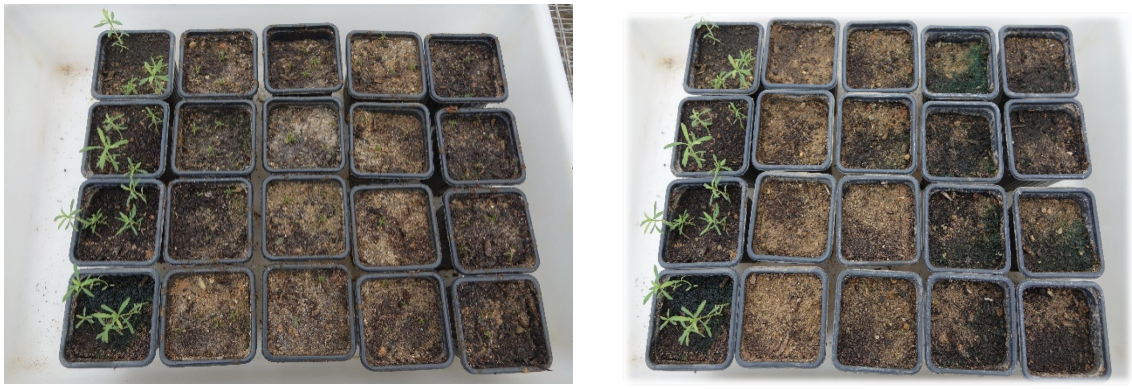


Figura 4. Tratamientos de *Bassiascoparia* en fenología F2 (BBCH 14-15). Izquierda con aceite de camelina a distintas dosis: 0 (testigo), 250, 500, 1000 y 1250 L/ha. Derecha con mezcla de ácidos húmicos (7%) y fúlvicos (80%) a distintas dosis: 0 (testigo), 8,75, 17,5, 35 y 43,75 L/ha.

Los resultados del presente estudio han permitido identificar, en condiciones controladas, sustancias de origen natural cuyo efecto herbicida permite el control de especies de malas hierbas problemáticas en varios cultivos. No obstante, la posibilidad de su implementación a nivel agronómico requiere de nuevos estudios que permitan avanzar en aspectos como la disponibilidad comercial de estas sustancias, cantidad y modo de aplicación dado que en general, se requieren dosis de aplicación bastante más elevadas que los herbicidas convencionales. Además, también se debería tener en cuenta su efecto sobre los cultivos ya que desde la antigüedad se conoce el efecto herbicida del cloruro sódico.

4. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiadopor del Proyecto Plan Estatal - Retos de la Sociedad, Ref: AGL2017-83325-C4-2-R y AGL2017-83325-C4-1-Rfinanciados por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y Fondos EU-FEDER.

5. Referencias

Recasens J, Valencia F, Montull JM, Taberner A (2018)Malas hierbas problemáticas en viñedos y métodos químicos para su control. Vida Rural 444: 48-58.

Urbano J M, Borrego A, Torres V, León J, Jimenez C, Dinelli G, Barnes J (2007**)** Glyphosate-resistanthairyfleabane(*Conyzabonariensis*) in Spain. Weed Technology 21, 396–401.

Herbicide effect, in controlled conditions, of six natural products

Summary: A trialwas stablished in greenhouseto estimate the herbicide effect of six differentnatural products over three weeds (*Aster squamatus*, *Conyzabonariensis*y *Kochia scoparia*) in two different phenological stages: F1 (BBCH 12-13) and F2 (14-15 BBCH). These weeds are usually frequent under the rows of orchards and vineyards and are difficult to control by some synthetic herbicides. The natural products used have been: acetic acid, acetic acid + N32, saline solution of NaCl, solution of potassium metabisufite, camelina oil and a mixture of humic acids (7%) and fulvic acids (80%). 21 days after treatment the efficacy was estimated as the reduction of dry weight respect to the untreated check. In the growth stage F1, and in function of the species, the products showed an efficacy of 100% at lower doses (1x and 2x). For the set of species and in both phenological states, the compounds with higher efficacy were the mixture of humics and fulvic acids and the solution of acetic acid + N32.

Keywords:bioherbicides, doses, efficacy, phenology, *Conyzabonariensis, Aster squamatus, Kochia scoparia*

Potencial bioherbicida de harmalina en el metabolismo de *Arabidopsis*

LÓPEZ-GONZÁLEZ D[1,2], ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ S[1,2],TEIJEIRA M[3,4,], ARANITI F[5], REIGOSA MJ[1,2], SÁNCHEZ-MOREIRAS AM[1,2]

[1]Department of Plant Biology and Soil Science. University of Vigo. Campus Lagoas-Marcosende, Vigo
adela@uvigo.es, mreigosa@uvigo.es
[2]CI´TACA. Agri-Food Research and Transfer Cluster, Campus da Auga. Univ. of Vigo, Ourense, Spain;
[3]Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Vigo, Campus Lagoas-Marcosende s/n, 36310 Vigo, Spain
qomaca3@uvigo.es
[4]Instituto de Investigación Sanitaria Galicia Sur (IISGS), Universidade de Vigo, 36310 Vigo, Spain;
[5]Department AGRARIA, University Mediterranea of Reggio Calabria, Feo di Vito, Reggio Calabria, Italy,
fabrizio.araniti@unirc.it

Resumen: La harmalina es un indol alcaloide que se encuentra en semillas de *Peganum harmala*. Probada en plántulas de *Arabidopsis*, mostró una fuerte actividad inhibitoria sobre el crecimiento de raíces y brotes, induciendo el acortamiento y engrosamiento de las raíces así como un aumento de pelos radicales. Los valores IC_{50} e IC_{80} fueron tan bajos como 14 y 29 µM, respectivamente, tras el tratamiento con harmalina. El análisis ultraestructural mostró aberraciones importantes en el desarrollo de la radícula, ya que tanto la zona de diferenciación como de transición mostraron una fuerte desorganización tisular con células de diferentes tamaños y formas que no mantuvieron el patrón del control. Además, en las raíces tratadas, los pelos radiculares emergieron a lo largo de toda la raíz, también muy cerca del meristemo apical, lo que podría deberse a la reducción de la longitud del meristemo. Basándonos en estos resultados, se decidió analizar el contenido de auxina, obteniendo fuertes diferencias entre raíces control y tratadas con concentraciones tan bajas como 10 a 20 µM de harmalina. Todos estos resultados demuestran la importante capacidad fitotóxica de este alcaloide y abren la puerta a su estudio en futuros experimentos.

Palabras clave: harmalina, *Arabidopsis*, bioactividad, auxinas

1. Introducción

Los metabolitos secundarios de origen vegetal representan una fuente de gran diversidad química que incluye *a priori* compuestos menos tóxicos, de menor persistencia y más fácilmente biodegradables en el medio que los herbicidas sintéticos. Sin embargo, la búsqueda de compuestos naturales que puedan ser utilizados como bioherbicidas no es

una tarea sencilla, por lo que es habitual realizar ensayos con metabolitos secundarios con demostrada actividad biológica sobre otros organismos (Duke *et al*., 2000), como es el caso de la harmalina. La harmalina (1-metil-7-metoxi-3,4-dihidro-beta-carbolina) es un alcaloide indol del grupo de los alcaloides naturales β-carbolinos. Se trata de un metabolito secundario ampliamente encontrado en semillas de *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae), una planta herbácea cuyas semillas poseen propiedades alucinógenas, y se utiliza, entre otras, como remedio médico, incienso o condimento con propiedades afrodisíacas (Farouk *et al.*, 2007). El consumo de semillas de *P. harmala* y su correspondiente dosis de harmalina induce la inhibición de la enzima monoamino oxidasa (MAO) de forma altamente reversible y selectiva (Herraiz *et al*., 2010). También se ha demostrado que la harmalina presenta capacidad antiparasitaria contra *Leishmania mexicana amazonensis* (Evans y Croft, 1987) y actividad bioinsecticida sobre *Plodia interpunctella* (Rharrabe *et al*., 2007). Incorporada en la dieta del lepidóptero, la harmalina causó gran pérdida de peso en las larvas provocando su muerte e impidiendo el desarrollo de las etapas pupales y adultas (Rharrabe *et al*., 2007). Sin embargo, la actividad fitotóxica de la harmalina todavía no ha sido investigada, por lo que se plantea en este estudio su estudio sobre plántulas de *Arabidopsis thaliana* (L.), especie modelo de reducido tamaño y rápido crecimiento, altamente sensible en los ensayos de fitotoxicidad (Pennachio et al., 2005).

2. Material y Métodos

Para el estudio del modo de acción se llevó a cabo el protocolo establecido en Sánchez-Moreiras et al. (2018). Semillas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Col-0) fueron esterilizadas y sembradas en placas Petri (100 mm x 100 mm x 15 mm) suplementadas con un medio de agar vegetal con una mezcla de macro y micronutrientes al 0,44% (w/v Murashige-Skoog, Sigma-Aldrich) y sacarosa al 1%, ajustado a pH 6,0 con KOH. Se sembraron cinco réplicas con 24 semillas cada una para las concentraciones de harmalina: 0; 2,5; 5; 10; 20; 40 y 80 μM. Las placas sembradas fueron llevadas a una cámara de crecimiento con 8 h luz/16 h oscuridad, 25 ºC y 55% de humedad relativa. Se colocaron en posición vertical y se dejaron crecer durante 14 d. Posteriormente, se determinaron las IC_{50} e IC_{80} para la germinación y el crecimiento (concentraciones del compuesto que provocan un 50% y un 80% de inhibición, respectivamente). Las placas fueron escaneadas para estudiar las variaciones en el tamaño y la dirección del crecimiento y estudiadas a la lupa (Nikon SMZ 1500) para observar los cambios morfológicos y fisiológicos apreciables al aumentar la concentración de harmalina. A los 7 y 14 d se seccionaron los extremos apicales de radículas tratadas y se fijaron con glutaraldehido al 5% (pH 7,2) durante 4 h a 4 ºC. Tras el lavado, se introdujeron en tampón cacodilato con tetraóxido de osmio (2%) durante 3 h y 1 h en acetona (10%) con acetato de uranilo al 2%. La deshidratación se llevó a cabo con concentraciones crecientes de acetona hasta el 100%. La impregnación en resina Spurr se realizó en rotor a temperatura ambiente. Se colocaron las muestras de resina pura en moldes y se dejaron polimerizar a 60 ºC. Pasados 2 días se elaboraron cortes semifinos (0,7 μm) para microscopía óptica, que fueron

analizados con un microscopio óptico Nikon Eclipse 800 acoplado a una cámara digital SightNikon DS-U2 y un software NIS-Elements D 2.30 SP1; y cortes ultrafinos (50-70 nm) para el microscopio electrónico de transmisión de alto contraste JEOL JEM-1010 (80 kv) equipado con una cámara CCD Orius y Digital Montage Plug-in y un software "Gata Digital Micrograph". Para la observación con el TEM, se contrastaron las muestras con citrato de plomo.

Con el objetivo de analizar el efecto de la harmalina sobre el contenido en auxina de las raíces, se realizó un bioensayo con la línea mutante DR5:GFP, en concreto una línea transgénica que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) y que amplifica el promotor sintético de respuesta a auxinas DR5 (Ottenschlager *et al*., 2003). Esta línea fue cedida por el Dr. Fabrizio Araniti de la Universidad de Reggio Calabria (Italia). Las concentraciones utilizadas fueron 0, 10, 13, 16 y 19 μM. Se utilizaron tres placas para cada concentración. Los resultados fueron analizados con el programa estadístico SPSS v.15.0. Se comprobó la normalidad de los datos mediante Kolmogorov-Smirnov seguido de un test de Levene para comprobar la homocedasticidad de los mismos. Si los datos fueron homocedásticos se realizó un ANOVA con DMS, mientras que si no lo eran se analizaron mediante la T2 de Tamhane. Los datos no normales fueron analizados mediante Kruskal-Wallis..

3. Resultados y Discusión

El compuesto actuó de forma muy efectiva sobre plántulas de *Arabidopsis*, obteniéndose valores de IC_{50} e IC_{80} de 14 y 29 μM, respectivamente. Las imágenes de plántulas control tomadas a la lupa mostraron morfología y grosor uniformes y una ordenación homogénea de sus células en hileras simétricas de crecimiento radicular. Sin embargo, en las plántulas tratadas con las concentraciones 2,5 y 5 μM se observó un ligero incremento de los pelos radicales, aunque los mayores cambios aparecieron a partir de 10 μM. La raíz comenzó a acortarse y engrosarse, aumentando considerablemente los pelos radicales y disminuyendo la elongación radicular, además de aparecer numerosas raíces adventicias. En los cortes longitudinales de raíces control de *Arabidopsis* visualizados al microscopio óptico se pudieron observar capas de células bien distribuidas correspondientes a los distintos tipos de tejidos de la raíz, con un tamaño uniforme y divisiones en el mismo plano (Fig. 1, izquierda). Sin embargo, tras el tratamiento con harmalina, pudimos observar que hay un pronunciado engrosamiento radicular y un acortamiento de la zona meristemática que dio lugar a raíces gigantes con numerosas células híper-elongadas y con un número muy reducido de células en división (Fig. 1, derecha). La reducción del meristemo radicular se vio acompañada por un incremento de células vasculares, como si la zona de transición hubiera desaparecido y las células meristemáticas dieran lugar directamente a células de tejido vascular. Este hecho podría deberse a un desajuste hormonal causado por el efecto que provoca la harmalina en las plántulas.

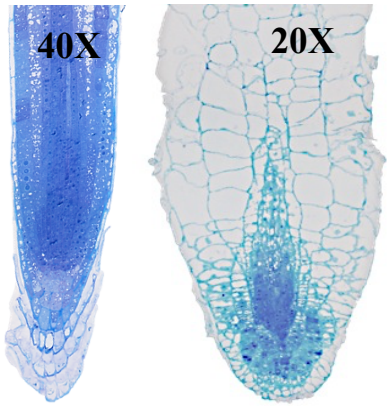


Figura 1. Secciones longitudinales de la región apical de raíces de *Arabidopsis* vistas al microscopio óptico tras 7 d de crecimiento (MO). A la izquierda, plántula control al máximo aumento (40X). A la derecha, plántula tratada con la IC_{50} de harmalina al mismo aumento (20X).

Las imágenes de TEM tras el tratamiento con la IC_{50} de harmalina mostraron diferencias evidentes entre las plántulas control y las tratadas con el compuesto. Las células del meristemo apical de las radículas control, mostraron una morfología uniforme típica de células sanas; núcleos grandes con cromatina central y laxa, pared celular con grosor homogéneo y presencia de plasmodesmos, y membrana plasmática adherida perfectamente a ella. Con respecto a otros orgánulos celulares, el aparato de Golgi, el retículo endoplasmático, las vacuolas o las mitocondrias presentaron una morfología, tamaño, número y localización típica de células sanas. Sin embargo, en las plántulas tratadas con harmalina se observaron grandes cambios a nivel ultra-estructural. El fuerte engrosamiento que sufrió la raíz se puede observar en la panorámica de la radícula, donde las células del centro quiescente se encontraron muy acortadas (algo que también se pudo observar en las imágenes de microscopía óptica) y la vacuolización se hizo muy abundante. Esta deformación del centro quiescente es muy importante, ya que se trata de un centro de control, es decir, un grupo de células con baja tasa de división que se encargan del establecimiento, mantenimiento y elaboración de los patrones del meristemo apical (Jiang y Feldman, 2005). El centro quiescente se encuentra rodeado de células iniciales del tipo células madre, y se encarga de mantener el estado indiferenciado de estas. Su deformación puede haber causado su pérdida de función, y, en consecuencia, haber provocado una fuerte diferenciación de las células iniciales adyacentes. Esta pérdida de función podría estar relacionada con un fallo en el gen *WOX5*, que se expresa en el centro quiescente y cuya función es inhibir la diferenciación de las células distales iniciales (Sarkar *et al*., 2007). Por lo que podría ser posible que el mecanismo de acción de la harmalina afectase a este gen.

El balance Auxinas/Citoquininas es esencial para el desarrollo del meristemo radicular, ya que mientras este se ve estimulado por la auxina, las citoquininas actúan a nivel de la zona de transición promoviendo la formación de tejido vascular e inhibiendo así el desarrollo radicular. Las citoquininas promueven la diferenciación celular en las raíces reprimiendo tanto el transporte de auxinas como la respuesta a la auxina en el límite entre el meristemo radicular y la zona de elongación (Chapman y Estelle, 2009), por lo que una reducción del desarrollo meristemático podría estar relacionada también con una alteración del balance auxinas/citoquininas. Con respecto al bioensayo realizado con

semillas de la línea mutante DR5:GFP, las plántulas control mostraron un marcaje fluorescente normal, propio de una planta sana y uniforme, sin ninguna anomalía (Fig. 2A). Sin embargo, en las concentraciones más bajas de harmalina (10 y 13 µM; Fig. 2B,C) este marcaje se hizo mucho más intenso que en el control, probablemente debido, no a un incremento en el contenido de auxina por célula, sino al mayor número de células en el campo visual consecuencia del acortamiento y engrosamiento de la radícula a estas concentraciones. Con el incremento de la concentración (16 µM) la señal fluorescente se hizo algo más débil y en la concentración más alta ensayada (19 µM; Fig. 2E) se hizo prácticamente imperceptible.

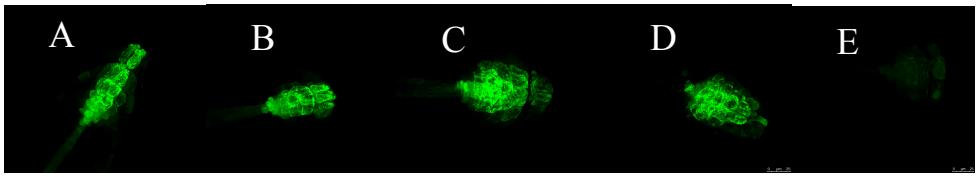


Figura 2. Imágenes de microscopá confocal de la línea mutante DR5:GFP de *Arabidopsis* tratadas con diferentes concentraciones de harmalina. A) Plántula control, B) 10 µM, C) 13 µM, D) 16 µM y E) 19 µM.

Estos resultados sugieren una relación entre el tratamiento con harmalina y la desaparición de auxina en las radículas tratadas, lo que podría llevar a una reducción de la división celular y a una alteración en el contenido de otras hormonas vegetales, que explicaría el fenotipo observado. El hecho de que la desaparición se produzca a una concentración mayor que la IC_{50}, y cuando ya se detecta el fenotipo característico del tratamiento con harmalina (meristemos acortados, raíces engrosadas, incremento de pelos radiculares), hace pensar que la desaparición de auxina no es la causa sino la consecuencia del modo de acción de la harmalina. El fuerte acortamiento de los meristemos de *Arabidopsis* tratados, junto con el aumento de células vasculares, pelos radiculares e inhibición tardía del contenido de auxina (una vez que los efectos de harmalina ya son evidentes), sugieren un rol de las citoquininas en el modo de acción de la harmalina. El fuerte potencial fitotóxico de la harmalina, a concentraciones especialmente bajas para un producto natural, convierten a este indol alcaloide en un compuesto prometedor como regulador del crecimiento vegetal.

Referencias

CHAPMAN EJ & ESTELLE M (2009) Cytokinin and auxin intersection in root meristems. *Genome Biology,* **10**, 210.

DUKE SO, ROMAGNI JP & DAYAN FE (2000) Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. *Crop Protection*, **19**, 583-589.

EVANS AT & CROFT SL (1987) Antileishmanial activity of harmaline and other tryptamine derivatives. *Phytotheremediation Research*, **1**, 25–27.

FAROUK L, LAROUBI A, ABOUFATIMA R, BENHARREF A & CHAIT A (2007) Evaluation of the analgesic effect of alkaloid extract of *Peganum harmala* L.: Possible mechanisms involved. *Journal of Ethnopharmacology*, **115**, 449–454.

HERRAIZ T, GONZÁLEZ D, ANCÍN-AZPILICUETA C, ARÁN VJ & GUILLÉN H (2010) β-Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 839–845.

JIANG K & FELDMAN LJ (2005) Regulation of root apical meristem development: a review. *Annual Reviews in Cell Developmental Biology*, **21**, 485-509.

OTTENSCHLAGER I, WOLFF P, WOLVERTON C, BHALERAO RP, SANDBERG G, ISHIKAWA H, EVANS M & PALME K (2003) Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **100**, 2987–2991.

PENNACCHIO M, JEFFERSON LV & HAVENS K (2005) *Arabidopsis thaliana*: A new test species for phytotoxic bioassays. *Journal of Chemical Ecology,* **31**, 1877-1885.

RHARRABE K, BAKRIM A, GHAILANI N & SAYAH F (2007) Bioinsecticidal effect of harmaline on *Plodia interpunctella* development (Lepidoptera: Pyralidae). *Pesticide Biochemistry Physiology*, **89**, 137–145.

SÁNCHEZ-MOREIRAS AM, GRAÑA E, DÍAZ-TIELAS C, LÓPEZ-GONZÁLEZ D, ARANITI F, CELEIRO M, TEIJEIRA M, VERDEGUER M & REIGOSA MJ (2018) Elucidating the phytotoxic potential of natural compounds. *En* Sánchez-Moreiras AM, Reigosa MJ (Eds), Advances in Plant Ecophysiology Techniques. Springer, NY, USA, ISBN 978-3-319-93232-3, pp. 419-438.

SARKAR AK, LUIJTEN M, MIYASHIMA S, LENHARD M, HASHIMOTO T, NAKAJIMA K, SCHERES B, HEIDSTRA R & LAUX T (2007) Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature*, **446**, 811-814.

Bioherbicide potential of harmaline on *Arabidopsis* metabolism

Summary: Harmaline is an alkaloid indole found in seeds of *Peganum harmala*. Tested on *Arabidopsis* seedlings, showed a strong inhibitory activity on the growth of roots and shoots, inducing the shortening and thickening of the roots as well as an increase of root hairs. IC_{50} and IC_{80} values after treatment with harmaline were as low as 14 and 29 μM, respectively. The ultrastructural analysis showed significant aberrations in the development of the radicle, since differentiation and transition zones showed strong tissue disorganization with cells of different sizes and shapes that did not maintain the control pattern. In addition, the root hairs emerged along the entire treated root, also very close to the apical meristem, which could be due to the reduction of the length of the meristem. Strong differences in auxin content were also detected between control and harmaline treated-roots (10 to 20 μM). All these results demonstrate the important phytotoxic capacity of this alkaloid and open the door to its study in future weed control experiments.

Keywords: harmaline, *Arabidopsis*, mode of action, auxins.

Potencial herbicida de aceites esenciales de plantas mediterráneas para el control de *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv

LLORENS JA[1], FÉRNANDEZ U[2], TORRES N[3], GÓMEZ DE BARREDA D[4], OSCA JM[5], SÁNCHEZ-MOREIRAS A[6], VERDEGUER M[7].

[1, 2, 3, 7] Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universitat Politécnica de València, Camino de Vera, s/n, 46020, Valencia, SPAIN.
juanllom2@qim.upv.es, ulferto@alumni.upv.es, natorpa@etsiamn.upv.es, merversa@doctor.upv.es
[4,5] Departamento de Producción Vegetal, Universitat Politécnica de València, Camino de Vera, s/n, 46020, Valencia, SPAIN.
diegode@btc.upv.es, josca@prv.upv.es
[6] Departamento de Bioloxía vexetal e ciencias do solo, Universidad de Vigo, Campus Lagoas-Marcosende, 36310 Vigo, SPAIN.
adela@uvigo.es

Resumen: En este trabajo se estudió el potencial de diferentes aceites esenciales de las especies mediterráneas *Eriocephalus africanus*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Thymbra capitata*, *Mentha x piperita* y *Santolina chamaecyparissus*, para el control de *Echinochloa crus-galli*, una de las arvenses más problemáticas en el cultivo del arroz y con incidencia en numerosos cultivos a nivel mundial.

Los aceites se ensayaron *in vitro* y, en condiciones de invernadero, en pre emergencia a diferentes dosis, para analizar su potencial para controlar esta arvense y determinar las dosis más adecuadas.

Todos los aceites esenciales estudiados demostraron efectos fitotóxicos tanto *in vitro* como en invernadero frente a *E. crus-galli*, dependiendo los efectos de la dosis suministrada. Los mejores resultados *in vitro* se obtuvieron con los aceites esenciales de *T. capitata*, seguido de los aceites de *Mentha x piperita* y *E. camaldulensis*. En los ensayos en invernadero, después de cuatro semanas, el aceite esencial de *S. chamaecyparissus* fue el más efectivo, reduciendo la germinación de *E. crus-galli* un 59,3%. Le siguieron en efectividad los aceites esenciales de *E. camaldulensis* y *T. capitata*.

Palabras clave: actividad herbicida, aceites esenciales, control de arvenses, *Echinochloa crus-galli*, herbicidas naturales, germinación

1. Introducción

El género *Echinochloa* pertenece a la familia Poaceae. Incluye un número importante de las malas hierbas más problemáticas que se encuentran en los cultivos de arroz en todo el mundo. Comprende alrededor de unas 50 especies, anuales y perennes. Algunas se adaptan bien a las condiciones húmedas y con frecuencia germinan y crecen en agua durante todo su ciclo de vida. Debemos destacar entre ellas *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. y *E. colona* (L.) Link. Ambas especies se encuentran en regiones templadas y tropicales de casi todo el mundo. Se presentan como malas hierbas en más de 60 países, 36 cultivos diferentes, y se concentran principalmente en una zona latitudinal desde 50 N a 40 S (Holm *et al*., 1991).

Echinochloa crus-galli está ampliamente distribuida y es difícil de clasificar. La aparente diversidad de formas se asocia con una elevada plasticidad fenotípica, con una capacidad de adaptación a gran cantidad de hábitats (Maun y Barrett, 1986). Es variable en forma de crecimiento, momento de floración, arquitectura de las inflorescencias, pigmentación de la antocianina y longitud de hojas. Es una planta estival, con reproducción y propagación por medio de semillas. A nivel mundial es la segunda especie con mayor resistencia a herbicidas, habiendo desarrollado resistencias a 9 mecanismos de acción. En España se han descrito biotipos resistentes a los herbicidas de los grupos B (inhibidores de la enzima cloroplástica acetolactato sintetasa, que cataliza la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada como valina, leucina e isoleucina, y cuya deficiencia provoca una disminución en la síntesis de proteínas que conduce a una caída drástica en la tasa de división celular) y C1 (inhibidores de la fotosíntesis en el Fotosistema II) (Heap, 2019).

En este trabajo se estudió el potencial de diferentes aceites esenciales de las especies mediterráneas *Eriocephalus africanus* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *Thymbra capitata* (L.) Cav., *Mentha x piperita* L. y *Santolina chamaecyparissus* L. como alternativa a los herbicidas sintéticos, para el control de *E. crus-galli*. Estos aceites ya habían demostrado su potencial herbicida para el control de especies arvenses en trabajos previos (Grosso *et al*., 2010; Verdeguer, 2011; Ibañez, 2017).

2. Material y Métodos

Las semillas de *E. crus-galli* utilizadas en los diferentes ensayos fueron adquiridas a la empresa Herbiseed.

Los ensayos *in vitro* se realizaron en cámara de germinación de la marca Climas modelo APG-GROW. Se colocaron 10 semillas en placas Petri de 9 cm de diámetro utilizando como sustrato papel de filtro de 75 g/m^2 de espesor (dos discos por debajo y dos discos por encima de las semillas) humedecidos con 6 ml de agua o la concentración correspondiente de aceite esencial. Los tratamientos ensayados se recogen en la Tabla 1. Por cada tratamiento se realizaron 10 repeticiones. Las placas se sellaron con Parafilm y se incubaron durante 14 días, a 30,0±0,1ºC durante 16 horas de luz, y 20,0±0,1ºC

durante 8 horas de oscuridad. Se llevaron a cabo conteos de las semillas germinadas en todas las placas a los 3, 5, 7, 10 y 14 días del comienzo del ensayo.

Tabla 1. Tratamientos aplicados en los ensayos *in vitro*.

Concentración (µL/mL)	**Aceites esenciales**				
	T. capitata	***M. x piperita***	***E. camaldulensis***	***E. africanus***	***S. chamaecyparissus***
0 (control)	x	x	x	x	x
0,25	x	x	x	x	x
0,50	x	x	x	x	x
1,0	x	x	x	x	x
2	x	x	x	x	x
4	-	-	-	x	x
8	-	-	-	x	x

El ensayo en invernadero se realizó en el mes de agosto de 2016. Se prepararon 10 macetas de 8 x 8 x 7 cm., por cada tratamiento (10 repeticiones). Las macetas se llenaron con 6 g de perlita en la base, y 200 g de suelo agrícola procedente de cultivo de cítricos abandonado localizado en Puzol (Valencia). En cada maceta se colocaron 10 semillas. Los tratamientos aplicados fueron: control (agua) y control Fitoil (agua más Fitoil, producto a base de aceite de soja de la empresa Xeda Italia, utilizado para emulsionar los aceites esenciales, a la dosis de 1 µL/mL), y las dosis de 2, 4 y 8 µL/mL, para cada uno de los aceites ensayados. Se realizó una única aplicación para todos los tratamientos: 30 ml mediante riego. Se realizaron conteos periódicos de las semillas germinadas en cada maceta, durante 4 semanas. Durante este tiempo las macetas fueron mantenidas a capacidad de campo, regándolas cada dos días.

Los datos se procesaron mediante el paquete estadístico Statgraphics Centurion. Se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA) a los resultados obtenidos, verificando previamente la homocedasticidad de los datos mediante el test de Levene. Los porcentajes de germinación se transformaron antes de proceder a realizar el ANOVA mediante la fórmula $y=\arcsen\sqrt{x}$, donde x era el porcentaje de germinación en tanto por uno. El ANOVA se realizó utilizando el test de comparación múltiple de Fisher (intervalos LSD, *Least Significant Difference*) para la separación de medias, con un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0.05$).

3. Resultados y Discusión

En los ensayos *in vitro*, el aceite esencial que mayor potencial herbicida mostró para el control de la germinación de las semillas de *E. crus-galli*, fue el de *T. capitata*, que inhibió un 100 % la germinación en las dosis 0,5, 1 y 2 µL/mL, seguido del aceite esencial *Mentha* x *piperita*, con 100 % de inhibición a la dosis de 2 µL/mL. Les siguió en efectividad el aceite esencial de *E. camaldulensis* y por último los aceites esenciales de *E. africanus* y *S. chamaecyparissus* (Tabla 2). Se realizó un segundo ensayo con estos dos últimos aceites esenciales, aplicándolos a dosis más altas (4 y 8 µL/mL) para

conseguir un mayor control en la germinación de la arvense y se obtuvieron los porcentajes máximos de inhibición de 98,8 y 96,4% respectivamente (Tabla 3).

Tabla 2. Germinación de semillas de *E. crus-galli* tratadas con aceites esenciales de *T. capitata, Mentha x piperita, E. camaldulensis, E. africanus* y *S. chamaecyparissus in vitro.*

Germinación (%) ± e.e.					
Concentración (µL/mL)	***T. capitata***	***Mentha x piperita***	***E. camaldulensis***	***E. africanus***	***S. chamaecyparissus***
0 (control)	84,0 ± 3,4 a	84,0 ± 3,4 a	79,0 ± 5,3 a	71,0 ± 4,6 a	71,0 ± 4,6 ab
0,25	8,0 ± 4,7 b	52,0 ± 7,0 b	77,0 ± 4,0 ab	62,2 ± 6,2 ab	82,0 ± 3,6 a
0,5	0,0±0,0	27,0 ± 9,1 c	56,0 ± 6,0 b	54,0 ± 6,9 b	75,0 ± 4,5 ab
1	0,0±0,0	5,0 ± 4,0 d	31,0 ± 6,2 c	49,0 ± 4,8 bc	63,0 ± 7,5 b
2	0,0±0,0	0,0±0,0	16,0 ± 5,2 d	39,0 ± 3,5 c	32,0 ± 6,6 c

Tabla 3. Germinación de semillas de *E. crus-galli* tratadas con aceites esenciales de *E. africanus* y *S. chamaecyparissus in vitro.*

Germinación (%) ± e.s.		
Concentración (µL/mL)	***E. africanus***	***S. chamaecyparissus***
0 (control)	84,0 ± 3,1 a	84,0 ± 3,1 a
4	15,0 ± 4,5 b	7,0 ± 2,6 b
8	1,0 ± 1,0 c	3,0 ± 3,0 b

En los ensayos en invernadero, después de cuatro semanas, el aceite esencial de *S. chamaecyparissus* fue el más efectivo, reduciendo la germinación de *E. crus-galli* un 59,3%. Le siguieron en efectividad los aceites esenciales de *E. camaldulensis* y *T. capitata* (Tabla 4).

Existen estudios previos que demuestran el potencial herbicida de diferentes aceites esenciales para el control de arvenses y en concreto para controlar *E. crus-galli* (Angelini *et al*., 2003; Vishwakarmaa y Mittala, 2014). En nuestros ensayos las dosis utilizadas son menores que las probadas en otros trabajos (Önen *et al*., 2002).

El potencial herbicida de los aceites esenciales que se evaluaron tanto *in vitro* como en invernadero dependió de la dosis a la que se aplicaron y de las condiciones en las que actuaron. No se obtuvieron los mismos resultados *in vitro* que en condiciones de invernadero, perdiendo efectividad los aceites al pasar a condiciones de invernadero. Esto pudo ser debido a la volatilización de algunos de los componentes presentes en lo aceites esenciales o a la baja persistencia de sus compuestos (Pavela and Benelli, 2016).

Los aceites esenciales ensayados mostraron efectos fitotóxicos frente a *E. crus-galli* en condiciones de invernadero, por lo que presentan buen potencial como herbicidas naturales para el control de esta arvense. Es necesaria una formulación adecuada de los mismos para dotarlos de mayor estabilidad y poder usarlos a gran escala, y también se deben realizar ensayos en condiciones de campo para verificar su eficacia.

Tabla 4. Germinación de semillas de *E. crus-galli* tratadas con aceites esenciales de *T. capitata, Mentha x piperita, E. camaldulensis, E. africanus y S. chamaecyparissus* en ensayo de invernadero.

	Germinación de semillas E. crus-galli (%) ± e.e.				
Concentración (µL/mL)	***T. capitata***	***Mentha* x *piperita***	***E. camaldulensis***	***E. africanus***	***S. chamaecyparissus***
0 (control agua)	89,0 ± 2,8 a	89,0 ± 2,8 a	89,0 ± 2,8 a	89,0 ± 2,8 a	89,0 ± 2,8 a
0 (control agua + Fitoil)	86,0 ± 2,7 a	86,0 ± 2,7 a	86,0 ± 2,7 a	86,0 ± 2,7 a	86,0 ± 2,7 ab
2	70,0 ± 4,9 b	63,0 ± 5,4 b	63,0 ± 4,0 b	70,0 ± 3,9 b	74,0 ± 5,4 bc
4	58,0 ± 5,3 bc	61,0 ± 5,9 b	59,0 ± 5,5 b	66,0 ± 5,6 b	64,0 ± 4,8 c
8	45,0 ± 6,4 c	55,0 ± 4,5 b	39,0 ± 4,1 c	60,0 ± 5,4 b	35,0 ± 7,8 d

Referencias

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**: 6158-6164.

GROSSO C, COELHO JA, URIETA J, 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**: 11007–11013.

HEAP I (2019). The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. Accedido Viernes 31 mayo 2019. www.weedscience.org

HOLM LG, PLUCKNETT DL, PANCHO JV, HERBERGER JP (1991). *The World's Worst Weeds: Distribution and Biology*. The University Press of Hawaii, Malabar, Florida, USA.

IBAÑEZ E. (2017) *Estudio del potencial herbicida del aceite esencial de Mentha longifolia (L.) L. para su posible aplicación como herbicida natural frente a arvenses de cultivos mediterráneos*. Proyecto final de carrera. Universitat Politècnica de València. España.

MAUN MA, BARRETT SCH (1986). The biology of Canadian weeds. 77. Echinochloa crus-galli (L.) Beauv. *Canadian Journal of Plant Science* **66**: 739-759.

ÖNEN H, OZER Z, TELCI I (2002) Bioherbicidal effects of some plant essential oils on different weed species. *Journal of Plant Diseases and Protection*, Sonderheft XVIII 597-605.

PAVELA R, BENELLI G (2016). Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints. *Trends in Plant Science* **21**: 1000-1007.

VERDEGUER M (2011) *Fitotoxicidad de aceites esenciales y extractos acuosos de plantas mediterráneas para el control de arvenses.* Tesis doctoral. Universitat Politècnica de València. España.

VISHWAKARMA GS & MITTAL S (2014) Bioherbicidal Potential of Essential Oil from Leaves of *Eucalyptus tereticornis* against *Echinochloa crus- galli* L. *Journal of Biopesticides* **7**: 47-53.

Herbicidal potential of essential oils from Mediterranean plants to control *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv

Summary: In this work, the potential of different essential oils of the Mediterranean species *Eriocephalus africanus* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *Thymbra capitata* (L.) Cav., *Mentha* x *piperita* L. and *Santolina chamaecyparissus* L. to control *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. was studied, being *E. crus-galli* one of the most problematic weeds in rice cultivation and with incidence in numerous crops worldwide.

The oils were tested *in vitro* and also under greenhouse conditions, in pre-emergence at different doses, to analyze their potential to control this plant and to determine the most appropriate doses.

All the essential oils studied showed phytotoxic effects both *in vitro* and under greenhouse conditions against *E. crus-galli*, the observed effects depending on the dose supplied. The best *in vitro* results were obtained from the essential oils of *T. capitata*, followed by *Mentha* x *piperita* and *E. camaldulensis*. In the greenhouse trials, after four weeks, the essential oil of *S. chamaecyparissus* was the most effective, reducing the germination of *E. crus-galli* by 59.3%, followed by the essential oils of *E. camaldulensis* and *T. capitata*.

Keywords: herbicidal activity, essential oils, weed control, *Echinochloa crus-galli*, natural herbicides, germination

Aprendiendo de la amapola como asesina profesional

MUÑOZ-TRIVIÑO M[1,2,3], LIN Z[2,3], NOWACK M[2,3]

[1] Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences (IBERS), Aberystwyth University, Aberystwyth, UNITED KINGDOM.
mam124@aber.ac.uk
[2] Department of Plant Biotechnology and Genetics, Ghent University, Ghent, BELGIUM.
[3] VIB Center for Plant Systems Biology, Ghent, BELGIUM.

Resumen: La autoincompatibilidad (SI) es un mecanismo utilizado por las plantas con flores para prevenir la autofertilización, que de otro modo daría como resultado la pérdida de la condición física de la planta. En *Papaver rhoeas* (amapola), la interacción entre los determinantes SI femeninos y masculinos, PrsS y PrpS, conduce a la detención del crecimiento del tubo polínico y desencadena una vía de señalización, que finalmente lleva a la muerte celular programada (PCD). Mecánicamente, *Papaver* SI representa uno de los sistemas SI mejor caracterizados, ayudado por la disponibilidad de su estudio *in vitro*. Recientemente, la transferencia de ambos determinantes S a Arabidopsis, que es autocompatible, hace que Arabidopsis sea totalmente autoincompatible. La disponibilidad de este sistema Arabidopsis SI que imita funcionalmente al de *Papaver*, nos permite utilizar herramientas genéticas que antes no estaban disponibles para estudiar *Papaver* SI. El entender el funcionamiento de este sistema ofrecerá, entre otras aplicaciones, el desarrollo de herbicidas que induzcan PCD de forma específica y dirigida.

Palabras clave: Desarrollo de herbicidas, *Papaver rhoeas*, Arabidopsis, polen, autoincompatibilidad (SI), muerte celular programada (PCD).

1. Introducción

La interacción entre el estigma y el polen propio en *Papaver rhoeas* desencadena una respuesta de autoincompatibilidad (SI) que evita su auto-fertilización. Esta respuesta detiene el crecimiento del tubo polínico y activa una vía de señalización que, finalmente, conduce a la muerte celular programada (PCD) del gameto masculino. Este mecanismo SI facilita la polinización cruzada, que da lugar a una alta recombinación genética en futuras generaciones. Se ha demostrado que este proceso de SI se puede desencadenar experimentalmente *in vitro*, germinando polen y provocando la interacción de lo que hoy conocemos como determinantes de SI femenino y masculino, PrsS y PrpS (Frankin-Tong *et al.*, 1988). Ambos determinantes fueron transferidos a Arabidopsis, que es autocompatible, y su interacción dio lugar a Arabidopsis autoincompatible (de Graaf *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2015). La disponibilidad de este sistema de SI heterólogo en

Arabidopsis, imitando funcionalmente al de *Papaver*, nos permite utilizar herramientas genéticas, que anteriormente no estaban disponibles, para estudiar los mecanismos fisiológicos y moleculares implicados en la SI de *Papaver*. Hasta ahora, sabemos que en ambas especies la elongación del tubo polínico se detiene rápidamente en los primeros cinco minutos después de la interacción de ambos determinantes. Además, el pH cae en los primeros cinco minutos después de una interacción incompatible de pH 7 a pH 6,5 y continúa disminuyendo hasta que alcanza un pH 5,5. Esta dramática acidificación citosólica se define como un regulador de la PCD (Fendrych *et al*., 2014). Activa diferentes eventos de la red de señalización SI-PCD, incluida la formación de focos punteados de actina y promueve una actividad similar a la DEVDase/caspasa-3 (Bosch and Franklin-Tong, 2007; Wilkins *et al.*, 2015). Una de las aplicaciones, después de desentrañar los caminos de este proceso, será el desarrollo de herbicidas biológicos que provoquen PCD de forma controlada en malas hierbas específicas de interés.

2. Material y Métodos

Para su estudio se observó, mediante microscopía confocal, polen de Arabidopsis expresando PrpS y marcadores de proteínas fluorescentes específicas, para caracterizar los procesos celulares y subcelulares que se producen durante el evento SI-PCD.

Por otro lado, se indujeron mutaciones aleatorias en semillas de Arabidopsis SI, seguidas de un análisis genético inverso para individuos que mostraron fenotipo autocompatible. Los genes considerados de interés se estudiarán utilizando la tecnología CRISPR-Cas9 y líneas con inserción T-DNA.

3. Resultados y Discusión

Hemos optimizado el ensayo SI *in vitro* con la adición de PrsS en medio líquido a polen expresando PrpS, para la obtención de imágenes de células vivas utilizando el sistema de Arabidopsis. Hemos confirmado que la respuesta de SI en el polen de Arabidopsis desencadena características distintivas clave de la red de señalización *Papaver* SI-PCD, incluida una rápida acidificación citosólica, formación de focos de actina punteados y generación de actividad similar a la DEVDase/caspasa-3. La capacidad de usar marcadores codificados genéticamente nos permite una evaluación espaciotemporal imposible en el sistema de Papaver. Usando marcadores del tonoplasto, observamos que la estructura reticulada de las vacuolas comienza a desorganizarse en los primeros 30 minutos después de la inducción de la respuesta SI, pero después de la caída inicial del pH citosólico, lo cual las descarta como responsables de esa acidificación. Usando el indicador Yellow Cameleon (YC3.6), confirmamos la presencia de un rápido aumento en el Ca^{2+} citosólico tras inducir SI, y también encontramos un aumento del Ca^{2+} en el núcleo y la ruptura de la envoltura nuclear varias horas después de la interacción PrpS-PrsS. Estos datos establecen la robustez de estas líneas de Arabidopsis

para estudiar los cambios celulares inducidos por la respuesta de autoincompatibilidad. Como resultado del análisis genético inverso, se determinarán regiones e interés para el posterior análisis de genes específicos como posibles candidatos implicados en la respuesta SI-PCD.

Referencias

BOSCH M & FRANKLIN-TONG VE (2007). Temporal and spatial activation of caspase-like enzymes induced by self-incompatibility in *Papaver* pollen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA **104**, 18327–18332.

DE GRAAF BH, VATOVEC S, JUÁREZ-DÍAZ JA, et al. (2012). The *Papaver* self-incompatibility pollen S-determinant, PrpS, functions in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* **22**, 154–159.

FENDRYCH M, VAN HAUTEGEM T, VAN DURME M, et al. (2014). Programmed cell death controlled by ANAC033/SOMBRERO determines root cap organ size in *Arabidopsis*. *Current Biology* **24**, 931–940.

FRANKLIN-TONG VE, LAWRENCE MJ & FRANKLIN FCH (1988). An *in vitro* bioassay for the stigmatic product of the self-incompatibility gene in *Papaver rhoeas* L. *New Phytologist* **110**, 109–118.

LIN Z, EAVES DJ, SANCHEZ-MORAN E, FRANKLIN FC & FRANKLIN-TONG VE (2015). The *Papaver rhoeas* S determinants confer self-incompatibility to *Arabidopsis thaliana* in planta. *Science* **350**, 684–687.

WANG L, LIN Z, TRIVIÑO M, NOWACK MK, FRANKLIN-TONG VE & BOSCH M (2018). Self-incompatibility in *Papaver pollen*: programmed cell death in an acidic environment. *Journal of Experimental Botany* **406**, 1-11.

WILKINS KA, BOSCH M, HAQUE T, TENG N, POULTER NS, FRANKLIN-TONG VE (2015). Self-incompatibility-induced programmed cell death in field poppy pollen involves dramatic acidification of the incompatible pollen tube cytosol. *Plant Physiology* **167**, 766–779.

Learning from field poppy as a professional killer

Summary: The interaction between the stigma and self-pollen in *Papaver rhoeas* leads to a self-incompatibility (SI) response which avoids self-fertilization by arresting pollen tube growth and triggering a signalling pathway ultimately leading to programmed cell death (PCD) in pollen tubes. This SI mechanism gives an advantage to cross pollination and therefore a higher genetic recombination in the next generations. It was demonstrated that the SI process could be carried out in in vitro germinated pollen by the interaction of the proteins now described as female and male SI determinants, PrsS and PrpS (Frankin-Tong et al., 1988). These two determinants were transferred to Arabidopsis, which is self-compatible (SC), as their interaction rendered Arabidopsis fully self-incompatible (de Graaf et al., 2012; Lin et al., 2015). Availability of this Arabidopsis SI system that functionally mimics that of Papaver, allows us to use genetic tools previously unavailable

for studying the physiological and molecular mechanisms involved in Papaver SI. So far, we know that for both the Papaver and the heterologous Arabidopsis SI system pollen tube elongation is rapidly stopped within the first five minutes after the interaction of both determinants. Furthermore, the pH drops in the first five minutes after an incompatible interaction from pH 7 to pH 6.5 and keeps decreasing until it reaches pH 5.5. This dramatic cytosolic acidification is defined as a regulator of developmental PCD (Fendrych et al., 2014). It triggers different key hallmark features of the SI-PCD signalling network, including formation of punctate actin foci and generation of DEVDase/caspase-3-like activity (Bosch and Franklin-Tong, 2007; Wilkins et al., 2015). One of the applications after unravelling the paths of this process may be the development of biological herbicides that could specifically induce PCD in weeds.

Keywords: Herbicide development, *Papaver rhoeas*, Arabidopsis, pollen, self-incompatibility (SI), programmed cell death (PCD).

¿Reduce la rotación en el cultivo del arroz las infestaciones de *Echinochloa* spp.? Resultados de prospecciones en Aragón

PARDO G [1], MARÍ AI[2], AIBAR J[3], CIRUJEDA A[1]

[1] Departamento de Sanidad Vegetal, Laboratorio de Malherbología, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza, ESPAÑA
gpardos@aragon.es, acirujeda@aragon.es
[2] Departamento de Sanidad Vegetal, Laboratorio de Malherbología, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza, ESPAÑA.
aimari@cita-aragon.es
[3] Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, CITA Universidad de Zaragoza, 22027 Huesca, ESPAÑA.
jaibar@unizar.es

Resumen: La gestión de las malas hierbas en el cultivo de arroz es un problema común a todas las zonas arroceras de España siendo *Echinochloa* spp. la mala hierba más frecuente y problemática. Por otra parte, se constata una creciente falta de eficacia de las escasas materias herbicidas autorizadas para hacerle frente, en muchos casos por la aparición de resistencias. En este sentido, la rotación de cultivos, en los suelos que sea posible, podría contribuir a mitigar el problema. En este trabajo se presentan los resultados de la evolución de *Echinochloa* spp. durante dos años en parcelas de arroz en monocultivo y en parcelas con otros cultivos, pero con precedentes de cultivo de arroz. Estos cultivos fueron, principalmente, raigrás y festuca. Las siegas en la festuca contribuyeron a reducir la densidad de esta especie, pero se encontraron individuos con tamaño pequeño que rebrotan tras la siega y son capaces de producir semillas en algunos de los campos en los que no se ha sembrado arroz durante dos años, lo que sugiere que la rotación deberá ser más larga o más amplia.

Palabras clave: métodos culturales, raigrás (*Lolium multiflorum* Lam.), festuca (*Festuca arundinacea* Schreber.), alfalfa, monocultivo

1. Introducción

La falta de control sobre las malas hierbas en campos de arroz es un serio problema a pesar de que las inundaciones impiden la emergencia de muchas especies. Dos de los grupos de malas hierbas más problemáticos a nivel europeo en este cultivo son *Echinochloa* spp. y algunas especies de la familia *Cyperaceae* (Kraehmer *et al.,* 2016). Debido a la gran dependencia de agua de riego de este cultivo, normalmente se

seleccionan para ello parcelas con los suelos arcillosos poco permeables con drenaje lento y así poder ahorrar recursos hídricos. En muchas zonas arroceras los agricultores no rotan con otros cultivos, ya que las propiedades físicas de las parcelas dedicadas al arroz a menudo tienen malas características para poder implantar otros cultivos, lo que conlleva problemas crecientes de manejo de malas hierbas, especialmente de *Echinochloa* spp. En Aragón, una sequía inusual durante los años 2011-2012 provocó falta de disponibilidad de agua y los agricultores arroceros se vieron obligados a reducir la superficie de siembra a un tercio del área dedicada a este cultivo en años anteriores, cultivando festuca en las zonas marginales y cereales u otros forrajes en zonas de mejores suelos. Con esta situación de rotación, que no es muy frecuente en campos de arroz, se aprovechó para i) describir la flora en las parcelas con cultivos implantados tras arroz en monocultivo y ii) averiguar si las rotaciones reducen la abundancia y frecuencia de *Echinochloa* spp.

2. Material y Métodos

En este trabajo se exponen los resultados de 10 parcelas en las que se llevó a cabo el seguimiento de la flora durante la primavera, verano y otoño de los años 2014 y 2015 (Tabla 1). Éstas se visitaron cada año en tres momentos y la vegetación se iba anotando mientras se recorrían en zigzag durante, al menos, 30 minutos y hasta que no se encontraban nuevas especies (Cirujeda *et al*., 2011). La abundancia de cada una de estas se reflejó mediante la escala CEB la cual relaciona la densidad con la cobertura de suelo ocupada permitiendo una mejor estimación en las categorías de abundancias bajas. Los rangos de esta escala corresponden a <1% (plantas raras), 1-7% (<1 planta m^{-2}), 7-15% (> 1 planta m^{-2}), 15-30%, 30-50%, 50-70%, 70-85%, 85-93% y 93-100%. Posteriormente se asignó el valor medio de estos intervalos a cada observación. Las especies desconocidas se identificaron en laboratorio con la ayuda de Carretero (2004) y García-Rollán (2005). Se realizó el análisis de los datos agrupados por cultivo y momento de muestreo. Se calcularon los promedios de las coberturas individuales y totales.

Tabla 1. Cultivos en las distintas parcelas prospectadas en la zona de Zaragoza. Np: no prospectada.

Código Parcela	2013	2014	2015
Festuca 1	No cultivo (np)	Festuca	Festuca
Festuca 2	No cultivo (np)	Festuca	Festuca
Raigrás 1	Raigrás (np)	Raigrás	Raigrás
Raigrás 2	Raigrás (np)	Raigrás	Raigrás
Festuca mezcla 1	Trigo (np)	Festuca	Festuca
Festuca mezcla 2	Trigo (np)	Festuca	Trigo
Festuca 3	Arroz (np)	Festuca	Festuca
Festuca 4	Arroz (np)	Festuca	Festuca
Arroz 1	Arroz (np)	Arroz (np)	Arroz
Arroz 2	Arroz (np)	Arroz (np)	Arroz

3. Resultados y Discusión

Festuca en su primer y segundo año, dos o tres años tras cultivar arroz

En primavera se encontró la mayor riqueza de especies (en un caso alcanzando hasta 20) y de cobertura de malas hierbas (hasta 40%) comparado con los resultados en verano y otoño (Tabla 2). Esto puede ser debido a que en los conteos de primavera las especies de otoño aún estaban presentes y las especies de primavera con germinaciones tempranas ya estaban emergidas. Esta tendencia sólo ocurrió en el primer año de festuca, probablemente debido a que muchas malas hierbas desaparecieron gradualmente con las siegas que se realizan en el cultivo. Éstas, además, contribuyeron a que la riqueza de especies de malas hierbas y especialmente su cobertura fueran muy bajas en el segundo año de cultivo. Aun así, se encontró *E. crus-galli* con una cobertura de suelo de 0.2 % en los conteos de otoño en los campos Festuca mezcla 1 y 2, y Festuca 3 y en un 4 y 11% de abundancia en el campo Festuca 4.

Raigrás en su primer y segundo año, dos o tres años después de cultivar arroz

La mayor riqueza de especies arvenses se observó en campos de raigrás durante la primavera y verano (Tabla 2). En el campo Raigrás 2 la riqueza de especies aumentó desde la primera evaluación, pero el resto fluctuó tal y cómo pasó en Raigrás 1. En estos campos, por lo general, la cobertura de malas hierbas fue menor en primavera comparado con el resto de estaciones y disminuyó en 2015 (Tabla 2). Por lo tanto, parece que los problemas de abundancia de malas hierbas derivados del monocultivo de arroz van disminuyendo cuando se implanta un cultivo de forraje, aunque las especies problemáticas pueden estar emergiendo durante los primeros dos años.

No existen umbrales de tratamiento oficiales para este cultivo en España, pero las compañías privadas establecen algunos criterios de calidad dependiendo de la cobertura de mala hierba observada en un conteo visual: calidad suprema: 0%; Premium: ≥ 3%; primera clase: 3-8%; segunda clase: 8-25%; ordinaria o tercera clase: >25% (Lloveras & Melines, 2015). Teniendo en cuenta estos rangos, la mayoría de los cortes de los campos prospectados en el primer año tras arroz corresponderían a la calidad de segunda clase, pero en el siguiente año las calidades mejorarían ya que la cobertura de malas hierbas va disminuyendo gracias a las siegas.

Arroz en monocultivo

Los campos de arroz en monocultivo presentaron una riqueza de especies muy baja pero unos valores de cobertura muy elevados de algunas especies. Las especies *E. crus-galli* o *E. oryzoides* estuvieron presentes en todas las parcelas y momentos de muestreo con coberturas en algún caso del 60% (arroz 1, Tabla 2). La Guía de Manejo Integrado para el cultivo de arroz publicada por el Ministerio de Agricultura (MAPAMA, 2017) establece como umbral de tratamiento una cobertura de suelo por malas hierbas superior

al 2% por lo que, desde este punto de vista, *Echinochloa* spp. superaron este umbral sólo en campos de arroz (Tabla 2).

Como es de esperar, la mayor abundancia de *Echinochloa* spp. se observó en las parcelas de arroz en monocultivo (Tabla 2). En una de ellas (Arroz 1, Tabla 2) se produjo la emergencia de abundante *E. oryzoides* cuya densidad disminuyó notablemente después de un tratamiento químico observándose abundancias mucho menores en verano y otoño. También se observa que, en general, hay una disminución de la abundancia de *Echinochloa* spp. en un segundo año de cultivo comparado al primer año de cultivo después del arroz; no obstante, sigue apareciendo esta especie después de dos años de raigrás y en la combinación de cultivos trigo-festuca-festuca. Por ello, es recomendable garantizar un buen asentamiento de los cultivos de siega en el primer año para favorecer la competencia y evitar que esta especie aparezca en las zonas con menor cobertura de cultivo. En este sentido, tener la parcela bien alisada resulta fundamental para, por un lado, realizar una siembra homogénea que procure una emergencia del cultivo rápida y sin claros, y por otro lado para realizar la siega correctamente, sin que queden hijuelos de *Echinochloa* spp. sin segar. Se ha observado que sobre todo *E. crus-galli* tiende a tomar un porte postrado y parte de sus hijuelos permanecen vivos tras el corte consiguiendo espigar y generar nuevas semillas, prolongando la infestación. Hay que tener en cuenta, además, que estas semillas permanecen varios años viables en el suelo.

Tabla 2. Cobertura de *Echinochloa* spp. (%), de malas hierbas totales (%) y riqueza de especies (número) en los diferentes muestreos.

Código Parcela		2014			2015		
		***Echinochloa* spp.**	**Total**	**Riqueza**	***Echinochloa* spp.**	**Total**	**Riqueza**
Festuca 1	P	0	30,2	18	0	1,2	6
	V	0	16,6	10	0	1,6	8
	O	0	16,6	10	0	1,0	5
Festuca 2	P	0	11,0	17	0	0,2	1
	V	0	20,4	10	0	0,2	1
	O	0	0,8	4	0	0,4	2
Raigrás 1	P	0	10,5	13	0	16,0	7
	V	0	27,9	9	0	52,4	10
	O	11	74,7	9	0,2	41,2	7
Raigrás 2	P	0	23,7	7	0	64,4	12
	V	0	80,7	20	0	54,2	15
	O	11	75,9	15	0,2	74,2	15
Festuca mezcla 1	P	0	43,7	15	0	46,0	4
	V	0	24,9	13	0	0	0
	O	0,2	5,2	7	0,2	39,3	12
Festuca mezcla 2	P	0	47,6	15	0	5,0	6
	V	0	23,5	6	0	0,4	2
	O	0,2	0,6	3	0	8,8	6
Festuca 3	P	0,2	31,0	8	0	0	0
	V	0	1,0	5	0	4,8	5
	O	0,2	1,2	6	0	0	0

Festuca 4	P	0	37,7	20	0	11,6	4
	V	4	23,6	7	0	16,4	9
	O	11	35,7	13	0	4,6	4
Arroz 1	P	Np	Np	Np	60	60,4	3
	V	Np	Np	Np	4	64,0	2
	O	Np	Np	Np	4	60,2	5
Arroz 2	P	Np	Np	Np	0	0,4	2
	V	Np	Np	Np	4	4,0	1
	O	Np	Np	Np	0,2	0,4	2

Np: no prospectada, P: primavera, V: verano, O: otoño.

4. Agradecimientos

A Susana Hernández, por facilitarnos la localización de las parcelas.

5. Referencias

CARRETERO JL (2004) *Flora arvense española* (Ed. PHYTOMA-España). PHYTOMA, Valencia, España.

CIRUJEDA A, AIBAR J, ZARAGOZA C (2011) Remarkable changes of weed species in Spanish cereal fields from 1976 to 2007. *Agronomy for Sustainable Development* **31** (4), 675-688.

GARCÍA ROLLÁN M (2005) *Atlas clasificatorio de la flora de España peninsular y balear.* Vol. I y II. (Ed Mundi-Prensa). Ministerio de Agricultura, Madrid, España.

KRAEHMER H, JABRAN K K, MENNAN H, CHAUHAN BS (2016) Global distribution of rice weeds a review. *Crop Protection* **80**, 73–86.

LLOVERAS J & MELINES MA (2015). La calidad en la alfalfa, posibles clasificaciones. La rentabilidad del cultivo se asienta en tres pilares. *Vida rural **395,*** 36-40.

MAPAMA (2017). Guía de Gestión Integrada de Plagas. Arroz. https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/guia_arroz_webprotegida_tcm30-434395.pdf (pág 34). Consultado el 18 de octubre de 2018.

Does crop rotation in rice reduce Echinochloa spp. infestations? Survey results in Aragon

Summary: Weed management in rice fields is a serious problem common to all rice areas in Spain being *Echinochloa* spp. the most frequent and troublesome species. On the other hand, there is a growing lack of effectiveness of the few authorized herbicides to cope with, in many cases due to the emergence of resistance phenomena. In this sense, crop rotation could contribute mitigating this problem. In this study, results of a two-year survey are presented to study the evolution of *Echinochloa* spp. in rice crops in monoculture and fields with other crops but having grown rice previously. These crops were mainly ray-grass, fescue and alfalfa. The mowing in alfalfa and fescue fields contributed to reduce the coverage of this species but some individuals were found with small size and low bearing that demonstrated the ability to adapt to mowing. In rice fields after two years of rotation *E. crus-galli* was found, too, suggesting rotation should be wider/spaced in time.

Keywords: cultural methods, ray-grass, alfalfa, monoculture.

Desarrollo y caracterización de acolchados biodegradables para el control de malas hierbas

MICO M, CLARAMUNT J, VERDÚ AMC, MAS MT

Departament d'Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia, Escola Superior d'Agricultura de Barcelona, Universitat Politècnica de Catalunya. Av. Esteve Terradas 8, 08860 Castelldefels, Barcelona, España.
josep.claramunt@upc.edu, amc.verdu@upc.edu, maite.mas@upc.edu

Resumen: Se ha llevado a cabo el diseño, fabricación en el laboratorio y caracterización mecánica de una serie de mezclas de materiales con la idea de valorar su posible utilidad como hidroacolchados. Se diseñaron ocho mezclas compuestas por una base de pasta de papel reciclado, un material aglomerante y un material fibroso, en su mayoría. Para conocer las características mecánicas de estos materiales se han realizado ensayos de punzonamiento con un texturómetro, que arrojó datos de resistencia y energía. Los datos se sometieron a análisis de la varianza considerando como factores los componentes y se realizó una comparación múltiple de medias de los niveles. Se ha podido constatar que hay diferencias significativas ($P<0.05$) en las propiedades mecánicas dependiendo de qué material, aglomerante o fibroso, se utilice para la formulación del hidroacolchado. Aunque se trata de resultados preliminares o prospectivos para formular un hidroacolchado, en general, se descartan aquellas mezclas que no usen yeso o hidróxido de calcio como aglomerantes en su formulación.

Palabras clave: acolchado líquido, punzonamiento, pasta de papel, aglomerante

1. Introducción

El uso de herbicidas ha sido una herramienta muy eficaz en el control de malas hierbas, aunque hace tiempo que se están utilizando diferentes medidas alternativas o complementarias, siendo la más empleada el uso de plásticos. Es una alternativa interesante, menos agresiva, aunque también comporta problemas medioambientales (Zribi *et al*., 2011).

El uso de plásticos como cubierta para cultivos es económicamente muy costoso y conlleva problemas de contaminación edáfica (López-Marín *et al.*, 2010). El uso de acolchados de papel sólidos, en este contexto, puede ser una alternativa razonable (Haapala *et al.,* 2014). Otra forma de conseguir un acolchado biodegradable sería

aplicar una solución líquida de pasta de papel mezclada con otros componentes que le confirieran características deseables.

El objetivo de este estudio fue encontrar una combinación y proporción de componentes que, junto a una base pasta de papel reciclado, proporcione las características mecánicas necesarias para formar una cubierta biodegradable que pueda ser competitiva frente los plásticos convencionales, por lo que a control de la emergencia/brotación de propágulos de malas hierbas se refiere.

2. Material y Métodos

En el laboratorio se mezcló la pasta de papel reciclado proporcionada por la empresa Saica con diferentes componentes, utilizando un agitador mecánico. Cada mezcla (Tabla 1) se colocó en un molde de 30 x 30 cm conectado a una bomba de vacío para extraer parte del agua, y posteriormente las probetas obtenidas se secaron a 60ºC en una estufa de aire forzado durante 24 h. Se prepararon ocho mezclas distintas de materiales lignocelulósicos, aglomerantes y fibrosos (Tabla 1).

Tabla 1. Componentes de cada una de las ocho probetas elaboradas

Nombre de la probeta	Componente 1 (lignocelulósico)	Componente 2 (aglomerante)	Componente 3 (enriquecido)
A	Paja	Yeso	
B	Sustrato utilizado en cultivo de champiñón	Yeso	
C	Cáscara de arroz	Yeso	
D	Cáscara de arroz	Salvado de arroz	
E	Paja	$Ca(OH)_2$	Fibra kraft
F	Sustrato utilizado en cultivo de champiñón	$Ca(OH)_2$	Fibra kraft
G	Paja		Fibra kraft
H	Sustrato utilizado en cultivo de champiñón		Fibra kraft

De cada tipo de probeta se recortaron 20 especímenes circulares de 35 mm de diámetro que se punzonaron mediante un texturómetro Stable Mycro Systems XT-plus. Durante los ensayos se usó una célula con una capacidad máxima de 500N y con control de desplazamiento a una velocidad de 4mm/min; la sonda de punzonamiento tenía un diámetro de 7.86 mm y se midieron 3 grosores de cada espécimen en la zona punzonada. Se obtuvo, para cada espécimen ensayado, un valor de resistencia al punzonamiento (MPa) y de energía absorbida durante el ensayo hasta el punto de fuerza máxima (J/m^2).

Tanto para resistencia como para energía se realizaron dos análisis de la varianza de un solo factor y comparaciones de medias de los niveles (Tukey): considerando el factor de variación "tipo de probeta", con 8 niveles, y considerando el factor de variación "componente 2", o sea, el tipo de aglomerante, con 3 niveles.

3. Resultados y Discusión

La Figura 1 muestra los promedios y desviaciones estándar de los datos de energía absorbida y resistencia al punzonamiento obtenidos para cada tipo de probeta.

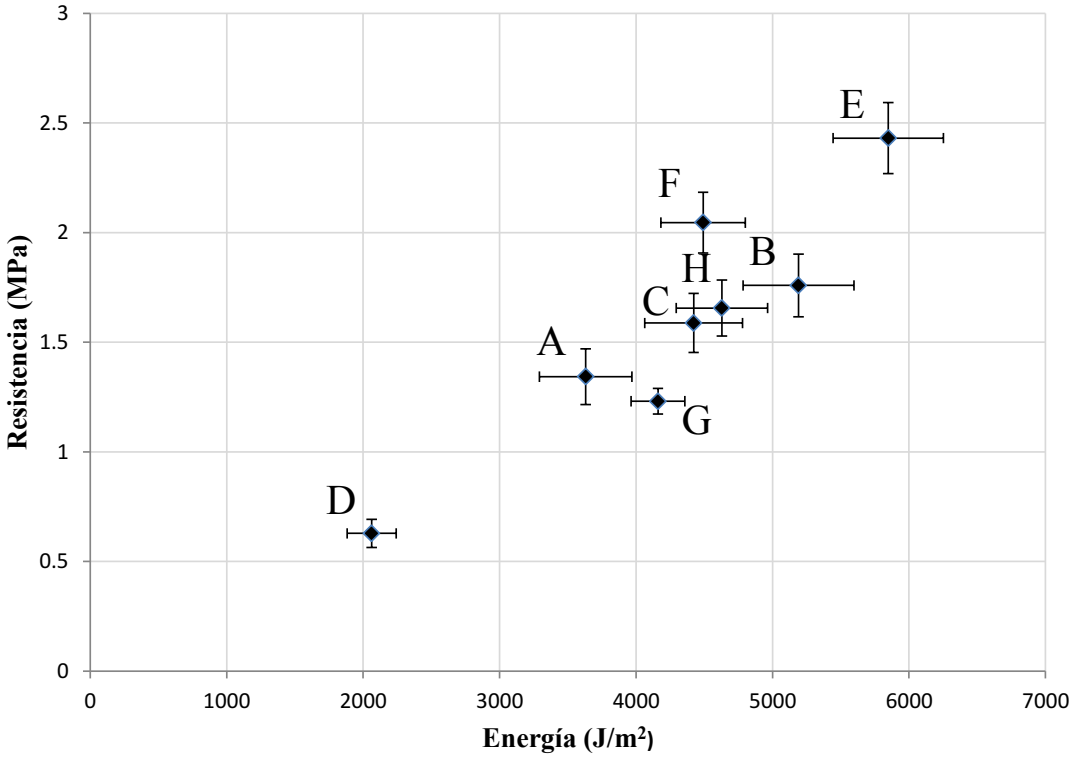


Figura 1. Valores medios de energía absorbida y resistencia al punzonamiento de los ocho tipos de probetas caracterizadas, acompañados de los errores estándar de la media.A: paja+yeso, B: substrato utilizado en cultivo de champiñón+ yeso, C: cascarilla de arroz+yeso, D: cascarilla de arroz+salvado de arroz, E: paja+hidróxido de calcio+fibra, F: substrato utilizado en cultivo de champiñón+hidróxido de calcio+fibra, G: paja+fibra, H: substrato utilizado en cultivo de champiñón+fibra.

El factor "tipo de probeta" fue muy significativo en el análisis de la varianza (P<0.0001 tanto en resistencia como en energía), aunque las medias de los 8 niveles no se separaron nítidamente. Sólo las probetas D y E se diferencian entre ellas y del resto a un nivel de confianza del 95%. Las demás muestras conforman un único grupo de medias, tanto en resistencia como en energía. La muestra E es la que mejores resultados ha dado.

Por otro lado, las mezclas que contenían material aglomerante han dado unos valores promedios de resistencia y de energía asociada bastante bajos, al igual que la que contenía salvado de arroz como material aglomerante.

El efecto aglomerante, con tres niveles, también resultó significativo para ambas variables (P<0.0001 tanto en resistencia como en energía). La comparación de medias permitió separar los tres niveles del factor en resistencia (Tabla 2), mientras que para energía asociada sólo la media obtenida con salvado se diferenció del resto, que fue significativamente mayor (Tabla 2).

Tabla 2. Valores medios de energía y resistencia al punzonamiento de las probetas elaboradas con distinto componente aglomerante (yeso, hidróxido de calcio o salvado). En cada columna, los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas (P=0.05) según el test de Tukey.

Tipo de aglomerante	Energía (J/m^2)	Resistencia (MPa)
Yeso	4414 a	1.56 a
Hidróxido de calcio	4421 a	1.90 b
Salvado	2068 b	0.53 c

Según Hossenbaidi *et al.* (2011) el polietileno, material muy utilizado como cubierta para evitar la emergencia de de malas hierbas, presenta una resistencia a la perforación 3.87 MPa. De entre las probadas, la mezcla de paja, hidróxido de calcio y fibra es la que más se acerca, con un valor promedio de 2.43 MPa.

4. Conclusiones

Las cualidades mecánicas de las mezclas que contienen pasta de papel reciclado, paja, fibra kraft, y yeso o hidróxido de calcio recopiladas indican que se trata de mezclas prometedoras para ser utilizadas como hidroacolchados para el control de emergencia o de brotación de malas hierbas.

Referencias

HAAPALA T, PALONEN P, KORPELA A, AOKAS J (2014) Feasibility of paper mulches in crop production: a review. *Agricultural and Food Science* **23**, 60-79.

HOSSEINABADI F, ZEBARJAD SM, MAZINANI M (2011) Investigation on perforation mechanism of medium density polyethylene. *Materials Science Forum* **675-677**, 387-390.

LÓPEZ-MARÍN J, GONZÁLEZ A, RODRÍGUEZ M (2010) Materiales degradables de acolchado. *Horticultura Global* **289**, 12–20.

ZRIBI W, FACI JM, ARAGÜÉS R (2011) Efectos del acolchado sobre la humedad, temperatura, estructura y salinidad de suelos agrícolas. *ITEA Información Técnica Económica Agraria* **107**, 148–162.

Development and characterisation of biodegradable mulches for weed control

Summary: The design, manufacture in the laboratory and mechanical characterization of several mixtures of materials (composites) has been carried out with the idea of assessing their possible use as hydromulches. Eight mixtures were designed, composed basically of recycled paper pulp, to which they were added binder and fibrous materials. To know the mechanical characteristics of these composites punching tests with a texture analyser were conducted. The data on punching stress and the associated energy were subjected to analyses of variance and mean comparisons. There were significant differences ($P < 0.05$) in the mechanical properties depending on what material, binder or fibrous, were used for the formulation of the hydromulch. Although these are preliminary or prospective results to prepare a hydromulch, in general, the mixtures that did not contain plaster or calcium hydroxide as binder in their formulation could be discarded.

Key words: liquid mulch, punching tests, paper pulp, binder

Estudio del banco de semillas de malas hierbas presentes en dos agro-ecosistemas mediterráneos bajo condiciones edafo-climáticas distintas

GANDÍA ML [1], DEL MONTE JP [2], TENORIO JL [1], SANTÍN-MONTANYÁ M I [1]

[1] Dpto de Medio Ambiente y Agronomía. INIA. Madrid, España.
[2] Dpto de Producción Agraria. ETSIAAB. UPM. Madrid, España.
isantin@inia.es

Resumen: Los estudios de bancos de semillas de malas hierbas son claves para conocer la evolución de la composición florística de los agro-sistemas. En 2018 se puso en marcha un estudio en dos estaciones experimentales, en Madrid y Sevilla, con el objetivo de conocer la respuesta de las poblaciones arvenses, dentro de una misma rotación de cultivos, en dos localidades con distintas condiciones edafo-climáticas, pero ambas en clima mediterráneo, a través del estudio del banco de semillas del suelo. En ambos ensayos se estableció una rotación de cultivos a 4 hojas (trigo, cebada, guisante y colza). Para el estudio de la flora potencial formada por el conjunto de semillas presentes en el suelo, se han llevado a cabo dos metodologías: 1) germinación, donde se midieron parámetros de abundancia y riqueza específica de la flora activa presente en el suelo y 2) extracción, con la que se evaluó la abundancia y riqueza específica de toda la flora presente en dicho suelo.

Los resultados obtenidos en el año inicial del estudio mostraron diferencias en abundancia total y riqueza específica de malas hierbas entre ambas localidades. La abundancia medida a partir de los datos obtenidos por germinación y extracción presentó resultados diferentes entre las localidades. En cada localidad, la flora potencial y la germinada también presentaron diferencias. La riqueza específica en dichas localidades también fue diferente, en el número de individuos y en la composición de esta. Los resultados apuntan una clara influencia de las condiciones edafo-climáticas en la germinación y emergencia de diferentes especies de malas hierbas presentes en el banco de semillas de los agro-ecosistemas mediterráneos.

Palabras clave: Abundancia, climatología, flora arvense, riqueza específica, test de extracción, test de germinación

1. Introducción

En los agro-ecosistemas, el banco de semillas de malas hierbas de un suelo representa la reserva de todas las semillas viables en un campo. Los bancos de semillas del suelo son importantes fuentes de biodiversidad y participan en la ocupación continua de muchos

tipos de hábitats, (Dekker, J. 2011) En los suelos agrícolas existe un continuo flujo de aportes y pérdidas de semillas de malas hierbas, lo que da al banco una dimensión espacial y temporal (Harper et al. 1977)
En función de la permanencia de las semillas en el suelo, se distinguen principalmente 2 tipos de bancos de semillas (Thompson et al. 1979): 1) el banco transitorio, formado por aquellas semillas que permanecen en el suelo menos de 1 año y 2) el banco persistente, formado por aquellas semillas que subsisten más de un año viables en el suelo. De esta forma, la reserva de semillas que se genera en los suelos con dichos bancos permite a las comunidades de malas hierbas recuperarse después de las perturbaciones sufridas. Los bancos sufren, a su vez, alteraciones en su dinámica poblacional que hará que vayan adaptándose a las condiciones cambiantes del medio como una estrategia evolutiva (V. Nichols et al., 2015).

En los agro-ecosistemas mediterráneos, las condiciones climáticas se definen por presentar una marcada estacionalidad en el régimen pluviométrico y unas temperaturas cálidas en verano y frías en invierno. Si bien es una característica general a toda el área mediterránea, existen diferencias en cuanto a las zonas del centro (clima mediterráneo continental) y sur de la península (clima mediterráneo costero). El objeto del presente trabajo es el estudio, en términos cuantitativos y cualitativos, de las diferentes poblaciones de malas hierbas a través del estudio tanto del banco persistente de semillas como del banco transitorio, de dos agro-ecosistemas cerealistas situados en dos localidades con diferentes condiciones de suelo y clima distintos, pero ambas consideradas clima Mediterráneo.

2. Material y Métodos

El ensayo se desarrolla en dos localidades distintas: en la finca “La Canaleja” situada en el término municipal de Alcalá de Henares (Madrid), con una pluviometría media de 450mm al año y una altitud de 610 msnm; y en la finca “El Majano” situada en Coria del Rio (Sevilla), con una pluviometría media de 580mm al año y una altitud de 20 msnm. Desde el punto de vista edafológico, el ensayo de Madrid se desarrolla sobre un alfisol de textura franco-arenosa, mientras que el ensayo de Sevilla se desarrolla sobre un vertisol de textura arcillosa. Ambos ensayos se iniciaron en septiembre del 2017 presentan un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones, en el que se estableció una rotación de cultivos a 4 hojas (trigo, cebada, guisante y colza).
Cada año se realizó un muestreo en el momento inmediatamente anterior al establecimiento del cultivo, pues el muestreo realizado en este periodo dará información clave sobre las especies que podrán aparecer en el campo a lo largo de los próximos meses (Dessaint et al., 1996). La toma de muestras de suelo se realizó siguiendo un patrón de cuadrícula, donde se definieron de forma equidistante los puntos de muestreo, a fin de minimizar los efectos de heterogeneidad en la distribución horizontal de las semillas, de forma que toda la superficie quedara muestreada (Dessaint et al. 1996). Se utilizó una barrena de 5 cm de diámetro y 10 cm de profundidad acorde al protocolo establecido por Forcella et al. (2003) para la determinación de bancos de semillas. Se delimitó un total de

9 puntos por cada parcela. Por cada punto de muestreo se realizaron dos extracciones idénticas de suelo. Una se utilizó para la realización del test de germinación y la otra para la realización del test de extracción.
El test de germinación se realizó en el invernadero bajo condiciones conocidas de temperatura y humedad. Los conteos de plántulas germinadas se realizaron de forma periódica identificando, cuantificando y extrayendo los ejemplares germinados.
El test de extracción consiste en la extracción física de las semillas por lavado según la técnica de Malone (1967). En la técnica de extracción directa de las semillas, éstas son separadas del suelo, y posteriormente analizadas bajo lupa para identificar y cuantificar las semillas extraídas.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza multifactorial ANOVA de la densidad y la riqueza específica de las semillas de malas hierbas, para las dos localidades y los dos sistemas de estudio del banco de semillas. Las diferencias entre las localidades, los métodos de estudio y sus interacciones se detectaron mediante el test de Tukey (Tukey HSD) con un nivel de significación del 5%. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico Rstudio, versión 3.6.0 (Rstudio, 2015).

3. Resultados y Discusión

El análisis del banco de semillas de malas hierbas nos permitió conocer la flora potencial de ambas localidades al inicio del ensayo (Tabla 1). Los resultados obtenidos del estudio comparado del banco de semillas, mostraron diferencias tanto en abundancia como en la riqueza específica de malas hierbas entre las zonas de estudio. En la Tabla 1 se muestran las especies presentes en ambas localidades y sus abundancias

Tabla 1. Listado de especies arvenses presentes en el banco de semillas de los suelos de los ensayos de Madrid y Sevilla, en Nov 2017, y su abundancia específica mediante el método de extracción *Abreviaturas de las especies de malas hierbas según EPPO Global database.*

MADRID							SEVILLA	
AMABL	AMASS	LACSE	LACSE	PICHI	SILSS	TRBTE	AMASS	LACSE
2684	3	19	10	7	2	16	3	19
ANYCL	CHEAL	PICHI	LAMAM	POLSS	SINAL	TRKSS	CHEAL	PICHI
100	11	18	514	13	2	1	11	18
CAPBP	CHOSS	POAAN	LITAR	POROL	SOLSS	VERSS	CHOSS	POAAN
37	3	26	223	5887	17	2	3	26
CADDR	CONAR	POROL	LOLRI	RAPRA	SONOL		CONAR	POROL
8	7	185	117	1	8		7	185
CHEAL	CNDSS	SONOL	MALSS	SASKA	STEME		CNDSS	SONOL
393	1	21	18	36	8		1	21
CHOSS	FUMSS	STEME	PAPSS	SENSS	TAROF		FUMSS	STEME
9	8	118	144	26	2		8	118

El estudio de los efectos de la variabilidad de las condiciones climáticas, a través de la localidad, y los diferentes métodos de estudio del banco de semillas (germinación y extracción) se han realizado sobre las 11 especies comunes a las dos localidades. La influencia de la localidad, el método y la interacción entre ambos resultó significativo

para la densidad de las 11 especies evaluadas pero solo la metodología para la riqueza (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis multifactorial, *(p-valor)*, del efecto de la localidad (LOC) y metodología de estudio (MET), para la densidad y riqueza específica de las especies de malas hierbas seleccionadas.

	Banco de semillas del suelo	
	Densidad (nº semillas/parcela)	Riqueza (nº especies/parcela)
Localidad (LOC)	< 0.001***	n.s.
Metodología (MET)	< 0.001 ***	0.026 *
LOC x MET	< 0.001 ***	n.s

El análisis estadístico de las especies comunes en ambas localidades, mostró que la densidad de semillas de malas hierbas fue significativamente diferente por localidad y método de estudio (Tabla 2). Además, la abundancia de semillas mostró diferencias significativas en la interacción de la localidad con el método de estudio. Los posibles efectos del manejo anteriores al establecimiento del ensayo pueden ser, en parte, los responsables de la diferencia en el número de semillas presentes en los suelos de las dos localidades.

Por otra parte, se observó también un efecto significativo, respecto a la abundancia de semillas detectadas según el método de estudio empleado. Las dos metodologías de estudio del banco de semillas del suelo, test de germinación y test de extracción, se llevaron a cabo para comprobar todas las posibles diferencias en la viabilidad de las semillas, su latencia y posibles carencias cometidas a la hora de realizar el test de extracción. Los resultados obtenidos muestran que en la localidad de Madrid el número de semillas extraídas mediante el test de extracción fue muy superior a aquellas que germinaron con el test de germinación, llegando a superar la proporción 2:1. En Sevilla, en cambio, se recogió un número de semillas extraídas similar al número de semillas germinadas. En la Tabla 3A se recogen las medias de aquellas especies con mayor representatividad en ambas localidades, comparando las medias de abundancia total de cada especie respecto a la localidad y al método de extracción y determinando su nivel de significación (Tabla 3B).

Tabla 3. A) Efecto de la interacción LOC x MET en la media de la abundancia de las especies arvenses seleccionadas para el estudio. B) Análisis pos hoc mediante el test de Tukey.

A								B					
especie	**M-EXT**		**S-EXT**		**M-GER**		**S-GER**			**diff**	**lwr**	**upr**	**p**
AMAR	167,75	*aA*	0,187	*dA*	76,43	*aD.*	0,125	*dD.*	**LOC**	M-S	-380,84	-440,73	-320,95	0
CHEN	24,56	*aA*	0,437	*dA.*	13,43	*aD.*	0,687	*dD.*	**MOD**	G-E	-165,59	-225,48	-105,7	0
CHON	0,000		0,000		0,560		0,187			S.E-M.E	-543,56	-655,45	-431,67	0
CONV	1,68	*a*	0,312	*b*	1,12	*a*	0,437	*b*		M.G-M.E	-328,31	-440,2	-216,42	0
FUMA	2,5	*aA*	0,437	*bA*	0,375	*aC*	0,312	*bC*	**LOC:MOD**	S.G-M.E	-546,43	-658,32	-434,54	0
PORT	367,93	*aA*	11,56	*dA*	143,31	*aD*	7,625	*dD*		M.G-S.E	215,25	103,35	327,14	0
SONC	0,187	*aA*	0,187	*bA*	0,510	*aD*	1,312	*bD*		S.G-S.E	-2,87	-114,76	109,01	0,99
STEL	0,510	*a*	7,375	*a*	0,060	*d*	5,875	*d*		S.G-M.G	-218,12	-330,01	-106,23	0

En cada especie, medias seguidas de diferentes letras indican diferencias significativas: ab 0,05; ac 0,001; y ad 0,0001. Minúsculas refieren localidades: M=Madrid; S=Sevilla. Mayúsculas refieren métodos: EXT=extracción; GER=germinación. (P-valor) según Test de Tukey, α=0,005 diff: diferencia de medias entre grupos; lwr, límite inferior para el intervalo de confianza del 95%; upr, límite superior para intervalo de confianza del 95%.

Los resultados muestran que especies de los géneros *Amaranthus, Chenopodium* o *Portulaca* presentan un mayor número de semillas en los test de extracción que en el de germinación en el banco de semillas de Madrid, aunque el nº de semillas extraídas es inferior al nº de semillas capaces de germinar. Sin embargo, las mismas especies en Sevilla no presentan esta diferencia, siendo capaces de germinar un número semejante a las que se extraen.

Por otro lado, también se aprecia como especies de géneros como *Chondrilla* o *Sonchus* no presentan apenas semillas en los test de extracción, mostrando luego su presencia en las bandejas de germinación. Dicho suceso se puede explicar debido a la dificultad que presenta el extraer aquenios por los métodos de lavado y flotación, dando como resultado pérdida de semillas.

Después del análisis estadístico y la comparación entre las medias muestrales, se llevó a cabo un "análisis post-hoc" mediante el Test de Tukey, donde se compararon las medias de todos los “tratamientos” entre sí (Tabla 3B), con el fin de diferenciar entre los grupos específicos de Madrid y Sevilla. Los resultados muestran que existen diferencias entre todas las medias excepto en Sevilla, para ambos métodos de estudio. En Sevilla las semillas que se extraen son las que posteriormente se encontraron en el test de germinación. En Madrid, las condiciones climatológicas, entre otros factores, afectaron al poder germinativo del banco de semillas del suelo bien por inducción de latencias en las semillas o por inviabilidad de las mismas.

4. **Agradecimientos**

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AT2017-003 y RTA2017-00006-C03-01.

Agradecemos al personal de las fincas La Canaleja y el Majano su ayuda en los trabajos realizados de campo.

Referencias

Dekker, J. (2011). Evolutionary ecology of weeds. Agronomy Department, Iowa State University, Ames, IA.

Harper, J. L. (1977). Population biology of plants. *Population biology of plants*.

Forcella, F., Webster, T., & Cardina, J. (2003). Protocols for weed bank determination in agro-ecosystems. *Weed management for developing countries. Addendum 1/edited by R. Labrada*.

Malone, C. R. (1967). A rapid method for enumeration of viable seeds in soil. *Weeds*, *15*(4), 381-382.

Dessaint, F., Barralis, G., Caixinhas, M. L., Mayor, J. P., Recasens, J., & Zanin, G. (1996). Precision of soil seedbank sampling: how many soil cores?. *Weed Research*, *36*(2), 143-151.

RSTUDIO TEAM (2015). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL http://www.rstudio.com/.

Thompson, K., & Grime, J. P. (1979). Seasonal variation in the seed banks of herbaceous species in ten contrasting habitats. *The Journal of Ecology*, 893-921.

Nichols, V., Verhulst, N., Cox, R., & Govaerts, B. (2015). Weed dynamics and conservation agriculture principles: A review. *Field Crops Research*, *183*, 56-68.

Study of weed seedbank present in two Mediterranean agro-ecosystems under different soil-climatic conditions.

Summary: The studies of weed seedbanks are essential to know the evolution of the floristic composition of agro-ecosystems. In 2018, a study was initiated in two locations, Madrid and Seville, with the objective of knowing the response of weed populations, within the same crop rotation, in two locations with different soil-climatic conditions, both in Mediterranean climate, through the study of the soil seedbank. In both trials, a crop rotation (wheat, barley, pea and rapeseed) was established. In all plots, soil samples were taken, before planting the crops, for the subsequent study of the weed seedbank. Two methodologies were carried out for this study: 1) germination, where parameters of abundance and richness of species from the active flora were measured and 2) extraction, which evaluated the abundance and richness of the flora present in the soil.

The results obtained in the initial year of the study showed differences in total abundance and richness of weed species, between both locations. The abundance measured by germination and extraction tests showed different results among the localities. In each locality, the potential and germinated flora also presented differences. The species richness in these localities was also different in number and in composition. These results highlight a clear influence of the soil-climatic conditions on the germination and emergence of weed species present in the seedbank of the soils in Mediterranean agro-ecosystems.

Keywords: Abundance, climatology, flora, richness, extraction test, germination test.

Los musgos del olivar de Jaén: 1.-Influencia de factores agronómicos y ambientales sobre la cobertura y la riqueza de especies

[1]RAMS S, [2]ALCÁNTARA C, [2]SAAVEDRA M

[1] Departamento de Didáctica de las Ciencias Experimentales. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias de la Educación, Campus Universitario La Cartuja C.P. 18071. Granada.
susanarams@gmail.com
[2] Centro IFAPA Alameda del Obispo, Avda. Menéndez Pidal s/n. Apdo. 3092, 14080, Córdoba.
mariac.alcantara@juntadeandalucia.es, mariam.saavedra@juntadeandalucia.es

Resumen: Se prospectaron 26 olivares en la provincia de Jaén y en cada uno se tomaron 20 muestras, repartidas bajo copa y en las calles. Se relacionó la cobertura y nº de especies con factores agronómicos y ambientales. Se encontraron 40 especies de briófitos que proporcionaron una cobertura media de 72,1 %, con un 76,5 % bajo copa y 64,9 % en las calles. El número de especies por campo estuvo correlacionado (R=0,50) con la cobertura alcanzada. La cobertura y número medio de especies encontradas no han estado influenciadas por la orientación de la pendiente, ni por la textura del suelo, el riego, la edad de los árboles, el número de troncos o la cabida cubierta. En cambio, la altitud ha influido positivamente sobre la riqueza de especies, y el grado de compactación sobre el total de especies y la cobertura bajo copa. Los olivares con densidades de plantación elevadas tuvieron coberturas de briófitos también elevadas, mientras que los menos densos variaron desde los valores más bajos de cobertura a los más elevados. Bajo la copa del olivo la orientación norte presentó una cobertura ligeramente superior a la orientación sur y sureste, pero no afectó al número de especies.

Palabras clave: musgo, briófitos, cubierta vegetal, *Bryum, Didymodon, Aloina*.

1. Introducción

Los briófitos son una parte importante de la flora espontánea de los cultivos y abundan en los olivares de Andalucía cuando no se realizan labores y se aplican herbicidas. Son parte de la cobertura vegetal y se consideran idóneos porque dificultan la instalación de malas hierbas (Ben Sasson *et al*., 2013) y, al menos en apariencia, no compiten con el olivo, dado que no absorben agua y son de pequeño tamaño. Se les considera muy útiles sobre todo en zonas donde es difícil instalar o manejar coberturas de especies fanerógamas, como son los suelos con elevada pendiente o bajo la copa de los olivos, porque se dificulta la recolección (Saavedra *et al*. 2013).

Sin embargo, los estudios sobre musgos en olivar son escasos. Destacamos el trabajo de Rams *et al.* (2011), que pone de manifiesto la presencia en los olivares no labrados de Andalucía de un elevado número de especies, y el de Ben Sasson (2013) que identificó en 5 olivares de Andalucía y 5 de Israel, 41 especies de briófitos,

comprobando además que las especies son básicamente las mismas, con 12 especies comunes y dominantes que representaban el 86 % de la cobertura total.

Ante el interés que despierta esta parte de la flora espontánea, y dada la relevancia de la provincia de Jaén, se realizó una prospección en dicha provincia, y se identificaron y cuantificaron las principales especies (Saavedra *et al*., 2019), que en su mayoría coincidieron con las anteriores, destacando sobre todo *Bryum caespiticium* y *Dydimodon vinealis*.

El trabajo que se presenta ahora es una continuación de estos trabajos y tiene como objetivo valorar el efecto de diferentes factores agronómicos y ambientales sobre esa flora briofítica del olivar no labrado. Dada la amplitud del estudio, se presenta en dos comunicaciones, esta primera que recoge la influencia de factores agronómicos y ambientales sobre el conjunto de especies y una segunda que muestra esa influencia sobre las 12 especies principales.

2. Material y Métodos

Se recolectaron briófitos de 26 olivares no labrados de la provincia de Jaén durante la primavera de 2011, distribuidos por las diferentes comarcas procurando que la mayor diversidad estuviera representada. En cada campo se recogieron 20 muestras con aros de PVC de 60 mm de diámetro: 12 bajo copa y 8 de la calle, en un total de 4-6 árboles. Bajo la copa se obtuvieron 8 muestras en las 8 orientaciones (N, NE, E, SE, S, SO, O y NO) y otras 4 elegidas sin considerar la orientación. En cada muestra se identificaron las especies siguiendo la taxonomía propuesta por *Flora Briofítica Ibérica* (Guerra y Cros, 2006, 2010) por ser obra de gran difusión y de fácil consulta para facilitar su interpretación por los técnicos agrarios. Se cuantificó el porcentaje de cobertura de cada especie (de 0 a 100%, tomada de 5 en 5), (Ver Figura 1), se anotó el hábito de crecimiento que presentaba la especie según la descripción de Magill (1990) para *cespitoso* (plantas que viven juntas creciendo en tapices o almohadillas) y *gregario* (plantas que viven en agrupaciones laxas o entremezcladas en tapices) y se asignó un índice según el grado de compactación del suelo (Tabla 1).

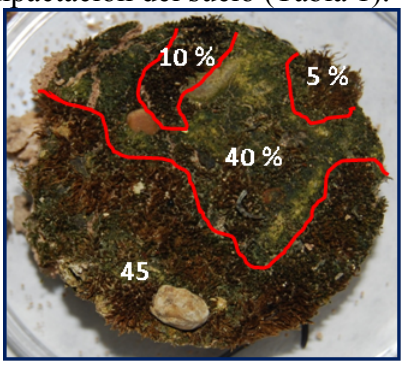


Figura 1. Ejemplo de determinación de la cobertura de cada especie en cada muestra.

Tabla 1. Índice de compactación empleado.

Grado de Compactación	Determinación al Presionar con los Dedos	Índice Aplicado
Bajo	El sustrato se desmenuza muy fácilmente	1
Bajo-Medio	El sustrato se desmenuza dejando glomérulos de tierra	2
Medio	El sustrato se parte en muchos fragmentos pequeños	3
Medio-Alto	El sustrato se parte en 4-8 fragmentos	4
Alto	El sustrato no se parte o se parte en 1-3 fragmentos	5

En cada olivar se determinaron además:

- Tipo de olivar según la edad (joven, inferior a 50 años; adulta), densidad de plantas, nº de troncos por árbol, riego o secano, y cabida cubierta (índice detallado en Tabla 2).
- Análisis completo de muestras de suelo obtenidas bajo la copa y en las calles.
- Altitud, pendiente, orientación de la pendiente (Base de datos SIGPAC).
- Pluviometría media histórica según Elías-Castillo y Ruíz-Beltrán (1971).

Tabla 2. Índice de cobertura aplicado.

Rango de Cobertura de las Copas de los Olivos %	Índice Aplicado
5-10	1
>10-16	2
>16-23	3
>23-31	4
>31-40	5

Se obtuvo el número total de especies y se calcularon los valores de cobertura medios para cada ubicación: bajo copa (ruedo) o en la calle.

Se analizó el efecto de esos factores agronómicos y ambientales sobre la cobertura y riqueza de especies. Para cada factor de tipo cualitativo se calcularon los valores medios de cobertura y número de especies en el total de las muestras, bajo copa (ruedo) y en la calle del olivar, y se establecieron para cada zona de muestreo las diferencias significativas mediante el análisis de varianza. Se obtuvieron los errores estándar (SE) usando el programa Statistix versión 8.0. En el caso de factores de tipo cuantitativo se obtuvieron las correlaciones y las representaciones de las diferentes variables con las coberturas y número de especies.

3. Resultados y Discusión

Se identificaron 40 especies de briófitos, de los cuales, 39 fueron musgos y 1 hepática pertenecientes a 6 familias botánicas (Datos publicados por Saavedra *et al*., 2019).

Las 12 especies más frecuentes fueron también las que proporcionaron mayor cobertura (Tabla 3) y 8 de ellas eran de hábito cespitoso denso o muy denso.

A) Factores de tipo cualitativo

a) Orientación bajo la copa del olivo

La orientación bajo la copa del olivo no influyó sobre el número de especies, pero sí en el grado de cobertura, que fue ligeramente más alto en la orientación norte, y más bajo hacia el sur y sureste por ser, respectivamente, las zonas menos y más expuestas al sol (Figura 2).

b) Orientación de la pendiente del olivar, riego, edad de los olivos, número de troncos del olivo, cabida cubierta de los olivos y textura

Estos factores no tuvieron influencia sobre la cobertura muscinal obtenida ni sobre el número de especies en el conjunto de los campos, tanto a nivel global como en ruedo o en las calles.

TABLA 3. Frecuencia de briófitos y cobertura bajo copa y en las calles de los olivares.

Especies	Hábito	Frecuencia (%)	Cobertura (%)	
			Total	Total sobre Briófitos
Bryum caespiticium	*	100,0	13,03	18,08
Didymodon vinealis	*	92,3	21,11	29,28
Didymodon luridus	*	92,3	5,53	7,67
Bryum argenteum	*	92,3	4,52	6,27
Aloina aloides	**	88,4	6,72	9,33
Barbula unguiculata	*	80,8	2,33	3,23
Pseud. hornschuchianum	*	61,5	2,41	3,35
Didymodon rigidulus	*	50,0	5,65	7,84
Dicranella howei	*	50,0	0,98	1,37
Crossidium crassinerve	**	61,5	0,71	0,99
Funaria hygrometrica	**	38,5	1,52	2,11
Phascum cuspidatum	**	38,5	1,29	1,80

(*) Especie que presenta hábito cespitoso denso o muy denso.
(**) Especie que presenta hábito cespitoso laxo o gregario.

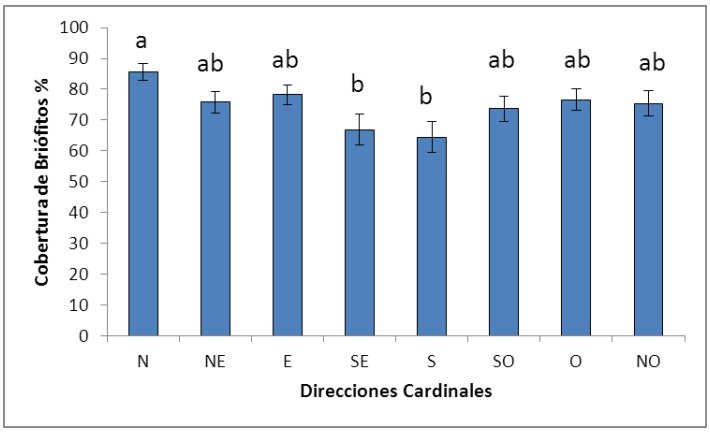


Figura 2. Cobertura de briófitos bajo copa según las direcciones cardinales.
Barras verticales representan el error estándar de la media. Letras diferenes sobre las barras indican diferencias significativas entre orientaciones (Test Tukey, $P \leq 0,05$).

B) Factores de tipo cuantitativo

a) Relación entre la cobertura y riqueza de especies

La cobertura total muscinal de los olivares de Jaén ha estado positivamente correlacionada con el número total de especies encontradas (R=0,50, $P<0,01$).

b) Altitud, índice de compactación y densidad de plantación

Se encontraron correlaciones positivas y significativas, aunque bajas, sobre la cobertura y/o número de especies por campo de la altitud sobre el nivel del mar, la compactación del suelo y la densidad de plantación.

Los campos a mayor altitud presentaron mayor número de especies en los ruedos (R=0,43, $P<0,03$) y en el total del olivar (R=0,41, $P<,04$). Este hecho podría explicarse porque se trata de olivares más próximos a los ambientes naturales y con condiciones de clima menos extremas, pero también por tratarse de olivos en zonas con mayores problemas de mecanización por su pendiente y, generalmente, menos intervenidos por el hombre, con prácticas de cultivo menos intensivas. En las calles, donde el suelo se ve mucho más afectado por la acción humana debido al intenso paso de maquinaria, no se

pone de relieve este efecto, lo que nos indica que el factor humano es importante. El grado de influencia de estos factores relacionados con el manejo del olivar no puede demostrarse en este trabajo, pues sería objeto de ensayos dirigidos, donde otros posibles factores puedan ser controlados.

Los suelos más compactados favorecieron la cobertura en el ruedo (R=0,52, *P<0,01*) y en el conjunto del olivar (R=0,40, *P<0,04*). El efecto no fue significativo en las calles. El mayor grado de compactación del suelo también ha favorecido la riqueza de especies (R=0,43, *P<0,03*), mostrando la línea de tendencia incrementos de 10 a 14 especies cuando el índice de compactación pasa de 2,5 a 5.

Una mayor densidad de la plantación ha contribuido a una mayor cobertura de briófitos (R=0,48, *P<0,05*), aunque en este caso se observa una tendencia asintótica, no lineal, hacia máximos en torno al 90 % de cobertura. No se ha encontrado ninguna relación con el número de especies.

4. Conclusiones

La cobertura total de briófitos alcanzada por campo está correlacionada con el número de especies (R=0,50). Esto nos indica que obtener una buena cobertura muscinal será más fácil en aquellos olivares que tengan una mayor riqueza de especies de musgos.

Entre los factores agronómicos y ambientales cualitativos evaluados, la orientación de la pendiente, la textura del suelo, el riego, la edad de los árboles, el número de troncos y la cabida cubierta no han tenido influencia sobre la cobertura y la riqueza de especies. Tampoco se ha observado una clara influencia de la densidad de plantación de los olivares sobre la cobertura de las especies.

Los factores que han presentado cierta influencia han sido los siguientes: Bajo la copa del olivo la orientación norte presentó una cobertura ligeramente superior a la orientación sur y sureste, aunque no afectó al número de especies La altitud influyó positivamente sobre la riqueza de especies, y el grado de compactación del suelo sobre el número total de especies y la cobertura de briófitos bajo la copa de los olivos.

5. Agradecimientos

Este trabajo fue financiado a través de un Convenio de Colaboración entre ATPIOLIVAR (Asociación Técnica de Producción Integrada de Olivar), IFAPA (Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, Junta de Andalucía) y La Fundación Caja Rural de Jaén. Esta publicación ha sido posible gracias al Proyecto TRA-2019.010 Experimentación, Cooperación y Transferencia de Tecnología en Olivar, financiado con fondos FEDER e IFAPA.

Referencias

BEN SASSON S (2013) Iniciación al estudio de los musgos como cubierta vegetal en el olivar mediterráneo. Tesis de Máster en Olivicultura y Elaiotecnia. Universidad de Córdoba, Córdoba, España. 138 pg.

BEN SASSON S, RAMS S, ALCÁNTARA C & SAAVEDRA M (2013). Influencia de la presencia de musgo sobre la instalación de malas hierbas en suelos de olivar. En: XIV Congreso de la Sociedad Española de Malherbología (ed. J M Osca, D Gómez de Barreda-Ferra, V Castell y N Pascual). (5-7 noviembre, Valencia, España). 25-29 Valencia, España.

ELÍAS-CASTILLO F & RUÍZ-BELTRÁN L (1977) Agroclimatología de España. Ministerio de Agricultura. INIA. Madrid.

GUERRA J & CROS RM (2010) Funariales, Splachnales, Schistostegales, Bryales, Timmiales. En: Flora Briofítica Ibérica (Guerra J, Brugués M, Cano MJ, Cros RM). Universidad de Murcia y Sociedad Española de Briología, Murcia, pp. 15-289.

MAGILL RE (ed.). (1990) *Glossarium polyglottum bryologiae*: A multilingual glossary for Bryology. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* **33**, 1-297.

RAMS S, SAAVEDRA M, ALCÁNTARA C, CABEZAS C & JIMÉNEZ-MORENO MJ (2011) Primera aproximación al estudio del estrato muscinal en el olivar andaluz. En: Plantas Invasoras Resistencias a Herbicidas y Detección de Malas Hierbas (eds. Arévalo JR, Fernádez S, López F, Recasens J y Sobrino E) XIII Congreso Nacional de Malherbología. (22-24 noviembre. La Laguna, Tenerife) 267-270, La Laguna, Tenerife, España.

SAAVEDRA M, RAMS S & BEN SASSON S (2013) Los musgos como alternativa o complemento a las cubiertas vegetales en el olivar mediterráneo. *Vida Rural*, **368**: 30-34.

SAAVEDRA M, ALCÁNTARA C & RAMS S (2019) Los briófitos del olivar de Jaén. Comunicaciones Científicas, Simposium EXPOLIVA 2019. OLI 22. 6 pg.

The moss of Jaen´s olives groves: 1.-Influence of agronomic and environmental factors on the species wealth and coverage

Summary: Twenty six olive groves were prospected in Jaen province. In each of them 20 samples were collected in both under the tree and the olives groves streets. Coverage and number of found species were correlated with agronomic and environmental factors. Forty different species were defined which provided a mean coverage of 72,1%, with 76,5% corresponded to the coverage under the trees and 64,9% to the street coverage. The number of species per olive orchard was correlated (R=0,50) with the coverage achieved. Coverage and mean number of species were not influenced by the slope orientation, soil texture, irrigation, tree age, trunk number or by canopy coverage. However, the altitude had a positive effect on the species richness and compaction grade on the total species under the tree canopy. High plantation density had high moss coverage while lesser density ranged between the lowest coverage values to the highest. Under the olive canopy, the north orientation showed slightly higher coverage than to the south and the southeast orientations, but no effect was observed on the number of species.

Keywords: moss, bryophytes, cover crops, Bryum, Didymodon, Aloina.

Los musgos del olivar de Jaén: 2.-Influencia de factores agronómicos y ambientales sobre las especies más frecuentes

[1]RAMS S, [2]ALCÁNTARA C, [2]SAAVEDRA M

[1] Departamento de Didáctica de las Ciencias Experimentales. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias de la Educación, Campus Universitario La Cartuja C.P. 18071. Granada.
susanarams@gmail.com
[2] Centro IFAPA Alameda del Obispo, Avda. Menéndez Pidal s/n. Apdo. 3092, 14080, Córdoba.
mariac.alcantara@juntadeandalucia.es, mariam.saavedra@juntadeandalucia.es

Resumen: En 26 olivares prospectados en la provincia de Jaén se analizó mediante un análisis de correspondencias canónicas (ACC) la influencia de 29 factores agronómicos y ambientales de tipo cuantitativo sobre las 12 especies más importantes por su frecuencia y abundancia. Se puso de manifiesto que no existe un factor destacado sobre los demás ni especies asociadas, aunque sí cierta influencia de algunos factores relacionados con la salinidad, el porcentaje de arcilla y la tendencia a la compactación, o la textura arenosa, por lo que podemos considerar que la flora briofítica del olivar de Jaén es en conjunto la misma y que las diferencias que pudieran existir entre estas localidades no se ponen de manifiesto en este estudio.

Palabras clave: musgo, briófitos, cubierta vegetal, *Bryum, Didymodon, Aloina*.

1. Introducción

Los briófitos, especialmente los musgos, son una parte importante de la flora espontánea de los cultivos y abundan en los olivares no labrados de Andalucía. Sin embargo, hay pocos estudios sobre ellos. En una publicación anterior (Saavedra *et al.* 2019) se relacionaron las 41 especies de briófitos (40 musgos y 1 hepática) encontradas en 26 olivares de la provincia de Jaén. La influencia de factores agronómicos y ambientales de tipo cualitativo que afectan a la cobertura y abundancia del conjunto de las especies ha sido presentado en una comunicación en este mismo congreso (Rams *et al.* 2019). En la presente comunicación el objetivo es valorar el efecto de diferentes factores agronómicos y ambientales de tipo cuantitativo sobre las 12 especies de musgos más frecuentes y abundantes en los olivares no labrados de Jaén.

2. Material y Métodos

Se recolectaron briófitos de 26 olivares no labrados de la provincia de Jaén, tomando en cada uno 20 muestras con aros de PVC de 60 mm de diámetro, en los que se determinaron las especies y su cobertura, según se detalla en el trabajo anterior (Rams *et al.* 2019).

Se determinaron en cada campo 29 factores de tipo cuantitativo: estructura del suelo (porcentajes de arena, arcilla y limo), pH, materia orgánica oxidable, nitrógeno orgánico, carbonatos, caliza activa , fósforo asimilable, potasio asimilable, capacidad de intercambio catiónico, magnesio de cambio, calcio de cambio, potasio de cambio, sodio

de cambio, conductividad eléctrica, conductividad del extracto saturado, bicarbonatos en el extracto saturado, calcio en el extracto saturado, cloruros en el extracto saturado, magnesio en extracto saturado, potasio en el extracto saturado, sodio en extracto saturado, sulfatos en el extracto saturado, densidad de árboles por ha, compactación (índice de 0 a 5), pendiente (%), altitud (m s.n.m.) y pluviometría (mm).

Se analizó el efecto de esos factores agronómicos y ambientales sobre las 12 especies dominantes que fueron las que presentaron mayor frecuencia y cobertura (Saavedra et al., 2019): *Bryum caespiticium, Didymodon vinealis, D. luridus, B. argenteum, Aloina aloides, Barbula unguiculata Pseudocrossidium hornschuchianum, D. rigidulus, Dicranella howei, Crossidium crassinerve, Funaria hygrometrica, Phascum cuspidatum.*

El efecto de estos factores de tipo cuantitativo sobre la flora muscinal se realizó a través de un análisis de correspondencias cánonicas (ACC) para establecer qué variables ambientales están influyendo en mayor grado en la distribución de las especies de musgos dominantes en el olivar de Jaén (las 12 especies más importantes), para el conjunto de campos. Se utilizó el programa CANOCO versión 4.5 sobre la matriz de abundancia de las especies y de los factores ambientales en cada campo. La matriz de abundancia de las especies se estableció a partir de los valores de cobertura siguiendo la escala de abundancia-dominancia de 0 a 5, utilizada por Braun-Blanquet (1979). La matriz de variables ambientales en cada campo (datos de suelo, pluviometría, altitud, compactación, etc.) se evaluó previamente y se eliminaron las variables altamente correlacionadas. La elección de variables para el análisis se realizó usando el test de Montecarlo y seleccionando las variables definitivas manualmente con el programa CANOCO. Los datos de los análisis de suelo que se utilizaron en el análisis ACC fue la media de los valores obtenidos bajo copa y en las calles.

3. Resultados y Discusión

Las 29 variables ambientales de tipo cuantitativo, referentes a las características de suelo y del terreno, clima y marco de plantación, sometidas en su conjunto al análisis ACC proporcionaron una varianza explicada de 0,67 (Tabla 2). Entre ellas, se seleccionaron las 5 que más peso aportaron a la varianza total y que no estaban correlacionadas con otras o entre sí.

Estas 5 variables seleccionadas fueron: arcilla, sulfatos en el extracto de saturación, pH, sodio en el extracto de saturación y compactación. Resultó significativa en tercer lugar la variable "contenido de magnesio en el extracto de saturación", pero no se seleccionó dada su alta relación con el contenido en sulfatos del extracto de saturación, sobre todo en los valores más altos. Los resultados del análisis ACC sobre estas 5 variables se indican en la Tabla 3. La suma de valores propios canónicos sólo supuso un 0,236, mientras que el total fue de 0,690. En la Figura 3 se representan los dos primeros ejes con los 5 factores ambientales seleccionados y las especies y localidades respectivamente.

Tabla 2. Varianza explicada por las variables ambientales según el análisis de correspondencias canónicas (ACC) ordenadas de mayor a menor.

Variable	Unidades	Varianza explicada
(*) Arcilla	%	0,08
(*) Sulfatos en el Extracto de Saturación	meq/l	0,07
Arena	%	0,06
Caliza activa	%	0,06
Conductividad Eléctrica	mmhos/cm	0,06
Magnesio en el Extracto de Saturación	meq/l	0,06
(*) pH		0,06
Conductividad del Extracto de Saturación	mmhos/cm	0,05
Carbonatos	%	0,05
Calcio en el Extracto de Saturación	meq/l	0,05
(*) Compactación	Índice de 0 a 5	0,05
Pendiente	%	0,03
Limo	%	0,03
Nitrógeno Orgánico	%	0,03
Materia Orgánica Oxidable	%	0,03
(*) Sodio en el Extracto de Saturación	meq/l	0,03
Bicarbonatos en el Extracto de Saturación	meq/l	0,03
Altitud	m s.n.m.	0,03
Potasio en el Extracto de Saturación	meq/l	0,03
Densidad de Árboles por ha	Nº plantas	0,02
Sodio de Cambio	meq/100g	0,02
Cloruros en el Extracto de Saturación	meq/l	0,02
Magnesio de Cambio	meq/100g	0,02
Fósforo Asimilable	p.p.m.	0,02
Pluviometría	mm	0,02
Capacidad de Intercambio Catiónico	meq/100g	0,01
Calcio de Cambio	meq/100g	0,01
Potasio de Cambio	meq/100g	0,01
Potasio Asimilable	p.p.m	0,01

Tabla 3. Resultados del Análisis de Correspondencias Canónicas realizado con 5 factores ambientales: Arcilla, sulfatos en extracto saturado, pH, compactación y sodio en el extracto de saturación.

Ejes	1	2	3	4	TOTAL INERCIA
Valores propios	0,101	0,064	0,034	0,028	0,690
Correlación especies-factores ambientales	0,848	0,731	0,601	0,595	
Varianza acumulada					
De especies	14,6	23,9	28,9	32,9	
De especies-factores ambientales	42,2	69,1	83,6	95,2	
SUMA DE VALORES PROPIOS					0,690
SUMA DE VALORES PROPIOS CANÓNICOS					0,238

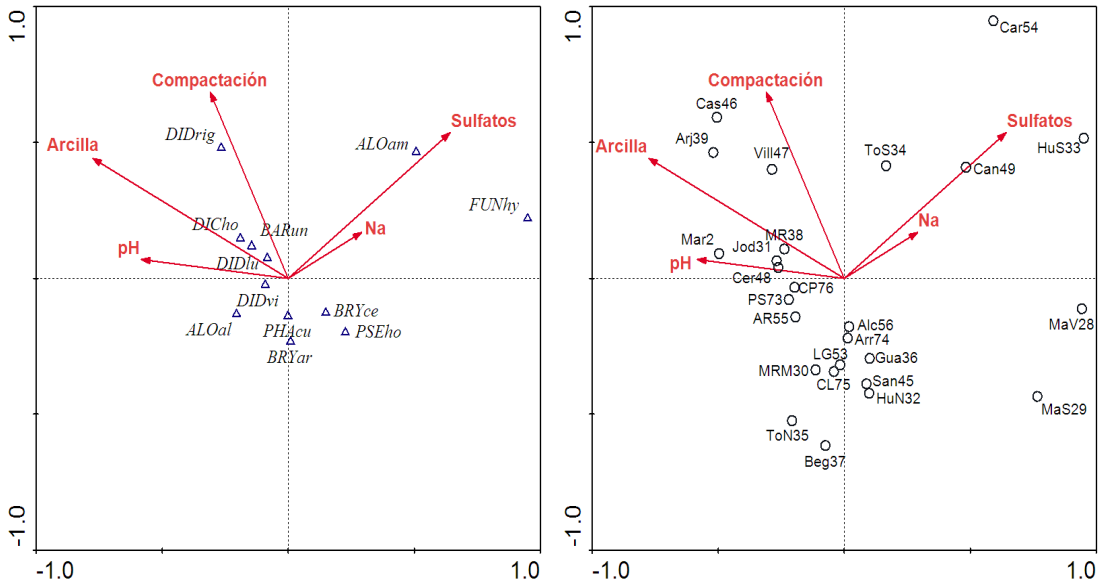


Figura 3. Representación en los dos primeros ejes canónicos de las 12 especies de musgo (Izquierda) más importantes, las localidades (Derecha) y los factores ambientales analizados. Especies: ALOIal=*Aloina aloides*; ALOam=*Aloina ambigua*; BARun=*Barbula unguiculata*; BRYar=*Bryum argenteum*; BRYce=*Bryum caespiticium*; DICho=*Dicranella howei*; DIDlu=*Didymodon luridus*; DIDrig=*Didymodon rigidus*; DIDvi=*Didymodon vinealis*; FUNhy=*Funaria hygrometrica*; PHAcu=*Phascum cuspidatum*; PSEho=*Pseudocrossidium hornschuchianum*.

La mayoría de las especies, 9 de 12, se encuentran agrupadas en torno al centro de la gráfica (Figura 3), mostrando baja influencia de los factores analizados. Destacan, no obstante en dicha gráfica, 3 zonas asociadas a factores relacionados con la salinidad (sulfatos y sodio en el extracto de saturación), con *Aloina ambigua* (ALOam) como especie representativa, suelos con mayor porcentaje de arcilla y tendencia a la compactación, con *Didymodon rigidum* (DIDrig) como especie destacada, y suelos arenosos, sueltos, sin especies que los representen, aunque *Funaria hygrometrica* (FUNhy) aparece representada entre suelos con sulfatos y menor contenido de arcilla.

En la representación de las localidades (Figura 3, derecha) distinguimos 4 grupos en relación con esos mismos factores: 1-suelos con características salinas, 2-suelos compactados arcillosos y pH elevado, 3-suelos sueltos con poca arcilla, elevado contenido en arena y pH más bajo, y 4-un grupo de dos localidades separadas (Ton35 y Beg37) que destacan por su baja compactación de suelo y ausencia de salinidad.

En la Figura 4 se representan en el mapa los 5 grupos. Observamos que no existe una agrupación de campos asociada estrictamente a zonas geográficas, sino que los factores ambientales más influyentes se encuentran en diferentes zonas más o menos distribuidos. Sólo se puede reconocer un gran grupo de olivares, no influenciados por un determinado factor, entre los que podemos distinguir por un lado los de las sierras de Alcaudete, Mágina y Cazorla que son suelos con alto contenido en carbonatos y elevada caliza activa, de pH básico y alto contenido en limo, y por otro los de las estribaciones de las sierras del norte, que tienen bajos contenidos en carbonatos y caliza activa, pero también de pH alto y contenido en limo elevado. Sin embargo, en el análisis ACC realizado no se aprecia que exista una asociación de especies a estas diferencias en el

contenido en carbonatos y caliza activa, por lo que podemos considerar que la flora briofítica es en conjunto la misma, y que las diferencias que pudieran existir entre estas localidades en la composición y cobertura de especies no se ponen de manifiesto en este estudio.

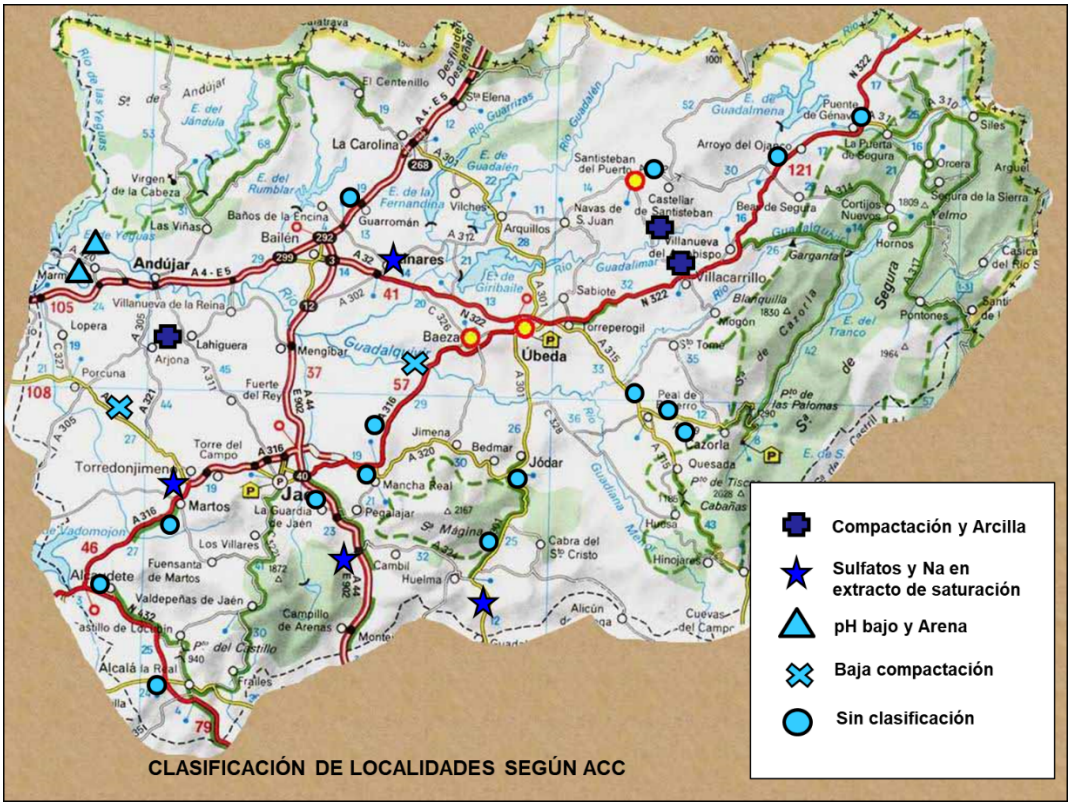


Figura 4. Representación en el mapa provincial de Jaén de las localidades según los principales factores ambientales que influyen en la flora briofítica.

4. Conclusiones

Del análisis de 29 factores cuantitativos (ACC) sobre las 12 especies dominantes resultó que ninguno de estos factores destacó sobre los demás por su efecto sobre la mayoría de las especies, aunque se ha puesto de relieve la influencia de factores relacionados con la salinidad (sulfatos y sodio en el extracto de saturación) con *Aloina ambigua*, suelos con mayor porcentaje de arcilla y tendencia a la compactación con *Didymodon rigidulus*, y suelos arenosos, sueltos, sin especies que los representen, aunque *Funaria hygrometrica* aparece en suelos con sulfatos y menor contenido de arcilla. La representación de estos campos sobre un mapa ha puesto de manifiesto que no existe una agrupación de campos y por tanto de especies de musgos asociada estrictamente a zonas geográficas, sino que los factores ambientales más influyentes para el desarrollo de algunas especies se encuentran en diferentes zonas, y solo se puede reconocer un gran grupo de olivares no influenciados por un determinado factor y/o especie. Entre ellos podemos distinguir los de las sierras de Alcaudete, Mágina y Cazorla que son suelos con alto contenido en carbonatos y elevada caliza activa, de pH elevado y alto contenido en limo, junto a los de las estribaciones de las sierras del norte, que tienen bajos contenidos en carbonatos y caliza activa, pero de pH alto y contenido en limo también elevado.

Con estos resultados se pone de manifiesto que en la mayor parte del olivar jienense la flora briofítica es en conjunto la misma, que las diferencias entre localidades pueden explicarse parcialmente por sus características ambientales, pero otras diferencias locales no se ponen de manifiesto en este estudio. Podemos concluir que existe una flora briofítica del olivar en Jaén y que con pocas especies se pueden conseguir coberturas muy elevadas. Factores como el manejo que se haga del olivar podrían tener más influencia sobre esta flora que las propias necesidades de las especies y sus requerimientos ambientales. Desde nuestro punto de vista, sería prioritario ahondar en los factores que favorecen o dificultan la implantación de los musgos. Es necesario realizar ensayos en este sentido para determinar cuáles podrían ayudar a su establecimiento sin un coste adicional en el manejo.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado a través de un Convenio de Colaboración entre ATPIOLIVAR (Asociación Técnica de Producción Integrada de Olivar), IFAPA (Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, Junta de Andalucía) y La Fundación Caja Rural de Jaén. Esta publicación ha sido posible gracias al Proyecto TRA-2019.010 Experimentación, Cooperación y Transferencia de Tecnología en Olivar, financiado con fondos FEDER e IFAPA.

Referencias

BRAUN-BLANQUET J (1979) Fitosociología. Bases para el Estudio de Comunidades Vegetales. Traducción española de Pflanzensociologie. Grudzüge der Vegetationskunde. Blume, Madrid. 820 pg.

RAMS S, ALCÁNTARA C & SAAVEDRA M (2019) Los musgos del olivar de Jaén: 1.-Influencia de factores agronómicos y ambientales sobre la cobertura y la riqueza de especies. XVII Congreso de la Sociedad Española de Malherbología.

SAAVEDRA M, ALCÁNTARA C & RAMS S (2019) Los briófitos del olivar de Jaén. Comunicaciones Científicas, Simposium EXPOLIVA 2019. OLI 22. 6 pg.

The moss of Jaen´s olives groves: 2.-influence of agronomic and environmental factors on the most frequent species

Summary: In twenty six olives groves prospected in Jaen province, the canonical correspondence analysis (CCA) on 29 quantitative factors on 12 dominant moss species was performed. This analysis displayed that there was not any highlighting factor nor any species linked, but there was some influence of salinity grade soil, clay percentage and compaction or sand texture. The results showed that the bryophytes flora present in Jaen´s olives orchard is basically the same and the possible differences among locations could not be demonstrated in this study.

Keywords: moss, bryophytes, cover crops, *Bryum, Didymodon, Aloina*.

Biomasa alelopática: aprovechando recursos agroforestales como herbicidas naturales

PARDO-MURAS M, PUIG CG, IGLESIAS-RODRÍGUEZ J, PEDROL N

Departamento de Bioloxía Vexetal e Ciencia do Solo, Facultade de Bioloxía, Universidade de Vigo, Vigo, ESPAÑA.
mpardomuras@uvigo.es, *cgpuig@uvigo.es*, *joseiglesiasr@uvigo.es*, *pedrol@uvigo.es*

Resumen: El aumento exponencial de malezas resistentes, unido a la falta de nuevos modos de acción que las puedan controlar, amenaza con hacer que casi todos los herbicidas actuales sean inutilizables hacia el 2050. Por ello, la investigación se dirige hacia la búsqueda de nuevas alternativas a los herbicidas sintéticos existentes, y también al desarrollo de herramientas complementarias para implementar la estrategia de manejo integrado de malezas. Los procesos biológicos encierran sin duda muchas de las respuestas posibles.

Nuestro equipo ha avanzado en la evaluación del potencial bioherbicida de biomasa de distintas especies alelopáticas del sistema agroforestal, y en el estudio de su posible utilización como abonos verdes bioactivos para el control de malezas. No obstante, antes de recomendar su uso es preciso estudiar el grado y duración de su efectividad y conocer su composición química. También, identificar los aleloquímicos responsables de los efectos observados, ya que éstos podrían ser seleccionados como principios activos de futuros herbicidas. Es necesario investigar además los efectos colaterales sobre los cultivos y sobre las propiedades y microbiota del suelo. Todo ello a través de distintas tareas de investigación secuenciales, utilizando un amplio abanico de materiales y métodos en Agronomía y Ecofisiología Vegetal, y modernas herramientas de Química Analítica que se detallan en este trabajo.

Palabras clave: alelopatía, metodología, fitotoxicidad, perfil químico, abonos verdes

1. Introducción

Además de la lucha clásica contra las malezas para asegurar el rendimiento de los cultivos, los agricultores se encuentran con otros obstáculos cada vez más preocupantes: el aumento exponencial de malezas resistentes y la falta de nuevos modos de acción de los fitosanitarios químicos que las puedan controlar. Hoy se cree que casi todos los herbicidas existentes serán inútiles hacia el 2050 (Westwood et al. 2018). Por ello, la investigación se dirige hacia la búsqueda de nuevas alternativas a los herbicidas de síntesis, y también al desarrollo de herramientas complementarias para un manejo integrado de malezas, que permitan una producción agrícola de calidad, saludable, sostenible y ambientalmente correcta. De hecho, en el último Simposio Internacional de

la EWRS (European Weed Research Society) “New approaches for smarter weed management”, celebrado en Ljubljana (Eslovenia) en junio de 2018, las contribuciones relacionadas con el 'manejo de malezas de inspiración biológica' fueron agrupadas por primera vez en una sesión específica, dando una idea de su creciente interés.

En la búsqueda de nuevos herbicidas naturales, la Alelopatía, que estudia la interacción entre plantas a través de la liberación de metabolitos secundarios llamados aleloquímicos, se presenta como fuente potencial de alternativas para el control de malezas. Estos compuestos naturales son, *a priori*, más biodegradables, tienen una vida media corta, y proporcionan nuevas dianas moleculares sobre las que actuar que los herbicidas sintéticos (Soltys et al. 2013), siendo esta última característica esencial para controlar la proliferación de malezas resistentes. Dentro de la alelopatía, el uso de abonos verdes alelopáticos ha recibido especial atención (Kruidhof et al. 2008). Con esta práctica se consigue mejorar la calidad del suelo al tiempo que se libera un auténtico "cóctel" de aleloquímicos (Puig et al. 2018) capaz de controlar las malezas.

¿Dónde buscar herbicidas naturales?

En nuestro laboratorio hemos comenzado a valorar el uso de biomasa alelopática como abonos verdes herbicidas, pensando en sumar una nueva práctica de control inspirada en procesos biológicos naturales. Así, en lugar de cultivar un abono verde alelopático como herramienta de control de malezas, que ocupa tiempo y espacio en la hoja de cultivo, consideramos que el agroecosistema ofrece una gran diversidad vegetal que puede ser una fuente idónea de biomasa con actividad fitotóxica. Siendo el fenómeno de la Alelopatía muy común en los sistemas agroforestales (Weston y Duke, 2003), el control de malezas se llevaría a cabo mediante un uso eficiente de sus recursos, y se evitaría la inversión necesaria para la producción de cultivos destinados a abono verde.

Así, el objetivo de nuestro trabajo es valorar el uso potencial de biomasa alelopática de especies vegetales que nos rodean y están a nuestro alcance para su utilización a modo de abono verde bioherbicida. Pero, para implementar su uso, debemos profundizar en el conocimiento de su potencial como bioherbicida a través de distintas tareas de investigación secuenciales que se detallan en este trabajo.

¿Cómo buscar herbicidas naturales?

Ante la gran diversidad vegetal en el agroecosistema, realizamos una prospección inicial de especies potencialmente útiles para el control de malezas siguiendo una estrategia ecológica. Ésta consiste en seleccionar aquellas especies de las que existen indicios de producción de sustancias fitotóxicas, bien porque para ellas se han observado fenómenos alelopáticos, o porque han sido usadas para fines medicinales con propiedades fungicidas, bactericidas, etc. Además, también se tiene en cuenta la disponibilidad y abundancia en el agroecosistema y la facilidad de recolección de las especies a estudiar, con el fin de que sea factible su uso en el campo; así como el estado fenológico de la planta, considerando apropiado el uso de especies vegetales en floración, pues es cuando la planta presenta mayor cantidad y variedad de metabolitos secundarios (Pardo-Muras et al. 2018).

¿Cómo demostrar la efectividad de los herbicidas naturales?

Nuestro método de trabajo se divide en tres etapas de investigación graduales. En la **primera etapa** tratamos de explorar *in vitro* las principales vías a través de las cuales el material vegetal libera aleloquímicos al medio.

Una de las principales vías de liberación es la volatilización. Para valorar el potencial fitotóxico de los volátiles emitidos por la biomasa aérea de la especie objeto de estudio seguimos la metodología de Barney et al. (2005). Ésta permite que los volátiles sean liberados de forma natural hacia la atmósfera de la cámara hermética, evitando el contacto directo del material vegetal con las semillas de las especies de malezas diana. Como especies diana utilizamos al menos, una maleza monocotiledónea [p. ej., *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.], otra dicotiledónea (p. ej., *Amaranthus retroflexus* L.) y un cultivo (p. ej., *Zea mays* L.), pues los aleloquímicos han demostrado tener cierta especificidad (Baleroni et al. 2000). El efecto fitotóxico se cuantifica mediante la comparación de los resultados de germinación y elongación de primordios de raíz y tallo de las semillas que sufren el tratamiento frente a un control. En este caso, el tratamiento control consiste en pajitas de plástico simulando el volumen del material vegetal (Pardo-Muras et al. 2018).

Además de compuestos volátiles, los compuestos solubles en agua también pueden ser liberados del material vegetal al suelo y producir algún impacto en el banco de semillas de malezas. Por ello, también evaluamos el potencial fitotóxico *in vitro* de la fracción acuosa. El extracto acuoso es obtenido a partir de la maceración del material vegetal fresco a T ambiente y oscuridad (para evitar la fotodegradación de los compuestos) en agua destilada durante 24 h. La fitotoxicidad del extracto acuoso se evalúa a partir de bioensayos dosis-respuesta sobre la germinación y el crecimiento de las semillas de malezas y cultivo diana incubadas sobre papel de filtro, y siendo su efectividad comparada a la de un herbicida de síntesis (Puig et al. 2013). No obstante, los aleloquímicos, una vez liberados al agua del suelo, pueden ser degradados por los microorganismos edáficos u otras interacciones fisico-químicas, convirtiendo a estas sustancias en moléculas no tóxicas, o reduciendo su efectividad sobre las especies diana (Kobayashi, 2004). Por tal motivo, los extractos acuosos también son bioensayados sobre suelo agrícola (Puig et al. 2018).

Una vez estudiada la fitotoxicidad de las fracciones volátil y acuosa, tratamos de identificar qué compuestos podrían estar implicados en los efectos observados. En primer lugar, determinamos el perfil químico volátil y fenólico de los extractos de la especie objeto de estudio. Para la extracción de los compuestos volátiles se emplea el equipo Likens-Nickerson o el Clevenger, en función del rendimiento del aceite esencial de la especie objeto de estudio, y el análisis se lleva a cabo por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) (Pardo-Muras et al. 2018). Mientras que, en el caso de los compuestos fenólicos, la extracción y separación de los mismos se lleva a cabo con solventes orgánicos, y posteriormente se analiza por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC-DAD) (Souto et al. 2001). En segundo lugar, seleccionamos algunos de los aleloquímicos identificados previamente, según (i)

abundancia, (ii) evidencias previas de fitotoxicidad, y/o (iii) disponibilidad comercial para ser testados individualmente a partir de bioensayos dosis-respuesta. Finalmente, realizamos el test de reversibilidad con el fin de comprobar si el efecto fitotóxico de los compuestos sobre la germinación de las especies diana es temporal o permanente. Para ello, las semillas pre-tratadas y no germinadas son traspasadas a agua e incubadas durante 20 días (Pardo-Muras et al. 2018). A partir de los resultados obtenidos, se abre un abanico de posibilidades para profundizar en el modo de acción de algunos aleloquímicos, pudiendo ser seleccionados como principios activos de futuros herbicidas.

Sin embargo, cada vez tiene más peso la hipótesis de que los efectos fitotóxicos sobre muchos procesos fisiológicos observados en la naturaleza son el resultado de combinaciones o interacciones complejas entre diferentes aleloquímicos, y no de la acción de un solo compuesto (Inderjit y Duke, 2003). Esto nos lleva a dilucidar posibles interacciones entre compuestos previamente identificados en los extractos volátiles y acuosos, y evaluar sus efectos conjuntos. Para ello, preparamos mezclas de compuestos volátiles (Vokou et al. 2003) y fenoles mimetizando las concentraciones y proporciones de la composición natural de la especie objeto de estudio. Posteriormente, exploramos la fitotoxicidad *in vitro* de ambas fracciones por separado y concomitantemente sobre la germinación y el crecimiento de las especies de malezas diana.

La **siguiente etapa** de investigación se lleva a cabo en un ambiente controlado *ex vitro*, en invernadero. Estos ensayos tienen como objetivo evaluar el efecto del material vegetal incorporado al suelo como abono verde sobre el establecimiento del cultivo y de algunas de sus principales malezas acompañantes. Para ello, el material vegetal cortado en pequeñas porciones es incorporado al suelo como un abono verde a una dosis establecida previamente *in vitro*. Como control se utiliza suelo agrícola sin material vegetal, al que se le incorporan pajitas de plástico para simular el efecto ahuecante del abono verde. A los 30 días tras la siembra, se cuenta el número de plántulas vivas emergidas de malezas y cultivo y se obtienen parámetros de cosecha. Ya que la incorporación de biomasa fitotóxica al suelo puede provocar efectos no deseados sobre las propiedades del suelo y la actividad microbiana, tras la cosecha se miden los parámetros fisico-químicos del suelo, y la actividad microbiana a través de la técnica BIOLOG (Souza-Alonso et al. 2018). Un ejemplo de ensayo de invernadero se puede consultar en Puig et al. (2013).

Por otro lado y a fin de explorar la dinámica de liberación de los compuestos durante la descomposición de los residuos en el suelo agrícola, realizamos otro tipo de ensayo en macetas. Este consiste en retirar el material vegetal del suelo a diferentes tiempos de muestreo durante 30 días y analizarlo para determinar los compuestos tanto volátiles como fenólicos mediante HS-SPME / GC-MS y HPLC-DAD, respectivamente (Puig et al. 2018). Además, el potencial fitotóxico de los extractos volátil y acuoso del material vegetal recuperado es probado *in vitro* sobre la germinación y el crecimiento temprano de las malezas diana, pudiendo establecer una posible relación entre los efectos observados y la dinámica de liberación de los aleloquímicos.

Los experimentos de laboratorio e invernadero son llevados a cabo bajo condiciones controladas o semi-controladas, de tal modo que estos sistemas experimentales simplificados suponen un enfoque reduccionista. Por ello, en esta **tercera y última etapa** se requieren ensayos de campo bajo condiciones reales, donde se añade a la rutina de producción de un cultivo determinado la metodología previamente establecida en invernadero para el control de malezas. En este caso, se realizan distintos muestreos a corto, medio y largo plazo evaluando los efectos sobre la diversidad y abundancia de la flora arvense, y sobre parámetros agronómicos del cultivo (Puig et al. 2019).

Conclusiones

La combinación de ensayos *in vitro* con ensayos en invernadero sobre los efectos fitotóxicos de una especie vegetal permite valorar el uso potencial de esa especie para el control de malezas en el campo.

El uso de biomasa alelopática incorporada al suelo en forma de abono verde representa una alternativa real, ambientalmente más correcta y segura, a la aplicación de herbicidas sintéticos. Se consiguen efectos herbicidas duraderos y, por la diversidad de compuestos que actúan, las posibilidades de aparición de resistencias son *a priori* menores. Este método debe ser considerado una herramienta complementaria dentro de una estrategia global de mantenimiento de las poblaciones de malezas a niveles que permitan una ventaja para el cultivo sin comprometer la biodiversidad del agroecosistema.

Referencias

BALERONI CSS, FERRARESE MLL, BRACCINI AL et al. (2000) Effects of ferulic and *p*-coumaric acids on canola (*Brassica napus* L. cv. Hyola 401) seed germination. *Seed Science and Technology* **28**, 333–340.

BARNEY JN, HAY AG, WESTON LA (2005) Isolation and characterization of allelopathic volatiles from mugwort (*Artemisia vulgaris*). *Journal of Chemical Ecology* **31**, 247-265.

INDERJIT & DUKE SO (2003) Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta* **217**, 529 -539.

KOBAYASHI K (2004) Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. *Weed Biology and Management* **4,** 1-7.

KRUIDHOF HM, BASTIAANS L, KROPFF MJ (2008) Ecological weed management by cover cropping: effects on weed growth in autumn and weed establishment in spring. *Weed Reseach* **48**, 492-502.

PARDO-MURAS M, PUIG CG, LÓPEZ-NOGUEIRA A et al. (2018) On the bioherbicide potential of *Ulex europaeus* and *Cytisus scoparius*: Profiles of volatile organic compounds and their phytotoxic effects. *PloS one*. ***13***(10), e0205997.

PUIG CG, ÁLVAREZ-IGLESIAS L, REIGOSA MJ et al. (2013) *Eucalyptus globulus* leaves incorporated as green manure for weed control in maize. *Weed Science* **61**, 154-161.

PUIG CG, GONÇALVES RF, VALENTÃO P et al. (2018) The consistency between phytotoxic effects and the dynamics of allelochemicals release from *Eucalyptus globulus* leaves used as bioherbicide green manure. *Journal of Chemical Ecology* **44**, 658-670.

PUIG CG, REVILLA P, BARREAL ME et al. (2019) On the suitability of *Eucalyptus globulus* green manure for field weed control. *Crop Protection* **121**, 57-65.

SOLTYS D, KRASUSKA U, BOGATEK R et al. (2013) Allelochemicals as bioherbicides—present and perspectives. In: *Herbicides-Current research and case studies in use (*AJ Price & JA Kelton Editors), 517-542. Intech, Rijeka, Croatia.

SOUTO XC, BOLAÑO JC, GONZÁLEZ L et al. (2001) HPLC Techniques-Phenolics. In: *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques* (MJ Reigosa Roger Editor), 251-282. Springer, Netherlands.

SOUZA-ALONSO P, PUIG CG, PEDROL N et al. (2018) Exploring the use of residues from the invasive *Acacia sp.* for weed control. *Renewable Agriculture and Food Systems* 1-12.

VOKOU D, DOUVLI P, BLIONIS GJ, et al. (2003) Effects of monoterpenoids, acting alone or in pairs, on seed germination and subsequent seedling growth. *Journal of Chemical Ecology* **29**, 2281-2301.

WESTON LA & DUKE SO (2003) Weed and crop allelopathy. *Critical Reviews in Plant Science* **22**, 367-389.

WESTWOOD JH, CHARUDATTAN R, DUKE SO et al. (2018) Weed Management in 2050: Perspectives on the Future of Weed Science. *Weed Science* **66**, 275-285.

Allelopathic biomass: taking advantage of agroforestry resources as natural herbicides

Summary: The exponential increase of resistant weeds, together with the lack of new modes of action, threatens to make almost all current herbicides unusable by 2050. Therefore, the research is directed towards the search for new alternatives to synthetic herbicides, and the development of complementary tools to implement the integrated weed management strategy. Biological processes contain undoubtedly many of the possible answers.

Our team has advanced in the evaluation of the bioherbicidal potential of the biomass of different allelopathic species of the agroforestry system, and in the study of its possible use as bioactive green manures for weed control. However, it is necessary to study the degree and duration of its effectiveness and to know its chemical composition before recommending its use. In addition, to identifying the allelochemicals responsible for the observed effects, since these could be selected as active ingredients for future herbicides. It is also necessary to investigate the side effects on the crops and on the properties and microbiota of the soil. All of this through different sequential research tasks, using a wide range of materials and methods in Agronomy and Plant Ecophysiology, and modern tools of Analytical Chemistry, which are detailed in this work.

Keywords: allelopathy, methodology, phytotoxicity, chemical profile, green manures

Efecto herbicida de diferentes compuestos orgánicos alternativos al glifosato para el control de *Conyza bonariensis* en viña

CABRERA C[1], VALENCIA-GREDILLA F[1], SALA A[2], SOLANS JR[2], RECASENS J[1]

[1]ETSEA. Agrotecnio. Universitat de Lleida. Avda. Rovira Roure 191. 25198 Lleida.
[2]Associació de Defensa Vegetal (ADV) de Raimat. 25111 Raimat, Lleida
carlos.cabrera@udl.cat, francisco.valencia@hbj.udl.cat, adv.raimat@gmail.com, jr.solans@codorniu.com, jrecasens@hbj.udl.cat

Resumen: *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist es una especie muy competitiva en viñedos y de difícil control químico mediante herbicidas no selectivos (i.e. glifosato). Si se desean evitar pases con intercepas debido a la posible agresión a las viñas y la erosión del suelo, resulta necesario, para esta especie, encontrar métodos de control alternativos al uso de herbicidas de síntesis. Con este fin, se ha realizado un ensayo en los viñedos de Raimat (Lleida) para evaluar el efecto, sobre *C. bonariensis*, de siete compuestos de origen orgánico. Se hicieron dos aplicaciones, la primera en julio de 2018 sobre plantas en un estado fenológico avanzado y a doble dosis de la recomendada, y la segunda en febrero de 2019 sobre las primeras rosetas emergidas y a dosis normal. Los resultados obtenidos en verano de 2018 mostraron que la mezcla de ácidos húmicos y fúlvicos fueron los que ofrecieron una mayor afectación, necrosando las inflorescencias. El resto de productos mostraron un efecto desigual y en ningún caso las plantas murieron. En febrero de 2019, los ácidos húmicos y fúlvicos volvieron a mostrar las mayores eficacias de control (88%) seguido del ácido pelargónico 68% p/v (68%) y del ácido acético + N32 (50%). Los resultados obtenidos muestran el efecto herbicida de ciertas materias activas de origen natural en estados iniciales de desarrollo de la mala hierba.

Palabras clave: Bioherbicidas, dosis, eficacia, fenología, malas hierbas, viñedo.

1. Introducción

En los viñedos donde el control de malas hierbas bajo la línea de cepas se realiza mediante métodos químicos, ciertas especies como *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist suponen un grave problema debido a su fácil dispersión y capacidad de infestación junto a su difícil control con herbicidas no selectivos (i.e. glifosato), lo que ha llevado a esta especie a convertirse, en las últimas décadas, en una de las más nocivas de los cultivos perennes (Bastida *et al*., 2005). Por otra parte, el uso continuado de este tipo de herbicidas ha favorecido la aparición de biotipos resistentes (Urbano *et al.,* 2007). En la

zona vitícola de Raimat (Lleida), las dosis de glifosato necesarias para controlar esta especie se han ido incrementado con los años, hecho que lleva a pensar que se están seleccionando biotipos resistentes. En este sentido no es desdeñable saber que se han detectado hasta 58 casos de *Conyza* spp. resistente a este herbicida en el mundo (Heap, 2017).

En viñedos ecológicos, ante la imposibilidad de utilización de productos herbicidas de síntesis, el control de las malas hierbas solamente puede realizarse mecánicamente o con productos orgánicos autorizados en el Reglamento (CE) 889/2008. Sin embargo, el manejo habitual bajo la línea de cultivo consiste en el pase de intercepas, ya que son escasos los productos autorizados como herbicida. Si bien el control de *C. bonariensis* con este método mecánico es altamente eficaz, el elevado número de pases necesarios a lo largo de la campaña provoca un alto riesgo de erosión del terreno (Gago *et al*., 2007), además de ser un método muy agresivo para las cepas (sobre todo cuando éstas son muy jóvenes), implica elevados costes y favorece el incremento de la huella de CO_2. Esta situación plantea la necesidad de buscar alternativas al uso de intercepas, ante casos de infestación por parte de esta especie.

El objetivo principal de este trabajo se centra en la búsqueda de nuevos métodos para el control de esta mala hierba alternativos a los métodos mecánicos y herbicidas de síntesis, para que puedan incluirse como una herramienta más dentro de la estrategia de control de malas hierbas en viñedos ecológicos. Con este fin se ha probado la eficacia en un viñedo, de siete compuestos orgánicos diferentes y con una alta presencia de *C. bonariensis* bajo la línea de cultivo.

2. Material y Métodos

Se eligieron siete compuestos diferentes (algunos en mezcla) para obtener así un total de seis productos aplicados mediante pulverización manual en campo: ácido acético 20° + N32 (T1); ácido pelargónico 3,1% p/v + matabisulfito de potasio ($K_2S_2O_5$) (T2); ácido pelargónico 68% p/v (T3); mezcla de ácidos húmicos 7% y fúlvicos 80% (T4); aceite de camelina (T5) y un complejo de hidroxifosfato natural (T6), además de un testigo donde no se realizó ninguna aplicación (T7). El ensayo se llevó a cabo en las viñas de la variedad Cabernet-Sauvignon que el grupo Codorníu-Raventós tiene en Raimat (Lleida) en una parcela con cepas en espaldera, en un marco de plantación de 2,30 m x 1,60 m, con riego localizado y con alta presencia de *C. bonariensis* bajo las líneas del cultivo. En el mes de julio de 2018 se probaron cinco de los seis compuestos, a dosis doble, y se estudió su efecto sobre plantas en un estado de desarrollo avanzado (BBCH 60-65, con inflorescencias desarrolladas) y con una cobertura muy alta (70-80%). Posteriormente, en febrero de 2019, se realizó de nuevo una aplicación, -esta vez de todos los productos citados anteriormente-, y a dosis normal, sobre las primeras rosetas emergidas de la mala hierba (BBCH 12-15).

Las dosis a aplicar (Tabla 1) se obtuvieron a partir de distintas fuentes: de pruebas previas que los técnicos de la ADV Raimat habían realizado (en el caso del ácido pelargónico 3,1% p/v + $K_2S_2O_5$), de la recomendación comercial (en el caso del ácido pelargónico 68% p/v y del complejo de hidroxifosfato natural) y de un ensayo previo, en condiciones controladas en invernadero, donde se probaron diferentes dosis del resto de los productos sobre plantas de *C. bonariensis* sembradas en maceta (ácido acético 20° + N32, ácidos húmicos y fúlvicos 80% y aceite de camelina) (Montull *et al*., 2019).

Se estableció un diseño experimental completamente aleatorizado con cuatro repeticiones. Cada unidad de muestreo o plot era de 3,20 m (distancia entre 3 cepas) x 0,8 (ancho de trabajo del intercepas). La eficacia de los tratamientos se estimó mediante la cobertura de *C. bonariensis* presente en cada plot antes y dos días después de cada aplicación (DDA). Los resultados obtenidos se analizaron por separado para cada momento de aplicación (julio y febrero) mediante ANOVA y separación de medias mediante el test de comparación de Tukey (HSD).

Tabla 1: Dosis de tratamiento en cada momento de aplicación

Tratamiento	Dosis (L/ha)		Volumen de aplicación (L/ha)	
	Jul 18	Feb 19	Jul 18	Feb 19
(T1) Ácido Acético + N32	245 + 105	122,5 + 52,5	350	175
(T2) Ácido Pelargónico + $K_2S_2O_5$	-	17,5 + 70 (kg/ha)	-	500
(T3) Ácido Pelargónico	32	16	200	200
(T4) Ácidos Húmicos y Fúlvicos	70	35	700	700
(T5) Aceite de Camelina	500	250	500	250
(T6) Complejo de Hidroxifosfato	30	15	150	150

3. Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos en la aplicación de julio de 2018, con plantas en un estadio avanzado de desarrollo y alto porcentaje de cobertura, mostraron una mayor eficacia con el tratamiento con ácidos húmicos y fúlvicos (T4), reduciéndose un 77% de media la cobertura inicial de *C. bonariensis*. El resto de los tratamientos mostraron un nivel de eficacia menor: complejo de hidroxifosfato, 33% (T6); ácido pelargónico, 30% (T3); ácido acético + N32, 25% (T1) y aceite de camelina con tan solo un 5% (T5) (Figura 1). Si bien las plantas no murieron con ninguno de los cinco productos aplicados en julio, las inflorescencias mostraron necrosis general con los ácidos fúlvicos y húmicos (T4) evitando así la dispersión de los aquenios. Los demás productos (a excepción del aceite de camelina, T5) mostraron también un cierto grado de necrosis tanto en las inflorescencias como en la zona apical, y en días posteriores se apreció la reducción del vigor respecto al testigo no tratado.

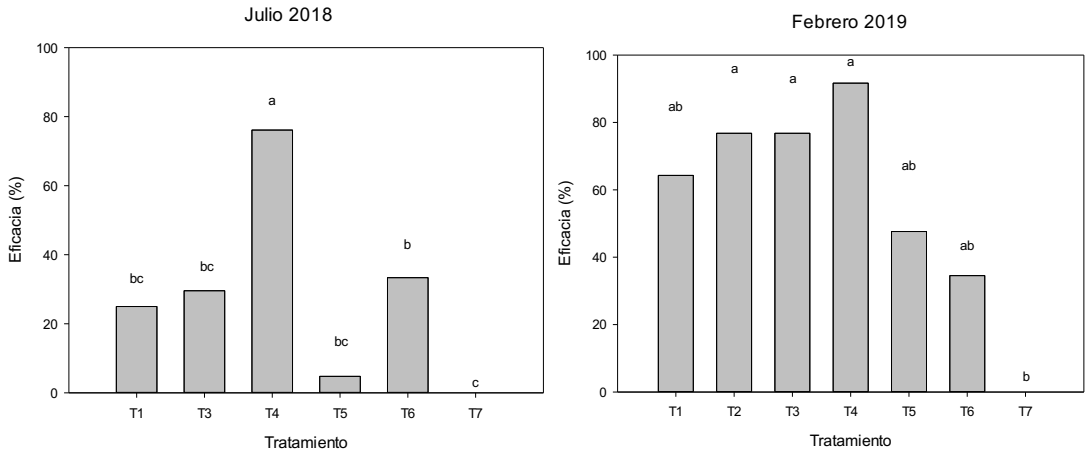


Figura 1: Eficacia de los tratamientos sobre *Conyza bonariensis* en dos estados de desarrollo distintos: julio 2018 en BBCH 60-65, febrero 2019 en BBCH 12-15. Columnas con diferentes letras indican diferencias significativas en $p < 0,05$ (Tukey HSD). Las barras verticales indican el error estándar.

En la aplicación realizada en febrero de 2019, sobre plantas en un estado de roseta y con una cobertura baja de la mala hierba, los ácidos húmicos y fúlvicos (T4) volvieron a mostrar la mejor eficacia en la reducción de la cobertura (92%), seguido por el ácido pelargónico (T3) y la mezcla de ácido pelargónico y $K_2S_2O_5$ (T2) (ambos con un 77%), el ácido acético (T1) (64%), el aceite de camelina (T5) (48%) y el complejo de hidroxifosfato (T6) (37%) (Figura 1). El diferente estado de desarrollo de las rosetas influyó en su supervivencia, siendo esta mayor en aquellas plantas con más de cuatro hojas tratadas con aceite de camelina (T5) y con el complejo de hidroxifosfato (T6).

Las dosis establecidas en este ensayo, han sido las adecuadas para los distintos tratamientos. La desigual o falta de eficacia de algunos de ellos, como el aceite de camelina (T5) o el hidroxifosfato (T6), parecen deberse más a un efecto inocuo sobre la planta que a la dosis empleada. Por su parte el efecto quemador o abrasivo de los compuestos ácidos resulta altamente efectivo ante estados de roseta de la planta, si bien, algunas de ellas llegaron a mostrar, en el centro de la roseta, puntos de crecimiento verdes después de las aplicaciones con ácido pelargónico. Deberá estimarse su supervivencia ante esta y nuevas aplicaciones.

Al igual que con los herbicidas de síntesis, la eficacia de los diferentes compuestos ensayados depende del estado fenológico en el que se encuentra la mala hierba, siendo mayor cuando la planta se encuentra en un estadio inicial de desarrollo. Nuevas aplicaciones a lo largo de la campaña, serán necesarias en función del ritmo en el que tengan lugar nuevas nacencias de la mala hierba. Recordemos que en este sistema existe riego por goteo, por lo que las nuevas emergencias de esta especie podrían ser establecidas mediante modelos hidrotérmicos, algunos ya existentes para esta especie (Zambrano-Navea et al., 2013). Su aplicación en un programa de control específico para esta mala hierba, mediante sustancias de origen natural, como el establecido en este ensayo, puede constituir una alternativa al glifosato y evitar los riesgos asociados a un

posible desarrollo de resistencias. La limitada disponibilidad comercial de estos productos y el coste de su aplicación deberán ser también tenidos en cuenta.

4. Agradecimientos

Este trabajo se enmarca dentro del Proyecto Plan Estatal - Retos de la Sociedad, Ref: AGL2017-83325-C4-2-R financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Fondos EU-FEDER, y en la acción establecida por el proyecto MACHBER del programa Grups Operatius del Departament d'Agricultura, de la Generalitat de Catalunya. Los autores C. Cabrera y F. Valencia-Gredilla han obtenido sendos contratos predoctorales por parte de la Universidad de Lleida.

Referencias

BASTIDA F, MURIEL A.J, MENÉNDEZ, J (2005) La flora arvense de los cítricos en la Provincia de Huelva. In: *Malherbología Ibérica y Magrebí: Soluciones comunes a problemas comunes*, pp. 305-315. MENÉNDEZ J, BASTIDA F, FERNÁNDEZ-QUINTANILLA C et al. eds. Universidad de Huelva.

GAGO P, CABALEIRO C, GARCÍA J (2007) Preliminary study of the effect of soil management systems on the adventitious flora of a vineyard in northwestern Spain. *Crop Protection*, **26** (2007) 584-591.

HEAP, I (2017) The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. Available at: www. weedscience.com

MONTULL JM, ARBONÉS A, RECASENS J (2019). Curvas dosis respuesta de sustancias naturales con efecto herbicida. *Actas XVII Congreso de la Sociedad Española de Malherbología*.

URBANO J M, BORREGO A, TORRES V, LEÓN J, JIMENEZ C, DINELLI G, BARNES J, (2007**)** Glyphosate-resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) in Spain. *Weed Technol.* **21**, 396–401.

ZAMBRANO-NAVEA C, BASTIDA F, GONZÁLEZ-ANDUJAR JL (2013) A hydrothermal seedling emergence model for *Conyza bonariensis*. *Weed Research*, **53**, 213-220.

Herbicide effect of different organic compounds alternatives to glyphosate to control *Conyza bonariensis* in vineyards

Summary: *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist is one of the most competitive and noxious weed in vineyards and offers difficulties to be controlled by synthetic herbicides (i.e. glyphosate). Furthermore, the use of in-row tiller is not the best solution due to the damage in young vines and the high risk of erosion caused by this mechanical method. In this sense, it is necessary to find new alternative methods to synthetic herbicides to control this species. With this aim, a field experiment was carried out in the vineyards of Raimat (Lleida) to evaluate the herbicide effect, against *C. bonariensis*, of seven organic compounds. The different compounds were tested in two different dates, the first one was made in July 2018 on plants at an advanced growth stage and at double dose, and the second one was made in February 2019 just after the first emergences of rosettes and at normal dose. The results obtained in summer 2018 showed that the highest efficacy was obtained by the mix of humic and fulvic acids, with necrotized inflorescences. The rest of the products showed unequally results and plants did not die in any case. In the application made in February 2019, the mix of humic and fulvic acids also showed the highest control efficacy (88 %), followed by the pelargonic acid 68 % p/v (68 %) and the acetic acid + N32 (50 %). These results highlight the herbicide effect of some organic compounds at the initial growth stage of the weed.

Keywords: Bioherbicides, doses, efficacy, phenology, weeds, vineyard.

Evaluación económica de acolchados biodegradables plásticos y papeles utilizados en cultivo de pimiento (*Capsicum annuum* L.)

MARÍ AI[1]*, PARDO G[2], CIRUJEDA A[2], MARTÍNEZ Y[3]

[1] Departamento de Sanidad Vegetal, Grupo de Gestión Integrada, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza, España
*aimari@aragon.es
[2] Departamento de Sanidad Vegetal, Laboratorio de Malherbología, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón-IA2 (CITA-Univ. de Zaragoza), Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza, España.
acirujeda@aragon.es, gpardos@aragon.es
[3] Departamento de Análisis económico, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón-Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (Univ. de Zaragoza-CITA), Gran Vía 2-4, 50004 Zaragoza, España.
yolandam@unizar.es

Resumen: El polietileno negro es el material de acolchado más utilizado en cultivos hortícolas, pero los residuos que genera son un serio problema medioambiental. Los papeles y plásticos biodegradables de acolchado son alternativas disponibles pero el agricultor es reacio a adoptarlos principalmente por su mayor precio de mercado. El objetivo de este trabajo es evaluar la rentabilidad económica de ocho materiales biodegradables para una producción de pimiento al aire libre. La evaluación económica se basó en datos obtenidos en un estudio de cuatro años localizado en Aragón. Se contemplaron tres escenarios sobre el manejo de los residuos de PE: (i) ausencia de manejo, (ii) gestión en vertedero y (iii) reciclado completo. La inclusión de los costes del manejo de residuos y del reciclaje bajo la actual legislación española solo reduce el margen neto final en un 0,2%. A pesar del ahorro en los costes del acondicionamiento de campo, los altos precios de los materiales biodegradables no compensan el actual nivel de ayudas económicas, lo que dificulta su masiva adopción en los campos. Los resultados muestran que un incremento en los subsidios hasta un 50,1% del precio de coste de adquisición del material más caro permitiría que todos los materiales biodegradables fueran alternativas al PE económicamente viables.

Palabras clave: manejo de residuos plásticos, polietileno, margen neto, subsidios agrícolas

1. Introducción

A pesar de las muchas ventajas descritas del uso de materiales de acolchado plástico en agricultura, dos problemas principales amenazan la continuidad a corto y largo plazo del uso de estos plásticos: (i) las labores de instalación, retirada y desecho son costosas y (ii) los materiales más utilizados, el polietileno de baja intensidad (PE) y otras cubiertas a base de derivados del petróleo, implican ciertos riesgos ambientales porque no se

degradan y pueden alterar la micro fauna y disminuir la calidad y cantidad de cosecha, entre otros. En diversos estudios se ha demostrado que las producciones de cultivos creciendo sobre acolchados biodegradables de plástico y de papel son equivalentes a las obtenidas en cultivo sobre acolchado de PE. Sin embargo, el precio de mercado de éstos es mayor que el del PE lo que reduce el atractivo hacia los agricultores. Además, no hay estudios que incluyan evaluaciones económicas de todos estos acolchados. El objetivo de este trabajo es, por tanto, comparar los resultados obtenidos en un ensayo de cuatro años para producción de pimiento al aire libre con acolchados de PE, biodegradables de papel y de plástico.

2. Material y Métodos

Ensayo de campo

Los ensayos se llevaron a cabo en una finca experimental del Gobierno de Aragón localizada en Zaragoza desde mayo a octubre de 2012 a 2015. Los tratamientos se distribuyeron aleatoriamente en bloques al azar con cuatro repeticiones. Las parcelas elementales fueron mesas elevadas de 0,7 m de ancho x 20 m de largo separadas 1,5 m de centro a centro. Se instalaron 8 materiales de acolchado biodegradables (4 papeles y 4 plásticos) y el acolchado de PE. El cultivo fue pimiento tipo Lamuyo variedad 'Viriato' trasplantado al 'tresbolillo' con una separación de 0,3 m entre plantas. La cosecha se realizó en tres momentos en el mes de octubre. Los datos de los insumos, cosecha y costes operacionales fueron obtenidos de los ensayos de campo y de un productor local de pimiento con un sistema de producción similar (Marí *et al.* 2019).
El análisis estadístico de los datos se realizó con el paquete estadístico SAS (V.9.4. SAS Institute, Cary, NC, USA). La homogeneidad de la varianza y la normalidad de los datos fueron comprobadas antes de someterlos a un análisis de varianza ($P<0,05$).

Costes

Los costes se separaron en 'Insumos' y 'Operaciones' para la incorporación o utilización de los mismos. En los insumos se contemplaron el abono, los costes de irrigación y los materiales de acolchado. En las operaciones se especificaron todas las labores preparatorias del terreno, así como la elaboración de las mesas de transplante, la instalación de los acolchados teniendo en cuenta que los papeles requieren un mayor tiempo de instalación, el transplante del cultivo, la cosecha y el acondicionamiento de la parcela. Estos valores se obtuvieron de las labores realizadas en el ensayo experimental y de la encuesta a un productor de pimiento con una gestión similar a la llevada a cabo en el experimento. En el caso del PE se propusieron tres escenarios de manejo de sus residuos. El primero y más común cosiste en la retirada del plástico de acolchado de la parcela y la acumulación o enterrado o quema de los mismos. El segundo evalúa el coste de que el propietario traslade los residuos a un vertedero y el tercero añade, además, el coste de reciclaje de los residuos plásticos.

Ingresos y margenes netos.

Para el cálculo de los ingresos se utilizó el valor del precio de mercado del pimiento 856 € t-1 (MAPAMA 2018). A pesar de que no hubo diferencias significativas en la cosecha entre materiales para cada año de ensayo, los valores utilizados fueron los correspondientes al año 2014 con producciones semejantes a las locales. Se contempló la posibilidad de acceder a un subsidio que el Gobierno de Aragón concede a los agricultores que permite percibir el 35% del coste del material de acolchado plástico biodegradable. Debido a que los acolchados de papel no se contemplan en esta legislación, se consideraron dos escenarios, uno con la aportación y otro sin esta ayuda. Finalmente, la rentabilidad económica de cada material es comparada con el margen neto, que se calcula como la diferencia entre ingresos y costes totales.

Resultados y Discusión

Costes e ingresos

Los costes (Tabla 1) se calcularon teniendo en cuenta los distintos escenarios comentados anteriormente. Para comparar los datos se tomó como base el escenario en el que no hubo manejo de residuos y se acolcha con PE. La operación de 'Acolchado plástico' representa el 6,3% del total de costes (7,5-14,1% para plásticos biodegradables y 13,1-16,2% para papeles). El mayor gasto corresponde a 'Operaciones de ciclo de cultivo' con el 45,3%, seguido de 'Cosecha' con el 27% del total, debido principalmente a que es una operación manual. En el caso de los distintos escenarios de manejo de residuos con PE, los costes incrementan de 4,7 a 4,8% si se pasa de no manejo de residuos a gestionar los residuos en un vertedero y a un 4,9% si se contempla el reciclado. Haciendo referencia al acondicionamiento de la parcela, si se utilizan los acolchados biodegradables se produce una reducción de costes entre el 54,7 y el 65,7% con respecto a los escenarios con PE, pues no hay costes de recogida ni de reciclaje de materiales tras la cosecha (Tabla 1).

Tabla 1. Costes (€ ha^{-1}) para la producción de pimiento para fresco al aire libre.

Operaciones		**Costes (€ ha^{-1})**
Preparación del terreno		1448
Operaciones de ciclo de cultivo		3931
Acolchado plástico	PE	548
	Mater-Bi®	1308
	Sphere®	916
	Bioflex®	1075
	Ecovio®	649
Acolchado papel	Mimgreen®	1264
	Arrosi® 69	1202
	Arrosi® G	1536
	Arrosi® 240	1202
Cosecha		2340
Acondicionamiento parcela escenario no	No manejo	408.5
	Vertedero	418
	Reciclado	424
Acondicionamiento parcela escenario biodegradable		232

[a] Para un consume de plástico de 160 kg ha^{-1}. Costes de retirada del campo, tiempo de transporte a vertedero o a planta recicladora incluidos cuando necesario.

La Tabla 2 muestra los resultados de cosecha y los subsidios para cada material utilizado. A pesar de no haber diferencias significativas, el valor de la cosecha para el PE fue de los más bajos confirmando evidencias previas como la de Lahoz et al. (2014) quienes reportaron producciones de pimiento mayores con algunos de los acolchados biodegradables en comparación con el PE. Los subsidios sólo se contemplan con los acolchados plásticos biodegradables, tal como contempla la legislación actual.

Tabla 2. Cosecha experimental (t ha^{-1}) de pimiento al aire libre, subsidios para los materiales de acolchado en 2014.

Tipo de acolchado	Materiales de acolchado	Cosecha (t ha^{-1})	Subsidios (€ ha^{-1})
Acolchado plástico no biodegradable	PE	24.6 a	0
Acolchado plástico biodegradable	Mater-Bi®	29.2 a	407.4
	Sphere®	25.8 a	270.2
	Bioflex®	24.4 a	325.9
	Ecovio®	23.3 a	176.8
Acolchados de papel	Mimgreen®	26.7 a	0
	Arrosi®69	25.3 a	0
	Arrosi®G 1a	26.9 a	0
	Arrosi®240	28.5 a	0

Valores de cosecha seguidos de la misma letra significa que no hay diferencias estadísticamente entre tratamientos (p = 0.45).

Márgenes netos

La Tabla 3 resume las principales variables económicas analizadas. Los costes sólo aumentaron en un 0,11% con respecto del total si contemplamos la gestión de residuos en vertedero y un 0,18% si se reciclan. Estos resultados sugieren que los costes de manejo de residuos tanto a través de vertedero como de reciclado no afectan significativamente a la rentabilidad final. Si comparamos con los escenarios en los que se utilizan los materiales biodegradables, los valores oscilaron entre el 2,2 y el 9,3% más que el escenario base de PE. Referente a la rentabilidad final, los acolchados plásticos biodegradables Mater-Bi® y Sphere® obtuvieron mayores márgenes netos que el PE, entre un 26.9 y un 6,7% sin subsidio. En cambio, los materiales Bioflex® and Ecovio® redujeron la rentabilidad en un 1,6 y un 6,9%, respectivamente, en comparación con el PE. En cuanto a los papeles, el material Arrosi®240 es el que más margen obtiene, un 22,8%. Estos aumentos en la rentabilidad son resultado de una mayor cosecha que la mayoría de acolchados biodegradables obtuvo en el ensayo de campo.

Tabla 3. Ingresos, costes y margen neto de diferentes materiales de acolchado. (€ ha^{-1}).

Tipo acolchado	Materiales acolchado	Escenarios	Ingresos	Costes	Margen neto	% respecto al PE
Acolchado plástico no biodegradable	PE	No manejo residuos	21,549.6	8675.3	12,874.3	-
		Vertedero	21,549.6	8684.8	12,864.8	99.9
		Reciclado	21,549.6	8690.8	12,858.8	99.9
Acolchado plástico biodegradable	Mater-Bi®	Sin subsidio	25,579.2	9258.8	16,320.4	126.8
		Con subsidio	25,986.6		16,727.8	129.9
	Sphere®	Sin subsidio	22,600.8	8866.8	13,734.0	106.7
		Con subsidio	22,871.0		14,004.2	108.8
	Bioflex®	Sin subsidio	21,374.4	9025.8	12,348.6	95.9
		Con subsidio	21,700.3		12,674.5	98.4
	Ecovio®	Sin subsidio	20,410.8	8599.8	11,811.0	91.7
		Con subsidio	20,587.6		11,987.8	93.1
Acolchados de papel	Mimgreen®	Sin subsidio	23,389.2	9214.8	14,174.4	110.1
	Arrosi®69	Sin subsidio	22,162.8	9152.8	13,010.0	101.1
	Arrosi®G 1a	Sin subsidio	23,564.4	9486.8	14,077.6	109.3
	Arrosi®240	Sin subsidio	24,966.0	9152.8	15,813.2	122.8

Sin embargo, dado que no hay diferencias significativas en la cosecha entre materiales, si contemplamos la misma cosecha para todos los materiales, los subsidios no son suficientes para compensar el coste extra que suponen los materiales biodegradables sólo en el caso de los materiales Ecovio® y Sphere® (datos no mostrados). El porcentaje de subsidio necesario para que los acolchados sean viables económicamente como el PE varía entre el 45,1% para el papel Arrosi® 69 y el 58,6% Arrosi® G1a. Los cálculos demuestran que el subsidio debería ser del 50.1%, que corresponde con el material de mayor coste, el acolchado plástico Mater-Bi®. Concluyendo, aunque 6 de 8 materiales evaluados han demostrado ser alternativas viables al PE bajo condiciones de campo, sólo dos son buenas alternativas potenciales desde un punto de vista económico bajo los actuales subsidios y en el caso de que las producciones fueran las mismas que con PE.

3. Agradecimientos

A J.A. Alins, F. Arrieta, y D. Redondo por su valiosa ayuda en los trabajos de campo. A las empresas Verso Paper Corporation, Fábrica de papeles crepados Arrosi S.A., BASF S.E., FKuR Kunststoff GmbH, Mimcord S.A., Novamont S.p.A., Oerlemans Plastics BV, Stora-Enso Finland y Sphere Group Spain S.L. que nos facilitaron los materiales generosamente. Este trabajo ha sido financiado por los proyectos INIA RTA2011-00104-C04-00 y RTA2017-00082-00-00 del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente y ECO2016-75927-R del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

Referencias

CIRUJEDA A, AIBAR J, ANZALONE A, MARTÍN-CLOSAS L, MECO R, MORENO MM et al. (2012) Biodegradable mulch instead of polyethylene for weed control of processing tomato production. *Agronomy for Sustainable Development*, **32**, 889-897.

LAHOZ I, MACUA JI, CIRUJEDA A, AIBAR J, MARÍ AI, PARDO G et al. (2014) Influencia del acolchado biodegradable en la producción de pimiento. In: Proceedings XIII Jornadas del Grupo de Horticultura, I Jornadas del Grupo de Alimentación y Salud. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas (3,4 junio 2014, Logroño, España). 203-208. Logroño, España.

MAPAMA (2018), Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivos (ESYRCE) (2017). Disponible online: http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/esyrce/ (consultado el 30 marzo 2018)

MARÍ A, PARDO G, CIRUJEDA A, MARTÍNEZ Y (2019) Economic and Environmental Evaluation of Biodegradable Plastic Films and Paper Mulches Used in Open-Air Grown Pepper (*Capsicum annum* L.) Crop. Agronomy, **9**, 36.

Economic and environmental evaluation of biodegradable plastic films and paper mulches used in open-air grown pepper (*Capsicum annum* L.) crop

Summary: Black polyethylene (PE) is the most common mulching material used in horticultural crops but its use represents a very serious environmental problem. Biodegradable films and paper mulches are available alternatives but farmers are reluctant to introduce them because of their high market prices. The aim of this paper is to evaluate the economic profitability of eight biodegradable mulching materials available for open-air pepper production. The economic evaluation is based on a four-year experimental trial located in a semi-arid region of Spain. Three scenarios of PE waste management are examined: i) absence of residues management, ii) landfill accumulation, and iii) total recycling. The inclusion of the costs of waste management and recycling under the current Spanish legislation only reduced the final net margin by 0.2%. The results show that an increase in subsidy rates of up to 41.7% on the market price would allow all biodegradable films to be economically similar alternatives to PE.

Keywords: waste management, economic evaluation, biodegradable mulch, polyethylene

Sistemas de bajo coste para la reconstrucción tridimensional de plantas en estadio temprano

ANDÚJAR D, MARTÍNEZ-GUANTER J, RIBEIRO A, GERHARDS R, BENGOCHEA-GUEVARA JM, PETEINATOS G

[1]Centre for Automation and Robotics, CSIC-UPM, Arganda del Rey, Madrid 28500, SPAIN
d.andujar@csic.es, jose.bengochea@csic.es, angela.ribeiro@csic.es
[2]Department of Aerospace Engineering and Fluids Mechanics, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica (ETSIA), Universidad de Sevilla, 41013 Sevilla, SPAIN
martinezj@us.es, manuelperez@us.es
[3]University of Hohenheim, Otto-Sander-Straße 5, 70599 Stuttgart, GERMANY
G.Peteinatos@uni-hohenheim.de, Roland.Gerhards@uni-hohenheim.de

Resumen: Los algoritmos de procesamiento tridimensional se están expandiendo rápidamente en los programas de fenotipado y en la toma de decisiones para la gestión agrícola. Para su uso práctico es necesario cuantificar el equilibrio entre el coste del equipo, los recursos computacionales necesarios y la fidelidad y precisión en la reconstrucción de los detalles finales. Este estudio examinó las posibilidades de dos sistemas de bajo coste para la reconstrucción de plantas. Los métodos probados fueron un procedimiento fotogramétrico y un método de reconstrucción utilizando un sensor RGB-D Kinect v2. La información fue procesada para la creación de la nubes de puntos, lo que permitió la creación de un modelo 3D que representaba cada planta escaneada. Los parámetros medidos a partir del modelo fueron validados con datos de la altura de la planta, índice de área foliar y biomasa seca. El método fotogramétrico mostró un resultado ligeramente mejor en la reconstrucción de los detalles finales. Aunque el uso del algoritmo de procesamiento es relativamente rápido, el uso de información RGB-D es más rápido durante la creación de los modelos 3D.

Palabras clave: Fenotipado, Structure from Motion; RGB-D

1. Introducción

La creación de modelos tridimensionales de plantas puede proporcionar una visión general más detallada de las bases del desarrollo a lo largo del ciclo de vida. La accesibilidad y disponibilidad de esta información permite tomar decisiones más adecuadas y complejas sobre la extracción de los parámetros de la planta a partir de modelos digitales que permiten los procesos de toma de decisiones para la selección de plantas o la gestión agronómica. Los dispositivos electrónicos pueden caracterizar rápidamente los cultivos de una manera no destructiva, precisa y repetible.

Así, pueden medir y caracterizar formas complejas de plantas proporcionando información esencial a los programas de mejoramiento de plantas, necesaria para modificar los rasgos relacionados con la fisiología, la arquitectura, el estrés o el manejo agronómico (Walter et al.,

2015). La creación de modelos 3D mediante sensores capaces de estimar distancias está abriendo nuevas oportunidades en los procesos de fenotipado al aumentar la eficiencia y la precisión (Gibbs et al., 2017). Durante las dos últimas décadas, el uso de diversos sensores de medición ha permitido estimar la distancia entre el sensor y un objeto, lo que permite describir la morfología con gran precisión creando modelos 3D cuando se añade una tercera dimensión debido al movimiento y al desplazamiento del sensor como ocurre con sensores Lidar o ultrasonido (Andújar et al., 2013). Sin embargo estos sistemas carecen de la información del RGB. Se puede añadir color a los modelos mediante la fusión de sensores. La combinación de los dispositivos de detección tradicionales con la información RGB de una cámara es un reto y aún tiene algunas limitaciones. La aparición de nuevos sensores en el mercado procedentes de diferentes sectores abrió nuevos métodos para la caracterización tridimensional de estructuras vegetales. Asi uno de los principales sistemas son las cámaras RGB-D que fueron creadas principalmente para la industria del juego. Paulus, et al. (Paulus et al., 2014) evaluó las posibilidades del RGB-D en comparación con un LiDAR de alta precisión para medir las raíces de plantas de remolacha azucarera. Concluyeron que los sensores RGB-D podrían reemplazar sistemas láser en muchos de los escenarios de fenotipado. Andújar, et al. (Andújar et al., 2016) reconstruyó árboles a diferentes velocidades de viento estimando el Índice de Área Foliar (LAI) y el volumen de árboles demostrando el potencial de estos sensores para la reconstrucción tridimensional. Sin embargo, todavía hay algunos problemas que deben ser resueltos, tales como una reconstrucción adecuada de los detalles finales necesarios en algunos programas de fenotipado. En este sentido, en los últimos años ha surgido un nuevo enfoque basado en el uso de fotogrametría digital con cámaras RGB. La visión estereoscópica permite la adquisición de una alta definición. Además, la combinación de cámaras e imágenes mediante técnicas de Structure from Motion (SfM) crea modelos de alta fidelidad.

El objetivo de este estudio fue evaluar la combinación de algunos de los métodos y sensores más novedosos para la reconstrucción tridimensional de plantas en estadio temprano de desarrollo. Los cultivos a caracterizar fueron maíz, remolacha azucarera y girasol. Específicamente se analizaron las capacidades y limitaciones de los diferentes principios y sistemas en términos de precisión para extraer varios parámetros relacionados con la morfología de estos cultivos. La metodología comparó la precisión y las capacidades de los algoritmos de desarrollo para procesar las nubes de puntos para la construcción de modelos tridimensionales.

2. Material y Métodos

La experimentación se realizó en la finca experimental de la Universidad de Hohenheim (Stuttgart, Alemania) donde se probaron diferentes métodos de reconstrucción utilizando cámaras RGB-D y procedimientos de fotogrametría digital en tres cultivos diferentes: maíz (Zea mays L.), remolacha azucarera (Beta vulgaris L.) y girasol (Helianthus annuus L.). Las plantas se encontraban en estadios de desarrollo entre 13 y 19 de la escala BBCH (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und CHemische Industrie) (Landcashire et al., 1991).

El primer método que se utilizó fue de reconstrucción mediante Structure from Motion (SfM) para crear modelos en 3D sobre imágenes RGB. Los algoritmos SfM se aplicaron a un conjunto de imágenes digitales, que fueron adquiridas secuencialmente desde una vista cenital, permitiendo una correcta superposición entre imágenes para crear modelos 3D de alta precisión. En el segundo método se probó un algoritmo de adquisición y reconstrucción utilizando un sensor RGB-D Kinect v2 siguiendo un procedimiento de adquisición de imágenes similar

Reconstrucción tridimensional por fotogrametría

Para la reconstrucción del modelo se utilizó el método de Structure from Motion (SfM). Se utilizó un conjunto de imágenes que cubrían cada planta desde diferentes angulos de visión. El conjunto estaba formado por aproximadamente 30 a 40 imágenes por muestra buscaando una cobertura completa de la planta dependiendo del tamaño de esta. Las imágenes se adquirieron manualmente con una cámara Sony Cyber-shot DSC-HX60 (Sony, Tokio, Japón) siguiendo una ruta concéntrica a tres alturas diferentes. Las imágenes fueron tomadas con una superposición mínima con la anterior del 90%. La cámara se mantuvo a unos 50 cm del tallo de la planta en cada toma.

El modelo fue procesado en el software Agisoft PhotoScan Professional Edition (Agisoft LLC, San Petersburgo, Rusia) versión 1.0.4. para la reconstrucción de los Modelos Digitales de Superficie (DSM) de cada planta. El DSM se construyó en base a la relación entre la posición de la cámara y las imágenes. La proyección de las imágenes y su combinación permite la creación del DSM mediante la búsqueda de puntos comunes en la escena. El proceso crea una densa nube de puntos en 3D, que más tarde se utiliza para la creación del modelo sólido. El tratamiento se dividió en tres pasos automáticos: (1) alineación de imágenes; (2) construcción de la geometría; y (3) generación de las nubes de puntos. Posteriormente, el modelo se escaló manualmente de acuerdo con las escalas gráficas ubicadas alrededor del tallo de la planta.

Reconstrucción tridimensional mediante sensores RGB-D

También se evaluó un sistema basado en un sensor RGB-D Microsoft Kinect® v2. El sensor tiene una cámara RGB de 1080p, una cámara infrarroja (IR) y varios micrófonos. El cálculo de la distancia se basa en el principio de ToF. La distancia se calcula simultáneamente para cada píxel capturado de la escena. Este nuevo modelo Kinect puede adaptar automáticamente el tiempo de exposición del sensor RGB, permitiéndole obtener imágenes más brillantes que la versión anterior. El RGB tiene una resolución de 1920×1080 píxeles, mientras que la resolución de la cámara IR es de 512x424 píxeles. El sensor de la cámara IR cuenta con un campo de visión de 70° horizontalmente y 60° verticalmente para obtener información de profundidad, y puede capturar información desde 0,5 m a 4,5 m. La velocidad de imagen puede ajustarse hasta 30 fps, lo que garantiza la superposición entre las imágenes necesarias para los procesos de reconstrucción.

El proceso de adquisición se realizó con un portátil Intel CORE i7-4710HQ con Windows 7, 16 GB de memoria RAM y una tarjeta gráfica Nvidia GeForce GTX de 2 Gb con una unidad de procesamiento gráfico (GPU). Los datos sin procesar se grabaron utilizando Kinect Studio en modo vídeo. La planta fue escaneada siguiendo una ruta concéntrica, de forma similar a la adquisición de imágenes del sistema anterior. El software de reconstrucción fusiona las diferentes imágenes de profundidad consecutivas y superpuestas. En este procedimiento se desarrolló y utilizó un proceso totalmente automático de superposición de imágenes de profundidad utilizando el algoritmo descrito en (Nießner et al., 2013), con una variante del algoritmo iterativo de punto más cercano (ICP) (Chéné et al., 2012), que mejora la precisión de la nube de puntos.

Seguidamente se realizaron mediciones manuales en cada planta. La altura máxima de cada planta se calculó mediante el método del cilindro extendido desde la base hasta el extremo del tallo principal, indicando así la altura máxima del tallo (Rose et al., 2015). Posteriormente, las plantas se almacenaron en bolsas de papel y se secaron en estufa para la determinación de la biomasa de la planta. El peso de la biomasa se determinó secando las muestras a 78ºC durante 48h.

3. Resultados y Discusión

Los sistemas de reconstrucción tridimensional crearon diferentes modelos (Figura 1). Los modelos en todos los casos fueron muy similares a la realidad con pequeños errores que fueron ligeramente diferentes entre los modelos basados en Kinect y los creados por fotogrametría. Aunque en todos los casos los errores aparecieron al final de los bordes de las hojas y ramas, las mediciones del Kinect v2 fueron más imprecisas que las de la fotogrametría. Aunque los últimos detalles finales no se reconstruyeron correctamente, la reconstrucción mostró una alta fidelidad como se muestra en el análisis estadístico.



Figura 1. Diferentes ejemplos de plantas reconstruidas desde diferentes ángulos de visión utilizando sistemas basados en Kinect (arriba) y fotogrametría (abajo)

Los parámetros medidos usando los sistemas de modelado mostraron una alta correlación con los datos de la verdad terreno y la biomasa seca. De hecho, se observó una buena consistencia en las ecuaciones de correlación lineal entre los parámetros estimados por el modelo digital 3D y sus valores reales medidos en las plantas (Figuras 2 y 3).

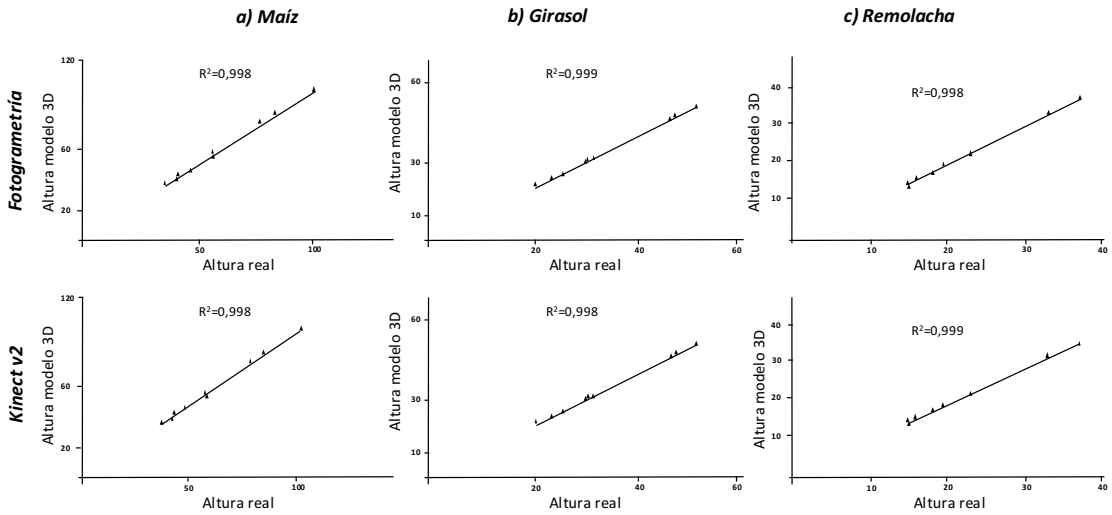


Figura 2. Valores de regresión entre alturas reales y estimadas por los modelos

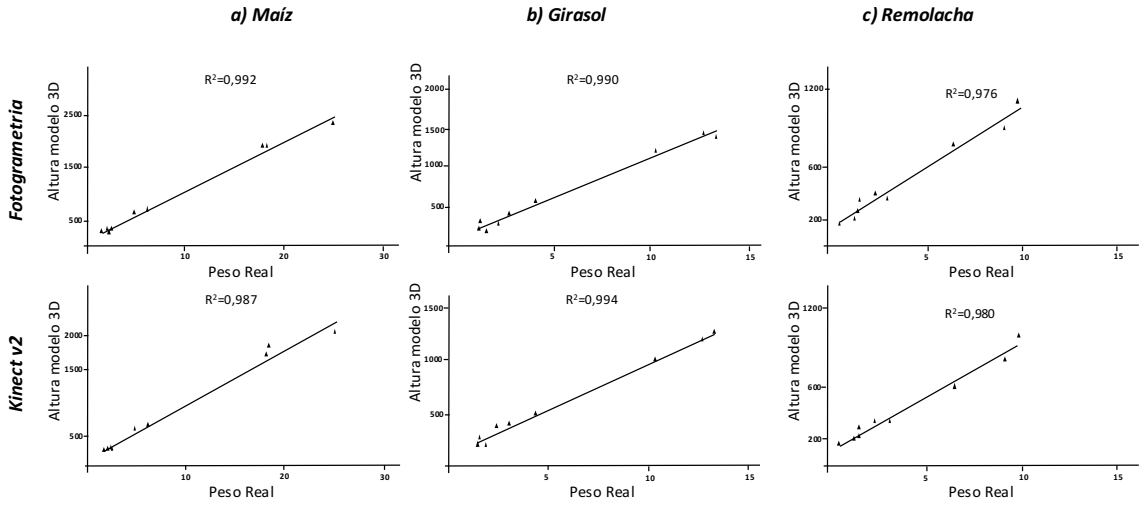


Figura 3. Valores de regresión entre pesos reales y estimados

Aunque los valores generales fueron similares entre ambos métodos tridimensionales, surgieron pequeñas diferencias cuando el cultivo muestreado fue analizado independientemente. Estas pequeñas diferencias pueden deberse al movimiento manual de la cámara y a las áreas ocultas durante el escaneado (Paproki et al., 2012). Por lo tanto, el detalle final puede mejorarse aumentando el tamaño de la muestra o reduciendo la distancia desde la cámara hasta la planta objetivo. Sin embargo, esta modificación en el proceso de adquisición aumentaría el tiempo de adquisición de datos y el procesamiento de datos.

4. Agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada por los proyectos Ramón y Cajal RYC-2016-20355, AGL2017-83325-C4-3-R, y José Castillejo CAS18/00123 (Ministerio de Economía y Competitividad). La investigación que ha dado lugar a estos resultados ha recibido financiación de RoboCity2030-DIH-CM Madrid Robotics Digital Innovation Hub ("Robótica aplicada a la mejora de la calidad de vida de los ciudadanos. fase IV"; S2018/NMT-4331), financiada por "Programas de Actividades I+D en la Comunidad de Madrid" y cofinanciada por los Fondos Estructurales de la UE.

Referencias

ANDÚJAR D, ESCOLÀ A, ROSELL-POLO JR, FERNÁNDEZ-QUINTANILLA C & DORADO J (2013) Potential of a terrestrial LiDAR-based system to characterise weed vegetation in maize crops. *Computers and Electronics in Agriculture* **92**, 11-15.

ANDÚJAR D, ESCOLÀ A, ROSELL-POLO JR et al. (2016) A LiDAR-Based System to Assess Poplar Biomass. *Gesunde Pflanzen* **68**, 155-162.

CHÉNÉ Y, ROUSSEAU D, LUCIDARME P et al. (2012) On the use of depth camera for 3D phenotyping of entire plants. *Computers and Electronics in Agriculture* **82**, 122-127.

GIBBS JA, POUND M, FRENCH AP, WELLS DM, MURCHIE E & PRIDMORE T (2017) Approaches to three-dimensional reconstruction of plant shoot topology and geometry. *Functional Plant Biology* **44**, 62-75.

LANDCASHIRE P, BLEIHOLDER H, BOOM TVD et al. (1991) A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. *Annals of Applied Biology* **119**, 561-601.

NIEßNER M, ZOLLHOFER M, IZADI S & STAMINGER M (2013) Real-time 3D reconstruction at scale using voxel hashing. *ACM Trans. Graph.* 32, 1-11.

PAPROKI A, SIRAULT X, BERRY S, FURBANK R & FRIPP J (2012) A novel mesh processing based technique for 3D plant analysis. *BMC Plant Biology* **12**, 63.

PAULUS S, BEHMANN J, MAHLEIN A-K, PLÜMER L & KUHLMANN H (2014) Low-Cost 3D Systems: Suitable Tools for Plant Phenotyping. *Sensors* **14**, 3001.

ROSE J, PAULUS S & KUHLMANN H (2015) Accuracy Analysis of a Multi-View Stereo Approach for Phenotyping of Tomato Plants at the Organ Level. *Sensors* **15**, 9651.

WALTER A, LIEBISCH F & HUND A (2015) Plant phenotyping: from bean weighing to image analysis. *Plant Methods* **11**, 14.

Low Cost Three-dimensional Modelling Systems

Summary: Three-dimensional processing algorithms are expanding rapidly in phenotyping programs and in decision making for agricultural management. It is necessary to quantify the balance between the cost of the equipment, the computational resources required and the fidelity and precision in the 3D reconstruction. This study examined the possibilities of two low-cost systems for plant reconstruction. The methods tested were a photogrammetric procedure and a reconstruction method using an RGB-D Kinect v2 sensor. The information was processed for the creation of point clouds, which allowed the creation of a 3D model representing each scanned plant. The parameters measured from the model were validated with data on plant height, leaf area index and dry biomass. The photogrammetric method showed a slightly better result in the reconstruction of the end details. Although the use of the photogrammetry is relatively fast, the use of RGB-D information is faster during the creation of the 3D models.

Keywords: Plant phenotyping; RGB-D; Structure from Motion.

Estimación de la fecha óptima para cartografiar *Avena sterilis* L. en cultivos de trigo y cebada

PEÑA JM[1], FERNÁNDEZ-QUINTANILLA C[1], LIMA F[2], DORADO J[1]

[1] Grupo tec4AGR0 (Tecnologías Geoespaciales y de Precisión para una Agricultura Sostenible), Instituto de Ciencias Agrarias, CSIC, Madrid, ESPAÑA
jmpena@ica.csic.es, cesar@ica.csic.es, jose.dorado@csic.es
[2] Departamento de Geografía, Universidad de Málaga, Málaga, España
lima@uma.es

Resumen: Para generar mapas de malas hierbas en estados fenológicos tardíos mediante imágenes de teledetección es necesario conocer la fecha en la que la separabilidad espectral de malas hierbas y cultivo sea máxima. El objetivo de este trabajo fue determinar la ventana temporal óptima para la discriminación espectral de *Avena sterilis* L. y de diversas variedades de trigo (*Triticum aestivum* L.) y cebada (*Hordeum vulgare* L.). En cada cereal se monitorizaron sus valores espectrales según el índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI, por sus siglas en inglés), utilizando para ello sensores fijos de medida continua. La mayor separabilidad espectral de *A. sterilis* se obtuvo con los trigos Berdun (con diferencias de NDVI (ΔNDVI) = -0,423) y Aragon-03 (ΔNDVI = -0,314). En estos casos, *A. sterilis* fue más precoz que estas dos variedades de trigo, siendo la fecha óptima de discriminación el 11 de junio (es decir, 195 días después de la siembra, DDS). Por otra parte, la separabilidad de *A. sterilis* con las cebadas Hispanic (ΔNDVI = 0,180) y Carat (ΔNDVI = 0,117) y el trigo Acorazado (ΔNDVI = 0,155) fue notablemente inferior, observándose que la mala hierba fue menos precoz que dichos cultivos, siendo las fechas óptimas de discriminación el 8 de junio (192 DDS) para estas cebadas y el 24 de mayo (177 DDS) para este trigo.

Palabras clave: teledetección, sensores de índices de vegetación, NDVI, separabilidad espectral, control localizado de malas hierbas

1. Introducción

Mediante técnicas de teledetección se pueden cartografiar las malas hierbas presentes en una parcela de cultivo con diversas utilidades, tales como realizar un tratamiento localizado (López-Granados et al. 2016), evaluar la competencia con el cultivo (Peña-Barragán et al. 2010) o, si se incluye la componente temporal, estudiar la dinámica de las infestaciones (Castillejo-González et al. 2019). En el caso de *Avena sterilis* L. se han podido discriminar rodales en época tardía debido a sus diferencias espectrales con el cultivo durante las etapas de floración y maduración, y utilizando tanto imágenes aéreas

(López-Granados et al. 2006) como de satélite (Castillejo-González et al. 2019, Martín et al. 2011a). En estas investigaciones se analizaron imágenes multiespectrales tomadas en parcelas de trigo y cebada, en las que se observó que la reflectancia de varias especies gramíneas fue significativamente diferente en diversas zonas del espectro visible e infrarrojo cercano (NIR, por sus siglas en inglés). A partir de las investigaciones citadas se concluye que para aplicar esta tecnología es necesario conocer la fecha en la que la separabilidad espectral de malas hierbas y cultivo sea máxima (Brown and Noble 2005, Fernández-Quintanilla et al. 2018), y explotar las diferencias basadas en sus distintos estados fenológicos que se reflejan en factores como la altura de las plantas, la fracción de cobertura vegetal y la concentración de pigmentos (Martín et al. 2011b, Shirzadifar et al. 2018). Por tanto, el objetivo principal de este trabajo fue determinar la ventana temporal óptima para la discriminación de *A. sterilis* y de diversas variedades de trigo (Berdun, Aragon-03 y Acorazado) y cebada (Carat e Hispanic) mediante la medida continua de sus variaciones espectrales obtenidas con sensores del índice de vegetación de diferencias normalizadas (NDVI, por sus siglas en inglés) a lo largo de todo el ciclo de desarrollo de dichas especies.

2. Material y Métodos

El estudio se realizó en 2018 en la finca experimental La Poveda (Arganda del Rey, Madrid), en donde se sembraron *A. sterilis* y las variedades de trigo Acorazado, Berdun y Aragon-03 y de cebada Carat e Hispanic en sub-parcelas individuales de 4×4 m^2. La fecha de siembra fue el 5 de diciembre de 2017. Las diversas variedades se seleccionaron según criterios de precocidad y talla de las plantas, siendo la variedad Acorazado de alta precocidad y talla media, las variedades Carat, Hispanic y Berdum de precocidad media y talla medio-baja, y la variedad Aragon-03 de precocidad tardía y talla alta. Sobre cada sub-parcela se instalaron sensores NDVI modelo SRS field-stop (METER group Inc., Pullman, WA, EE.UU.) de medida continua a una altura de 2 metros aproximadamente sobre la superficie y apuntando de manera cenital al suelo, y un sensor NDVI modelo SRS hemisférico apuntando hacia el cielo para medir la radiación incidente (figura 1). El índice NDVI es un buen indicador del desarrollo y estructura de la vegetación, y se ha relacionado con diversas variables como cantidad de biomasa, índice de área foliar, fenología, vigor, etc. (Jin and Eklundh 2014). El NDVI se calcula a partir de medidas de reflectancia en las bandas espectrales del rojo y NIR, según la siguiente ecuación:

$$\mathrm{NDVI} = \frac{\mathrm{NIR} - \mathrm{Rojo}}{\mathrm{NIR} + \mathrm{Rojo}}$$

A lo largo de todo el ciclo de desarrollo de los cultivos y de *A. sterilis* se recogieron las medidas de ambos tipos de sensores NDVI, junto a datos de altura y estado fenológico siguiendo los valores de la escala BBCH para cereales (Lancashire et al. 1991). Las medidas de los sensores se combinaron para cuantificar la radiación reflejada por la vegetación, ya que el cálculo de NDVI requiere conocer tanto la radiación incidente (recogida por el sensor hemisférico) como la reflejada (recogida por el sensor field-stop

en cada sub-parcela). A diferencia de la radiación reflejada, la radiación incidente es espacialmente uniforme por encima de la vegetación, por tanto, sólo se necesitó un sensor hemisférico para calcular el NDVI de todos los sensores field-stop que estén relativamente próximos entre sí. Las diferencias espectrales entre las distintas coberturas se analizaron mediante comparación multi-temporal de los valores NDVI obtenidos, lo que determinó la ventana temporal que presentó una mayor separabilidad espectral de *A. sterilis* con las variedades de trigo y cebada.

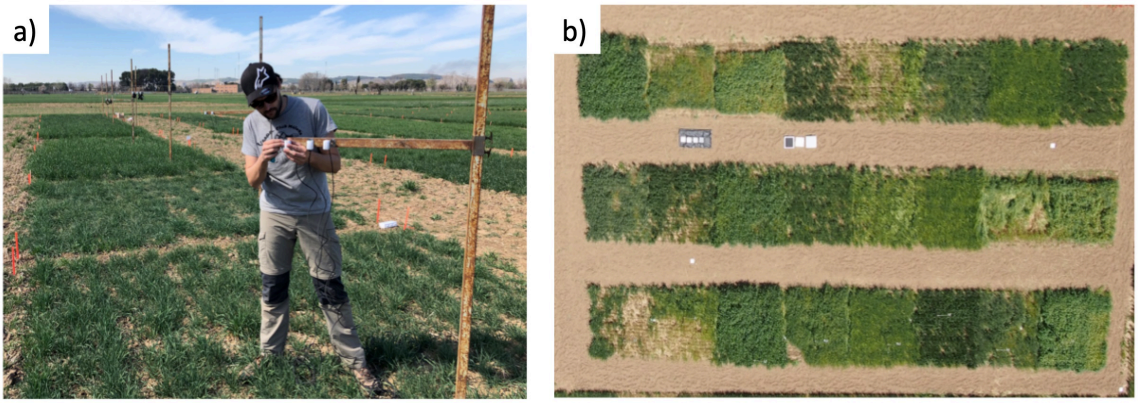


Figura 1. Colocación de sensores en cada sub-parcela (a) e imagen aérea de la parcela experimental (b).

3. Resultados y Discusión

Las diferencias de los valores diarios de NDVI (ΔNDVI) promediados para el rango de horas 11 am – 2 pm obtenidos en cada sub-parcela definieron la separabilidad espectral de *A. sterilis* con las variedades de trigo y cebada en las distintas etapas fenológicas. En general, las diferencias espectrales de *A. sterilis* con dichas variedades fue mínima en los estados fenológicos tempranos (figura 2), salvo en el caso de la cebada Carat entre el 3-10 abril (es decir, 126-134 días después de la siembra, DDS), en donde se observaron valores NDVI de *A. sterilis* moderadamente superiores (ΔNDVI = 0,154) debido quizá a una puntual mayor precocidad fenológica de Carat en la etapa de encañado (figura 3). En general, los valores de NDVI se mantuvieron elevados durante las etapas iniciales con la vegetación en verde, y disminuyeron progresivamente a partir de la etapa de floración y hasta la senescencia completa del cereal.

La separabilidad espectral de *A. sterilis* con las variedades de trigo se inició aproximadamente a partir del 15-mayo (168 DDS), durante las etapas de espigado y floración, y se mantuvo hasta las etapas de formación del fruto y maduración, según el caso. El trigo Acorazado fue más precoz, lo que se tradujo en valores de NDVI inferiores a los de *A. sterilis* durante el resto del experimento, alcanzándose la máxima diferencia espectral entre ambos cereales (ΔNDVI = 0,155) el 24-mayo (177 DDS) y una ventana óptima de discriminación entre el 20 y el 29 de mayo (173-182 DDS), durante la etapa de formación del fruto. Sin embargo, las mayores diferencias espectrales se obtuvieron con los trigos Berdun (ΔNDVI = -0,423) y Aragon-03 (ΔNDVI = -0,314), ya que fueron menos precoces que *A. sterilis*, especialmente

Aragon-03. En ambos casos, la máxima diferencia espectral con *A. sterilis* se alcanzó el 11-junio (195 DDS), observándose una ventana óptima de discriminación entre el 4 y el 13 de junio (es decir, 188-197 DDS), que se corresponde a la etapa de maduración.

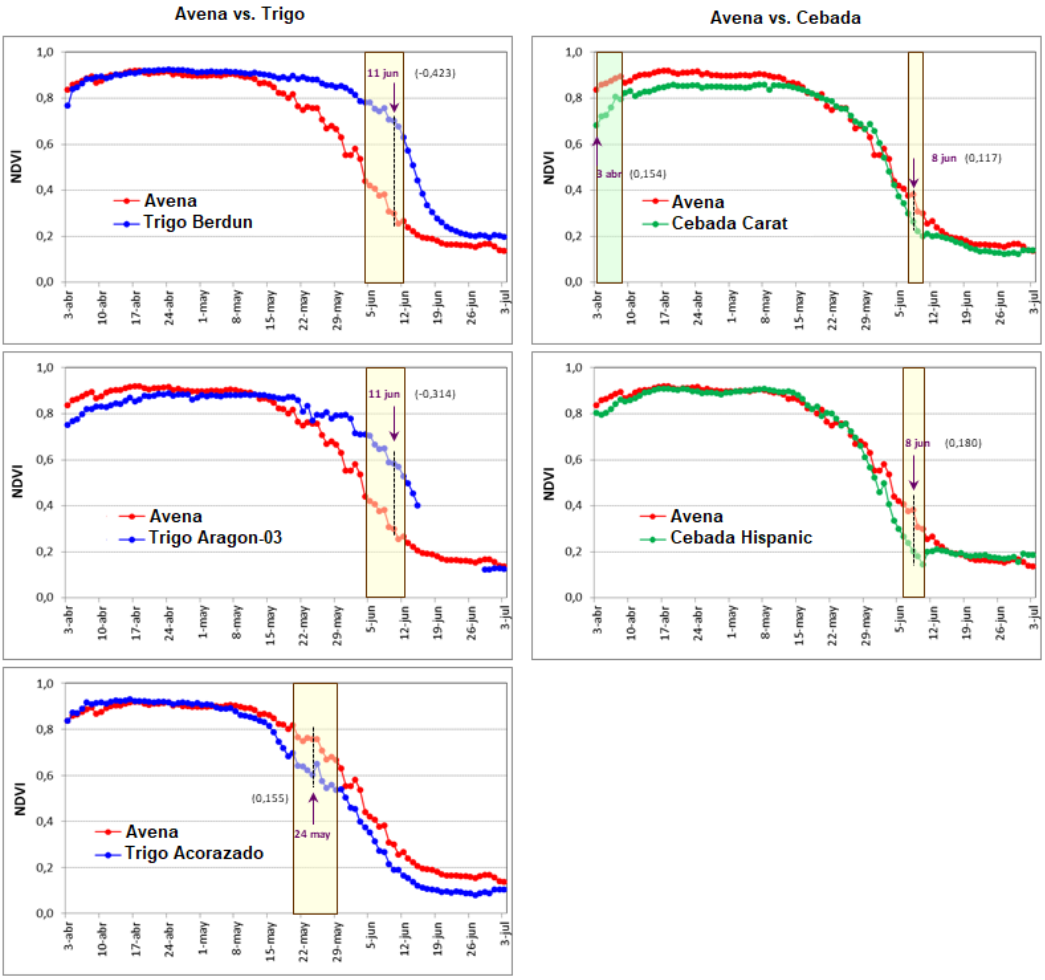


Figura 2. Ventana temporal en la que se obtuvo mayor diferencia espectral entre *A. sterilis* y las variedades de trigo (izquierda) y cebada (derecha) estudiadas.

Por su parte, la separabilidad de *A. sterilis* con las cebadas Hispanic (ΔNDVI = 0,180) y Carat (ΔNDVI = 0,117) fue notablemente inferior que con las variedades de trigo, quizá debido a que el desarrollo de estos cereales fue muy parejo a lo largo del tiempo, y tan sólo se observó cierto adelanto de ambas cebadas en la etapa de maduración. En dicha etapa se determinó una pequeña ventana óptima de discriminación localizada entre el 6 y el 9 de junio (190-193 DDS).

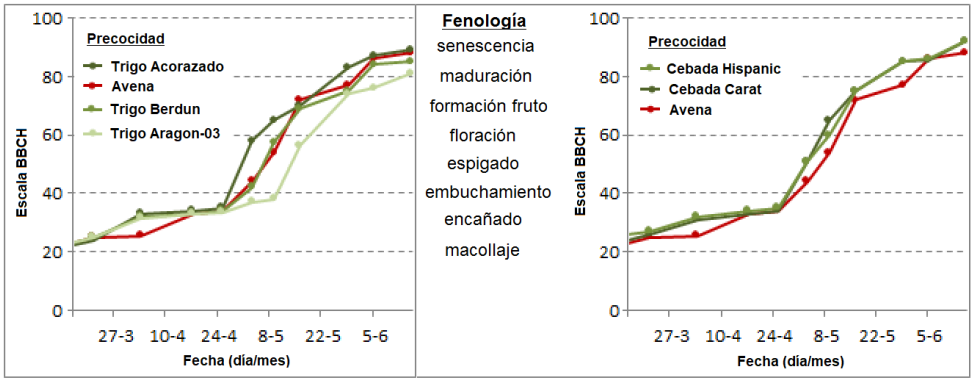


Figura 3. Variación del estado fenológico de A. sterilis respecto a las variedades de trigo (izquierda) y cebada (derecha) siguiendo los valores de la escala BBCH.

4. Conclusiones

Se han investigado las fechas óptimas de discriminación entre *A. sterilis* y diversas variedades de trigo y cebada a partir de las diferencias de valores NDVI adquiridos por un conjunto de sensores fijos de medida continua a lo largo de las diversas etapas fenológicas de los cereales. La diferente precocidad de cada variedad ha sido el factor fundamental para la discriminación en ventanas temporales situadas en las etapas de formación del fruto (en el caso del trigo Acorazado) y de maduración (resto de variedades). Los resultados de este trabajo permiten definir las fechas más adecuadas de adquisición de imágenes remotas multiespectrales con información en las bandas rojo y NIR utilizadas en el cálculo del NDVI para poder cartografiar *A. sterilis* según el tipo y variedad de cultivo de trigo y cebada en donde aparezcan los rodales, con el objetivo de diseñar estrategias de control localizado en un contexto de agricultura de precisión.

5. Agradecimientos

Investigación financiada por el Proyecto AGL2017-83325-C4-1-R de la Agencia Estatal de Investigación (AEI) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Investigación de F. Lima financiada por el Plan Propio de Invest. y Transf. de la Universidad de Málaga.

Referencias

BROWN RB & NOBLE SD (2005) Site-specific weed management: sensing requirements— what do we need to see? *Weed Science* **53**, 252–258.

CASTILLEJO-GONZÁLEZ IL, DE CASTRO AI, JURADO-EXPÓSITO M, PEÑA JM, GARCÍA-FERRER A & LÓPEZ-GRANADOS F (2019) Assessment of the Persistence of Avena sterilis L. Patches in Wheat Fields for Site-Specific Sustainable Management. *Agronomy* **9**, 30.

FERNÁNDEZ-QUINTANILLA C, PEÑA JM, ANDÚJAR D, DORADO J, RIBEIRO A & LÓPEZ-GRANADOS F (2018) Is the current state of the art of weed monitoring suitable for site-specific weed management in arable crops? *Weed Research* **58**, 259–272.

JIN H & EKLUNDH L (2014) A physically based vegetation index for improved monitoring of plant phenology. Remote Sensing of Environment **152**, 512–525.

LANCASHIRE PD, BLEIHOLDER H, BOOM TVD, LANGELÜDDEKE P, STAUSS R, WEBER E et al (1991) A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. *Annals of Applied Biology* **119**, 561–601.

LÓPEZ-GRANADOS F, JURADO-EXPÓSITO M, PEÑA-BARRAGÁN JM & GARCÍA-TORRES L (2006) Using remote sensing for identification of late-season grass weed patches in wheat. *Weed Science* **54**, 346–353.

LÓPEZ-GRANADOS F, TORRES-SÁNCHEZ J, SERRANO-PÉREZ A, DE CASTRO AI, MESAS-CARRASCOSA FJ & PEÑA J-M (2016) Early season weed mapping in sunflower using UAV technology: variability of herbicide treatment maps against weed thresholds. *Precision Agriculture* **17**, 183–199.

MARTÍN MP, BARRETO L & FERNÁNDEZ-QUINTANILLA C (2011a) Discrimination of sterile oat (Avena sterilis) in winter barley (Hordeum vulgare) using QuickBird satellite images. *Crop Protection* **30**, 1363–1369.

MARTÍN MP, BARRETO L, RIAÑO D, FERNANDEZ-QUINTANILLA C & VAUGHAN P (2011b) Assessing the potential of hyperspectral remote sensing for the discrimination of grassweeds in winter cereal crops. *International Journal of Remote Sensing* **32**, 49–67.

PEÑA-BARRAGÁN JM, LÓPEZ-GRANADOS F, JURADO-EXPÓSITO M & GARCÍA-TORRES L (2010) Sunflower yield related to multi-temporal aerial photography, land elevation and weed infestation. *Precision Agriculture* **11**, 568–585.

SHIRZADIFAR A, BAJWA S, MIREEI SA, HOWATT K & NOWATZKI J (2018) Weed species discrimination based on SIMCA analysis of plant canopy spectral data. *Biosystems Engineering* **171**, 143–154.

Optimal dates for mapping *Avena sterilis* L. in wheat and barley crops

Summary: To generate weed maps in late-season using remote-sensed images it is necessary to know the date in which the spectral separability of weeds and crop is maximum. The objective of this work was to determine the optimal time window for spectral discrimination of *Avena sterilis* L. and various varieties of wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). Spectral information of each cereal was monitored according to the Normalized Difference Vegetation Index (NDVI) using fixed continuous measurement sensors. The highest spectral separability of *A. sterilis* was obtained with Berdun wheat (with differences of NDVI (ΔNDVI) = -0.423) and Aragon-03 (ΔNDVI = -0.314). In these cases, *A. sterilis* was earlier than these two wheat varieties, determining an optimal date of discrimination on June 11th (i.e. 195 days after sowing, DAS). On the other hand, the separability of *A. sterilis* with Hispanic (ΔNDVI = 0.180) and Carat (ΔNDVI = 0.117) barley and Acorazado wheat (ΔNDVI = 0.155) was significantly lower, observing that weeds were less early than these crops, being the optimal date of discrimination on June 8th (192 DAS) for these barley and on May 24th (177 DAS) for this wheat.

Keywords: remote sensing, vegetation index sensors, NDVI, spectral separability, site-specific weed control.

UTILIDAD DEL JARDÍN ARVENSE PARA EL ESTUDIO DE LA FENOLOGÍA DE LAS MALAS HIERBAS Y SU APLICACIÓN EN LA AGRICULTURA

GÓMEZ-REGIFE Y, REBOLLO-VALERA M, SOUSA-ORTEGA C, URBANO JM

[1]Departamento Ciencias Agroforestales, ETSIA, Universidad de Sevilla, ESPAÑA.
aygomezregife@gmail.com

Resumen: La Cátedra Adama ha incentivado la creación de un jardín de especies arvenses en la ETSIA de la Universidad de Sevilla. Se trata de un jardín botánico pero dedicado a las malas hierbas, y su principal objetivo es su uso como herramienta docente. Sin embargo, también puede convertirse en una herramienta con gran potencial desde el punto de vista de la investigación.

El objetivo principal de este trabajo es mejorar el conocimiento del desarrollo fenológico de las principales especies arvenses de la zona del Valle del Guadalquivir, a partir de datos recopilados en el Jardín Arvense de la ETSIA.

Con frecuencia semanal, se han realizado anotaciones del estado fenológico de cada una de las plantas que se dejaban crecer en cada maceta (máximo 3 plantas por maceta). Si se tiene en cuenta que el mencionado Jardín Arvense cuenta con 150 especies de 50 familias botánicas, el resultado es una gran base de datos que, gestionándola con un enfoque agronómico y complementada con los datos meteorológicos, puede aportar información de gran utilidad para el manejo racional de las malas hierbas. Por ejemplo, se puede estimar el momento más adecuado para realizar un tratamiento herbicida, en el que la mala hierba es más sensible, es posible identificar las especies que estén en un período de roseta más amplio, lo que podría estar relacionada con la competencia con el cultivo. También se podría identificar aquellas especies que, según su momento de floración, tengan un efecto positivo sobre la fauna auxiliar, no debiendo considerarse mala hierba en estos casos.

Palabras clave: competencia, tratamiento, Malherbología, Arvenses.

1. Introducción

Un Jardín Arvense es similar a un jardín botánico temático en el que se incluyen especies catalogadas como malas hierbas por diferentes motivos.

La cátedra Adama es una cátedra Universidad-Empresa creada en el año 2015 y uno de sus principales objetivos es mantener y fomentar el Jardín Arvense de la ETSIA de la Universidad de Sevilla, que ha demostrado ser una excelente herramienta docente, divulgativa y de investigación. Adicionalmente la cátedra Adama fomenta el establecimiento de otros jardines arvenses en distintos puntos de España.

En el jardín de la ETSIA se toman, con frecuencia semanal y desde octubre de 2016, datos del estado fenológico de cada especie arvense. Si se tiene en cuenta que el jardín cuenta con más de 230 macetas y 144 especies vegetales arvenses distintas, es evidente que puede ser una herramienta con gran potencial desde distintos puntos de vista (investigación, docencia, divulgación, etc.).

El conocimiento de la evolución de la fenología de las malas hierbas es importante para un correcto manejo del problema (Ghersa y Martínez-Ghersa 2000). En la gran mayoría de los casos las plantas se hacen más difíciles de controlar conforme más desarrolladas están. Y es una evidencia que el retraso de las aplicaciones herbicidas obliga a un mayor gasto, consiguiendo una menor eficacia y aumentando el riesgo de fallo de control (Shaner y Beckie 2014, Storkey 2004).

Pero el conocimiento de la fenología de las malas hierbas no sólo puede ser interesante para mejorar la eficacia de su control si no para tener más y mejores argumentos que permitan llevar a cabo un correcto manejo del problema. Por ejemplo, si una especie entomógama tiene un periodo de floración muy precoz puede ser interesante para el mantenimiento de ciertas especies de insectos beneficiosos. Además, el conocimiento de la fenología puede tener interés también para cuestiones no agrícolas, por ejemplo, para conocer el riesgo de alergias por determinados pólenes, etcétera.

En España existe una carencia de información respecto la evolución del desarrollo fenológico de las malas hierbas y su posible modelización matemática. Y, por tanto, surge este trabajo con el objetivo de representar la evolución de la fenología de las especies de este Jardín Arvense de un modo gráfico, práctico y de utilidad para los técnicos de campo.

2. Material y Métodos

El material vegetal ha consistido en 144 especies vegetales, cultivadas en el Jardín Arvense de la ETSIA. Para cada especie, se ha realizado el seguimiento de un máximo de 3 individuos por maceta. En 59 de las 144 especies, se contó con 2 macetas por especie, lo que supone un seguimiento de 6 individuos por año y especie.

Para la realización del ensayo, se contó con el mismo material que el descrito por Rebollo-Valera *et al.* (2019), de modo que en cada maceta de dimensiones 30 cm de alto y 35,5 cm de diámetro se cultivaron un máximo de tres plantas de la misma especie.

Durante tres años agrícolas (2016-17, 2017-18, 2018-19) se midió la fenología de cada planta de cada maceta con frecuencia semanal, utilizando la escala BBCH (Hess et al. 1997).

2.1. Realización de gráficas

Los resultados se obtuvieron con el programa estadístico RStudio ({R Core Team} 2017), realizando los distintos gráficos mediante la función ggplot con geom_violin del paquete tidyverse (Wickham 2017).

3. Resultados y Discusión

A continuación, se exponen una serie de gráficas realizadas a partir de esta base de datos, utilizando como ejemplo la especie *Centaurea diluta* Aiton.

En la Figura 1 se representa la evolución de la fenología de la especie *Centaura diluta*, a modo de ejemplo, en función del calendario, pero en el eje de las abscisas se pueden considerar otros parámetros, como la integral térmica, etcétera.

En este gráfico se puede observar que no es fácil representar la evolución fenológica en el sentido que la escala BBCH tiene un comportamiento cuantitativo para cada estado fenológico y cualitativo si se compraran distintos estados fenológicos. Es decir, los valores de 11 a 19 se pueden considerar cuantitativos, porque indican el número de hojas, mientras que los valores de 21 y 31 serían cualitativos (hijos y nudos para monocotiledóneas). Por ese motivo, se presenta el gráfico de la Figura 2, donde se separan los distintos estados fenológicos y se realiza un análisis meramente descriptivo con gráficos tipo violín.

En la Figura 1, se expone la fenología tomada durante los tres años del ensayo. En el eje X se representa la Fecha desde el inicio de la primera toma de datos de fenología hasta el final del ciclo, mientras que en el eje Y se representa la escala BBCH. Cada color corresponde a una planta diferente, obteniéndose entonces información de varias plantas para cada año.

En la Figura 2, se representa la evolución de la fenología de los tres años agrupada en un único gráfico. Cada color representa los distintos estados fenológicos de la mala hierba, lo cual hace más amigable la visualización y la comparación entre gráficos de distintas especies.

Aunque es posible que los percentiles de la fenología tengan menos importancia en comparación con la evolución de las emergencias, se mantienen los que hacen referencia a los mismos porcentajes de Rebollo-Valera *et al.* (2019), es decir, 10%, 50% y 90 %.

En todo caso, el análisis del gráfico de la Figura 2 permite observar que existe un cambio fenológico de roseta a fase vegetativa en torno al 15 de febrero, por lo tanto, cabe esperar un aumento la dificultad de control para esta especie. En el caso de que se tratase de una especie anemófila con problemas de alergia para las personas, el periodo con más probabilidad de encontrar problemas de alergias sería el intervalo desde el 15 de abril al 15 de junio.

. El resto de las gráficas de las demás especies del Jardín Arvense se encuentran en la página de la Cátedra Adama: (https://adamacatedra.es/).

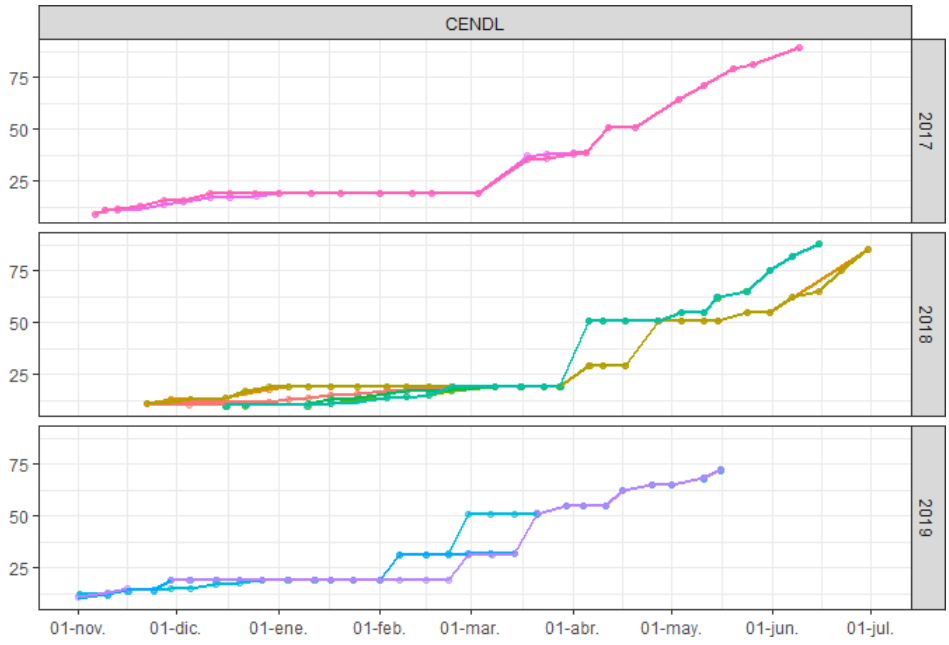


Figura 1: Evolución de la fenología de *Centaurea diluta* durante los años 2017,2018 y 2019. En el eje X se representa la Fecha desde el inicio de la primera toma de datos de fenología hasta el final del ciclo, mientras que en el eje Y se representa la escala BBCH. Cada color corresponde a una planta diferente, obteniéndose entonces información de varias plantas para cada año.

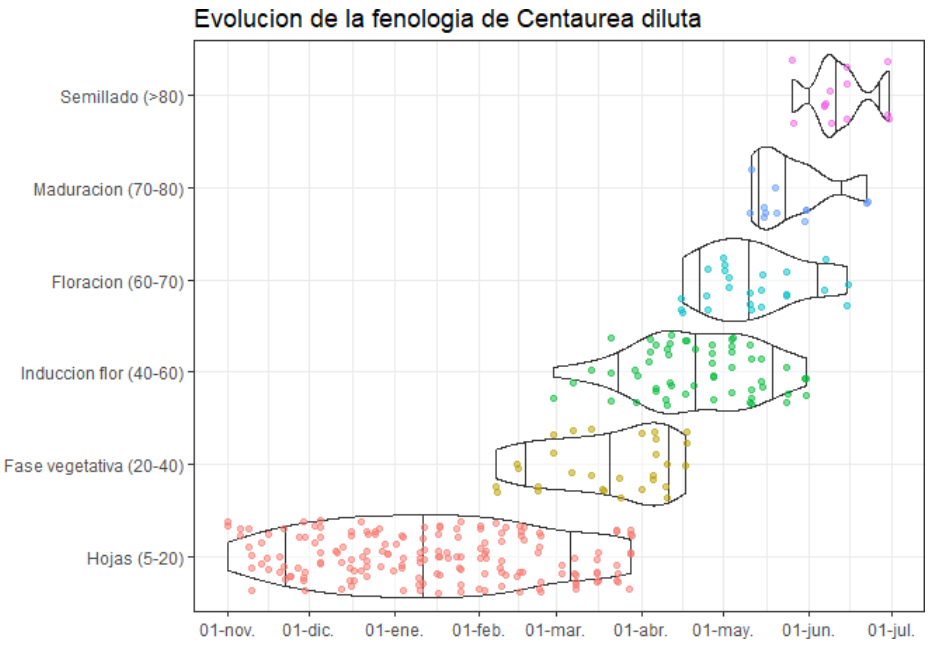


Figura *2*: Evolución de la fenología de Centaurea diluta agrupada en un único gráfico. Cada color representa los distintos estados fenológicos de la mala hierba. Dentro de cada violín se observan distintos percentiles, dividiéndose según porcentaje de tiempo que permanecen en ese estado fenológico cada planta. La primera línea vertical dentro del percentil hace referencia al 10%, la segunda línea al 50% y la tercera línea al 90%.

4. Referencias

{R Core Team} (2017) R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria.: *R Foundation for Statistical Computing*

Cátedra Adama (2019). https://adamacatedra.es/. Accessed June 11, 2019

Ghersa CM, Martínez-Ghersa MA (2000) Ecological correlates of weed seed size and persistence in the soil under different tilling systems: Implications for weed management. *Field Crops Research* **67**:141–148

Hess M, Barralis G, Bleiholder H, Buhr L, Eggers T, Hack H, Stauss R (1997) Use of the extended BBCH scale - General for the descriptions of the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. *Weed Research* **37**:433–441

Rebollo Valera M, Gómez Regife Y, Sousa Ortega C, Urbano JM (2019) Utilización del Jardín Arvense para el estudio de las emergencias y sus aplicaciones para la agricultura. Departamento de Ciencias Agroforestales, ETSIA, Universidad de Sevilla.

Shaner DL, Beckie HJ (2014) The future for weed control and technology. *Pest Management Science* **70**:1329–1339

Storkey J (2004) Modelling seedling growth rates of 18 temperate arable weed species as a function of the environment and plant traits. *Annals of Botany* **93**:681–689

Wickham H (2017) tidyverse: Easily Install and Load the “Tidyverse.” Cran-R:1–5

WEED GARDEN USE FOR WEED PHENOLOGY STUDY AND ITS APPLICATION IN AGRICULTURE

Summary: The Adama Cátedra has encouraged the creation of a garden of weed species in the ETSIA of the University of Seville. It is a botanical garden but dedicated to weeds, and its main objective is its use as a teaching tool. However, it can also become a tool with great potential from the point of view of research.

The main objective of this work is to improve the knowledge of the phenological development of the main weed species in the Guadalquivir Valley area, based on data collected in the ETSIA weed garden.

On a weekly basis, annotations of the phenological state of each of the plants that were allowed to grow in each pot (maximum 3 plants per pot) have been made. If it is taken into account that the aforementioned weed garden has 150 species of 50 botanical families, the result is a large database that, managing it with an agronomic approach and complemented with meteorological data, can provide useful information for handling Rational of weeds. For example, you can estimate the most appropriate time to perform a herbicidal treatment, in which the weed is more sensitive, it is possible to identify species that are in a wider rosette period, which could be related to competition with The crop You could also identify those species that, according to their moment of flowering, have a positive effect on the auxiliary fauna, and should not be considered weeds in these cases.

Keywords: competition, treatment, malherbology, weeds.

Presencia de flora arvense en márgenes de campos recién instalados en una zona semiárida de Zaragoza

CIRUJEDA A[1], MARÍ AI[2], MURILLO S[3], PARDO G[1], AIBAR J[4]

[1]Unidad de Sanidad Vegetal. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza). Avda. Montañana 930; 50059 Zaragoza, España.
acirujeda@aragon.es, aimari@cita-aragon.es
[2] Departamento de Sanidad Vegetal, Laboratorio de Malherbología, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza, España.
[3]Desarrollo Rural y Sostenibilidad, del Gobierno de Aragón, Plaza San Pedro Nolasco 7, 50071 Zaragoza, España.
smurillo@aragon.es
[4]Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural. Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), España.
jaibar@unizar.es

Resumen: A pesar de la conciencia generalizada de que la flora en los márgenes puede ofrecer múltiples beneficios, existen pocos estudios en la zona mediterránea, en los que se caracterice la vegetación en los primeros años de su establecimiento. Para ello, se ha estudiado la flora en franjas de 8 metros de anchura colindantes a campos de cereal de invierno en una finca de secano en Zaragoza. Los márgenes más antiguos habían sido creados hacía 3 años y los demás fueron establecidos paulatinamente disponiendo de márgenes recién establecidos hasta de 10 años de antigüedad. Los muestreos se llevaron a cabo en 2006-08 y 2011-13 sobre dos márgenes de cada edad en cuatro cuadros de 2 x 2 metros por margen. Se observó cómo la cobertura del suelo por especies de malas hierbas anuales, que podrían ser un problema para las parcelas colindantes, tendió a decrecer en márgenes de mayor edad si bien se observaron repuntes probablemente relacionados con las condiciones meteorológicas del año. Las especies arvenses dominantes con cobertura mayor al 10% encontradas en algún muestreo fueron *Anacyclus clavatus* (la más persistente en el tiempo), *Bromus* spp., varias especies de la familia Brassicaceae, *Glaucium corniculatum, Lolium rigidum, Papaver hybridum, Papaver rhoeas* y *Sonchus oleraceus.*

Palabras clave: *Diplotaxis erucoides, Eruca vesicaria, Hirschfeldia incana, Rapistrum rugosum*, especies perennes, cereal de invierno

1. Introducción

En el año 2007 se implantó en Aragón una medida agroambiental que favorecía la creación y mantenimiento de márgenes de cultivo que estaba englobada en el Marco Nacional de Desarrollo Rural 2007-2013 desarrollado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. La medida agroambiental era la medida 1.6. "Conservación y creación de márgenes en la explotación en zonas de Red Natura 2000" y persigue el objetivo de conservar y mejorar la biodiversidad asociada a los sistemas agrarios en las zonas de Red Natura 2000 y con un rendimiento inferior a 1,8 t/ha según el plan de regionalización productiva de la PAC R.D. 1612/2008 (BOA, 2009). No obstante, ha habido iniciativas similares en otras Comunidades Autónomas españolas y en otros países europeos. La preocupación sobre el declive de las poblaciones de abejas a nivel mundial impulsa a buscar la manera de promover la presencia de flora que atraiga a insectos y que no sea perjudicial para los campos de cultivo Barbir et al., 2015, Dorado et al., 2019).

Recientemente se ha demostrado que márgenes anchos (>3 metros) y situados en pendiente son aquellos que con mayor probabilidad albergarán flora diferente a la encontrada dentro de los campos de cultivo (Cirujeda et al., 2019). Pero apenas existe información sobre el tiempo necesario para que no abunden especies arvenses en márgenes de nueva instalación. El objetivo del presente trabajo es generar información sobre las especies de flora arvense presente en márgenes de reciente instalación hasta 10 años de edad contiguos a campos de cultivo.

2. Material y Métodos

El estudio se realizó en la finca de El Vedado perteneciente al CITA en Zuera (Zaragoza). Desde el año 2003 y hasta 2007 se han dejado franjas de campo de 8 metros de anchura sin cultivar adyacentes a caminos, en dos zonas diferentes cada año. La finalidad de establecer estas franjas fue promover el establecimiento de flora espontánea que pudiese amortiguar las escorrentías que se observan periódicamente cuando se producen lluvias torrenciales.

Para caracterizar la flora, en primavera de los años 2006-08 y 2011-13 se muestrearon 24 cuadros de 2 x 2 metros en estos márgenes, cuatro en cada una de las dos franjas abandonadas en 2003-2007. Estos cuadros fueron permanentes y se situaron en el límite interior para evitar el efecto del camino, es decir, a una distancia de 6-8 metros desde el camino siendo la separación entre unos y otros de como mínimo 20 metros. Para ello, se identificaron las diferentes especies vegetales encontradas y se les asignó el porcentaje de cobertura de cada una de ellas, así como el porcentaje total de cobertura. Se utilizaron las floras de Carretero (2004) y de Puente (2004) para identificar y clasificar las especies en anuales o no anuales y en arvenses o no arvenses.

3. Resultados y Discusión

La tendencia fue encontrar menos especies arvenses con abundancias de ≥10% en márgenes con creciente edad y también menos cuadros de muestreo en los que aparecían estas especies con estos valores de abundancia en márgenes de mayor edad (Tabla 1). No obstante, hay excepciones y se observó un repunte en el año 2013, probablemente debido a las condiciones meteorológicas, ya que se registraron más precipitaciones que otros años (datos no mostrados).

Tabla 1. Número de especies arvenses anuales con coberturas ≥10% y número de cuadros de muestreo conteniendo alguna de las especies con esa cobertura (entre paréntesis).

Año de muestreo/	**2006**	**2007**	**2008**	**2011**	**2012**	**2013**
Años de establecimiento	**3**	**4**	**5**	**8**	**9**	**10**
M-2003-1	3 (6)	2 (2)	0	0	1 (1)	-
M-2003-2	2 (2)	1 (1)	0	0	1 (2)	2 (2)
Años de establecimiento	**2**	**3**	**4**	**7**	**8**	**9**
M-2004-1	3 (3)	2 (2)	0	0	0	0
M-2004-2	2 (4)	4 (8)	2 (4)	0	0	2 (3)
Años de establecimiento	**1**	**2**	**3**	**6**	**7**	**8**
M-2005-1	4 (9)	3 (7)	5 (5)	2 (4)	0	2 (5)
M-2005-2	4 (7)	4 (8)	s.d.	1 (1)	1 (1)	5 (6)
Años de establecimiento	**0**	**1**	**2**	**5**	**6**	**7**
M-2006-1	2 (2)	4 (7)	2 (2)	0	1 (1)	1 (1)
M-2006-2	2 (3)	3 (7)	2 (3)	1 (1)	1 (3)	3 (3)
Años de establecimiento	s.d.	**0**	**1**	**4**	**5**	**6**
M-2007-1	s.d.	3 (8)	3 (6)	1 (1)	0	3 (6)
M-2007-2	s.d.	2 (4)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	2 (3)

s.d.: sin datos: hubo pastoreo incontrolado.

Si se realizan las medias para cada uno de los años de edad de los márgenes, el número de especies con cobertura ≥10% y número de cuadros de muestreo de muestreo afectados fueron decreciendo con incremento de la edad de los márgenes, hasta los 5-7 años, estabilizándose desde entonces (Tabla 2). Que se reduzca el número y cobertura de especies de malas hierbas anuales conforme aumenta la antigüedad del margen coincide con lo esperado y con lo que se ha encontrado en otros climas (Boatman et al., 2011).

Tabla 2. Promedio del número de especies arvenses anuales con coberturas ≥10% y número de cuadros de muestreo que contienen alguna de las especies en ese rango de cobertura para cada edad de margen.

Años de establecimiento	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Nº de especies	2,3	3,2	2,7	3,2	1,2	0,3	1,7	0,8	1,2	1,0	1,0
Nº de cuadros de muestreo	4,3	6,2	4,5	4,6	1,5	0,3	3,0	0,8	1,8	1,5	1,0

Se encontraron 17 especies con cobertura ≥10% en alguno de los puntos de muestreo: *Anacyclus clavatus, Bromus diandrus, Bromus madritensis, Bromus spp., Diplotaxis erucoides, Eruca vesicaria, Glaucium corniculatum, Hirschfeldia incana, Lolium rigidum, Papaver hybridum, Papaver rhoeas, Rapistrum rugosum* y *Sonchus oleraceus* (datos no mostrados).

Por orden decreciente, las especies que en general fueron encontradas más veces con valores de cobertura >10% fueron (nº apariciones entre paréntesis): *A. clavatus* (25), *L. rigidum* (24), *D. erucoides* (15), *E. vesicaria* (8), *B. madritensis* y *P. rhoeas* (5), *B. diandrus* (4), *R. rugosum* y *Bromus* spp. (3) y *H. incana, G. corniculatum, P. hybridum* y *S. olearaceus* (1).

En cuanto al efecto de los años de abandono, las especies que aparecieron en alguno de los puntos de muestreo de 5 o más años de establecimiento fueron (nº apariciones entre paréntesis): *A. clavatus* (18), *L. rigidum* (8), *B. madritensis* (8), *P. rhoeas* (3), *B. diandrus* (3), *R. rugosum* (3), *P. hybridum* (2) y *H. incana* (1). Es llamativo que en el año 2013, tras 6-10 años de abandono volviesen a repuntar varias especies, especialmente *A. clavatus* y *L. rigidum* (Tabla 3), cuyas semillas tienen una longevidad de 16 a 18 meses (Narval *et al.* 2008). Curiosamente las especies del género *Bromus* tuvieron menor cobertura, aunque sean especies conocidas por prosperar especialmente en sistemas de no laboreo. Posiblemente esto sea debido a que las semillas de *Bromus diandrus* tienen una longevidad muy corta en el suelo (Taberner et al., 1992).

Probablemente 10 años sea un período limitado para poder garantizar que no aparezcan especies arvenses en los márgenes con una cobertura >10%. en unas condiciones semiáridas en un paisaje abierto con muy poca vegetación natural como encontraron también Buisson et al. (2006) en un paisaje mediterráneo y Critchley et al. (2000) en Inglaterra. Por ello, cabe esperar que es necesario mantener márgenes de nuevo establecimiento durante bastante más tiempo al de la duración de este estudio. No obstante, la influencia de las condiciones edafoclimáticas y de paisaje provocan que estos resultados puedan variar mucho de una zona de estudio a otra.

4. Agradecimientos

Los muestreos en los años 2011-13 fueron financiados por el proyecto AGL2010-22084-C02-02 por el Ministerio de Ciencia e Innovación. Nuestro agradecimiento a E. Langa por la iniciativa de establecer los márgenes y a C. Zaragoza por animarnos a estudiarlos. Gracias también a M. León, S. Núñez, M. Estruga y P. Moreno por su asistencia en campo.

Referencias

BOA (Boletín Oficial de Aragón) (2009) http://www.boa.aragon.es/; Boletín nº 17 del 27/01/2009 (última consulta 14 de mayo de 2019).

BARBIR J, BADENES-PEREZ FR, FERNANDEZ-QUINTANILLA C, DORADO J (2016) The attractiveness of flowering herbaceous plants to bees (Hymenoptera: Apoidea) and hoverflies (Diptera: Syrphidae) in agro-ecosystems of Central Spain. *Agricultural and Forest Entomology* **17**, 20-28.

BOATMAN ND, JONES NE, CONYERS ST, PIETRAVALLE S (2011) Development of plant communities on set-aside in England. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **143**, 8-19.

BUISSON E, DUTOIT T, TORRE F, ROMERMANN C, POSCHLOD P (2006) The implications of seed rain and seed bank patterns for plant succession at the edges of abandoned fields in Mediterranean landscapes. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **115**, 6-14.

CARRETERO JL (2004) Flora arvense española. Las malas hierbas de los cultivos españoles. Ed. Phytoma, Valencia, España.

CIRUJEDA A, PARDO G, MARÍ AI, AIBAR J, PALLAVICINI Y, GONZÁLEZ-ANDÚJAR JL, RECASENS J & SOLÉ-SENAN XO (2019) The structural classification of field boundaries in Mediterranean arable cropping systems allows the prediction of weed abundances in the boundary and in the adjacent crop. *Weed Research* (publicado on-line mayo 2019). https://doi.org/10.1111/wre.12366.

CRITCHLEY CNR, FOWBERT JA (2000) Development of vegetation on set-aside land for up to nine years from a national perspective. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **79**, 159-174.

DORADO J, VAZQUEZ DP (2016) Flower diversity and bee reproduction in an arid ecosystem. PEERJ **4**, e2250.

NARWAL S, SINDEL SM, JESSOP RS (2008) Dormancy and longevity of annual ryegrass (*Lolium rigidum*) as affected by soil type, depth, rainfall, and duration of burial. *Plant Soil* **310**, 225–234.

PUENTE CABEZA J (2004) Guía de la flora de la depresión del Ebro. Serie difusión. Consejo Protección de la Naturaleza de Aragón, Gobierno de Aragón, Zaragoza, España.

TABERNER A, RIBA F, RECASENS J (1992) Effet de la profondeus d'enfouissement et du regime pluviometrique sur la longevité de semences de *Lolium rigidum* Gaud. et *Bromus diandrus* Roth. En: IXème Colloque International sur la Biologie des Mauvaises Herbes (16-18 septiembre 1992, Dijon, Francia). 15-23.

Presence of weed flora in recently established field margins in a semiarid area of Zaragoza

Summary: Despite the generalized awareness that flora in the field margins can provide multiple services, few studies have been carried out in the Mediterranean areas where vegetation has been characterized in the first years after boundary establishment. Therefore, in this study flora has been studied in boundaries next to winter cereal fields in a rainfed farm belonging to the Gobierno de Aragón (Zuera, Zaragoza). The oldest margins had been established 3 years before and the rest were created gradually until reaching age of 10 years. Sampling was conducted in years 2006-08 and 2011-13 on two margins of each age in four squares of 2 x 2 meters on each margin. Soil cover by annual weeds which could be a problem for the adjacent plots tended to decrease in older margins despite upsurges were detected related to the meteorological conditions of the year. Those annual weeds with a cover of ≥10% found in any of the sampling squares and margins were *Anacyclus clavatus* (the most persistent species in time), *Bromus* spp., several species of the Brassicaceae family, *Glaucium corniculatum, Lolium rigidum, Papaver hybridum, Papaver rhoeas* and *Sonchus oleraceus.*

Keywords: *Diplotaxis erucoides, Eruca vesicaria, Hirschfeldia incana, Rapistrum rugosum*, perennial species, winter cereal

Modelo bioeconómico para el control óptimo de la invasora *Zea mays* ssp. *mexicana ad. int.* en España

MARTÍNEZ Y[1*], CIRUJEDA A[2], GÓMEZ MI[3], MARÍ AI[4], PARDO G[2]

[1]Departamento de Análisis Económico, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (Univ. de Zaragoza-CITA), Gran Vía 2-4, 50004 Zaragoza, ESPAÑA.
*yolandam@unizar.es
[2]Departamento de Sanidad Vegetal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón-IA2 (CITA-Univ. de Zaragoza), Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza, ESPAÑA.
acirujeda@aragon.es, gpardos@aragon.es
[3]Charles H. Dyson School of Applied Economics & Management, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA.
mig7@cornell.edu
[3]Departamento de Sanidad Vegetal, Grupo de Gestión Integrada, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza, ESPAÑA.
aimari@aragon.es

Resumen: El objetivo de este trabajo fue identificar la secuencia de estrategias de control que minimizan los costes privados y sociales en el control de la especie invasora teosinte, recientemente aparecida en campos de maíz del noreste de España. Para ello se ha construido un modelo bio-económico dinámico que combina parámetros biológicos obtenidos en tres años de experimentos, realizados para conocer la biología de la planta en las condiciones de Aragón, y datos de costes e ingresos recopilados en las zonas afectadas considerando dos niveles de infestación inicial: baja (10 plantas/ha) y alta (1000 plantas/ha). Los resultados muestran que las pérdidas económicas pueden alcanzar 9229 y 9398 €/ha para los escenarios de baja y alta infestación si no se toman medidas de control de las infestaciones en un horizonte de planificación de 15 años. Además, se muestra que las estrategias óptimas desde el punto de vista privado y social son diferentes. El modelo indica que la falsa siembra y el control manual no son estrategias óptimas si se consideran los costes sociales de control de la invasora.

Palabras clave: Programación dinámica, manejo de malas hierbas, estrategias de control, impacto económico, costes públicos.

1. Introducción

Teosinte (*Zea mays* L.) es una especie invasora, ancestro del maíz, que ha aparecido recientemente como mala hierba en los campos de maíz del noreste de España. Su presencia supone una seria competencia para el maíz por varias razones: es capaz de producir una gran cantidad de semillas que permanecen viables en el suelo durante varios

años, puede hibridarse con el maíz y tiene un ciclo de crecimiento similar, por lo que el control con herbicidas en este cultivo no es posible. Estas características, junto con el hecho de que el monocultivo de maíz es muy común en las zonas afectadas, propician que la invasora tenga una elevada capacidad de propagación. Las potenciales pérdidas de producción y costes económicos causados por esta invasora han generado gran preocupación a los agricultores y a los responsables de sanidad vegetal en las zonas afectadas.

El objetivo de este trabajo es construir un modelo bio-económico dinámico para identificar las estrategias de maximización de beneficios para los agricultores y diseñar políticas para gestionar el teosinte en las zonas afectadas. En este contexto el modelo dinámico se utiliza para comparar estrategias óptimas en dos escenarios: 1) cuando un agricultor individual maximiza sus beneficios privados y 2) cuando un regulador maximiza los beneficios sociales (es decir, los beneficios para los agricultores menos los costes públicos resultantes de los controles necesarios para manejar las infestaciones de teosinte). Esta comparación contribuye a una mejor comprensión de las estrategias más adecuadas para la erradicación de la especie invasora y aporta una evaluación económica de sus consecuencias.

2. Material y Métodos

Los primeros informes de la presencia de teosinte se recibieron en agosto de 2014 en el Centro de Sanidad y Certificación Vegetal de Aragón (CSCV). Varios ensayos experimentales se han llevado a cabo desde 2014 a 2017 para investigar la biología del teosinte bajo las condiciones de Aragón, cuyos resultados se han empleado en la determinación de la dinámica de crecimiento de la población de la invasora que se incorporan en el modelo bio-económico (Cirujeda et al. 2017, Prado et al. 2017).

Se consideran dos perspectivas diferentes a través de sendos modelos: 1) el agricultor individual selecciona las estrategias de control maximizando sus beneficios privados en una parcela media de 8 ha y suponiendo que se permite el monocultivo de maíz; y 2) Un planificador social (CSCV) selecciona las estrategias que minimizan los costes sociales agregados en las parcelas infestadas (400 ha), es decir, los costes privados de las áreas con infestación (pérdida de beneficios privados por la presencia de teosinte), más los costes públicos en que incurre el planificador social (inspección, investigación, divulgación). Además, en este segundo modelo, se prohíbe el monocultivo de maíz. Seguidamente, se comparan y contrastan las estrategias de control óptimas del agricultor y del planificador social en un horizonte temporal de 15 años para evaluar la idoneidad de las medidas reglamentarias introducidas por la CSCV para controlar teosinte.

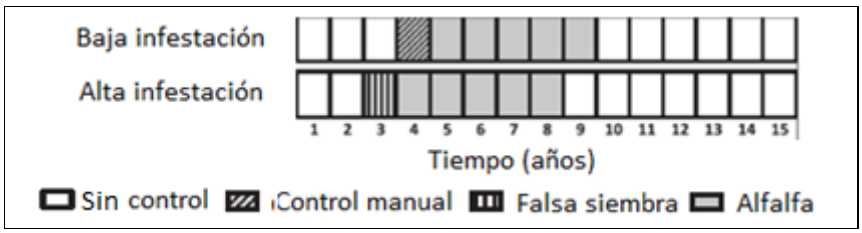
De acuerdo con la información recopilada en las áreas afectadas, los modelos incluyen dos grados de incidencia de infestación: baja (10 plantas/ha) y alta infestación (1000 plantas/ha). Las estrategias de control consideradas son: 1.Sin control; 2.Falsa siembra; 3.Control manual; 4.Rotación cebada-girasol; 5. Rotación guisante-girasol; 6.Rotación

alfalfa-trigo; 7.Alfalfa. Los modelos se resolvieron utilizando el algoritmo CONOPT2 del programa GAMS (General Algebraic Modeling System, Brooke et al., 1998).

3. Resultados y Discusión

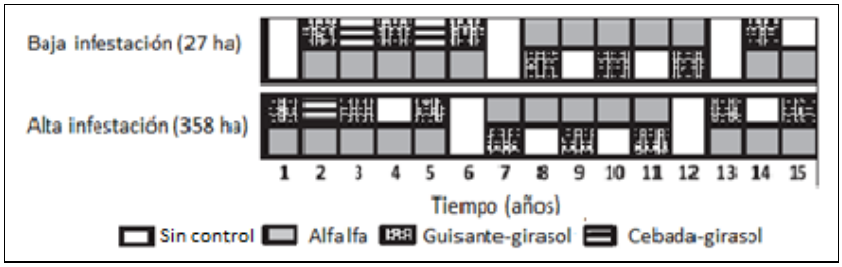
La figura 1 muestra la senda de estrategias óptimas privadas para un agricultor con baja y alta infestación en el horizonte de planificación considerado. Los resultados muestran que los agricultores con bajas infestaciones no hacen ningún control en los 3 primeros años y después realizan un control manual el año 4. Posteriormente el maíz es sustituido por el cultivo de alfalfa durante los 5 siguientes años para volver al monocultivo de maíz en el año 10. Por el contrario, los agricultores con altas infestaciones seleccionan no controlar los 2 primeros años, la falsa siembra en el año 3 y la alfalfa los siguientes 5 años, retomando el monocultivo de maíz en el año 9.

Figura 1: Estrategias de control óptimas en el modelo individual



La figura 2 muestra la senda de estrategias óptimas para el regulador social. En este caso el modelo sugiere que las rotaciones deberían adoptarse en el segundo año con bajas infestaciones y en el primer año con altas infestaciones. Posteriormente en la mitad del área total con baja infestación se cultivaría alfalfa, mientras que en la otra mitad se haría una rotación cebada-girasol un año y guisante-girasol el año siguiente hasta llegar al año 7 en que podría retomarse el cultivo de maíz. A partir del año 8, lo óptimo es rotar cebada-girasol y maíz en la mitad del área y mantener alfalfa en la otra mitad. Por tanto, una primera conclusión de los resultados es que el control manual y la falsa siembra no son estrategias adecuadas para la erradicación de la invasora desde el punto de vista social, puesto que implican costes públicos que el agricultor no toma en cuenta y deberían considerarse en la toma de decisiones.

Figura 2: Estrategias de control óptimas en el modelo social



Finalmente, en la tabla 1 se han calculado los beneficios totales y por hectárea en el área afectada en tres posibles situaciones: i) sin hacer ningún control; ii) siguiendo las estrategias óptimas privadas; iii) siguiendo las estrategias óptimas sociales.

Los resultados del modelo muestran que, si no se realiza ningún control, entonces la producción de maíz se perdería completamente en el cuarto periodo (si se parte de una parcela con baja infestación) o en el tercero (si se parte de alta infestación) debido a la competencia de teosinte. En ese caso los beneficios privados serían de 105,3 y 943,2 miles de € en las áreas de baja y alta infestación, respectivamente, y un coste público de 78,4 y 745,8 miles de €. Por tanto, las pérdidas para todo el horizonte temporal considerado alcanzarían 7709 miles de € si no se hace nada para controlar teosinte. La adopción de las estrategias del modelo privado conlleva una pérdida de 2256 miles de € en toda el área afectada respecto a la situación sin infestación, mientras que con las estrategias del modelo social la pérdida sería de 4095 miles de €. La pérdida de beneficios, por tanto, respecto a la situación sin infestación es alrededor de un 24% si se tiene baja infestación o de un 27% si te tiene alta infestación si se adoptan las estrategias privadas óptimas, mientras que la pérdida aumenta a 49% o 52% si se adoptan las socialmente óptimas, que implican la adopción obligatoria de rotaciones. Esto explica, en primer lugar, por qué los agricultores no rotan cultivos si no se les obliga.

No obstante, si se tienen en cuenta los costes públicos asociados a las estrategias de control de teosinte seleccionadas en cada caso, los cálculos muestran que las estrategias socialmente óptimas reducen estos costes considerablemente, pasando de 170.096 € con las estrategias privadas a menos de 5.200 €. Por tanto, si se consideran todos los costes derivados del control de teosinte (privados y públicos), entonces las estrategias óptimas privadas reducen el beneficio en un 28,8% respecto a la situación sin infestación, mientras que las estrategias sociales lo reducen en un 27,7%.

Tabla 1. Impactos económicos estimados.

	Beneficio total actualizado (en 10^3 €) *(Beneficio anual medio en €/ha)*		
	Sin control	Óptimo privado	Óptimo social (sin monocultivo)
Beneficios sin infestación	7933 *(1374)*	7933 *(1374)*	5314 (920)
Beneficio infestación baja (27 ha)	105,3 *(260)*	424,3 (1048)	281,3 (695)
Costes públicos (infestación baja)	78,4 (193,6)	20,9 (51,6)	5,1 (12,9)
Beneficio infestación alta (358 ha)	943,2 (175,6)	5423 (1010)	3562 (663)
Costes públicos (infestación alta)	745,8 (138,8)	149,2 (27,8)	0 (0)
Pérdidas respecto a no infestación	7709 (1271)	2256 (391)	4095 (709)

La comparación de las estrategias óptimas privadas vs. sociales permite explicar el comportamiento de los agricultores observado en las parcelas infestadas con bajos niveles de infestación de las parcelas, pues tienden a no tomar medidas de control debido a la alta rentabilidad del maíz y al desconocimiento de la alta capacidad de teosinte para competir con el maíz. Las rotaciones solo se adoptan cuando teosinte alcanza niveles altos de infestación. No obstante, este comportamiento no tiene en cuenta los costes que se generan al conjunto de la sociedad (en forma de costes públicos) y por tanto no son óptimos socialmente.

La información obtenida a través de los ensayos experimentales, combinada con los datos económicos recopilados en las zonas demuestran que la erradicación de teosinte solo es posible si se rotan cultivos diferentes al maíz y que ello puede lograrse en un periodo de tiempo relativamente corto (6 o 7 años) con una pérdida de beneficios totales de un 28% respecto a la situación sin infestación.

4. Conclusiones

El modelo bio-económico dinámico aporta información relevante para la erradicación de teosinte en las zonas afectadas, subrayando la importancia de que las infestaciones incipientes se controlen cuanto antes y mostrando que la adopción de rotaciones de cultivos es la única manera de erradicar la invasora, además de minimizar los costes de infestación.

5. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) [proyectos ERTA-2014-00011-C02 y RTA2017-00082-00-00] y por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad [proyecto ECO2016-75927-R], y a través de una Beca de la Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Co-Operative Research Programme: Biological Resource Management for Sustainable Agricultural Systems 2016.

Referencias

BROOKE A, KENDRICK D, MEERAUS A, RAMAN R (1998). GAMS Tutorial by R. Rosenthal. GAMS Development Corporation, Washington.

CIRUJEDA A, PARDO G, MARÍ AI, FUERTES S, AIBAR J (2017). Emergencia de teosinte en cultivos diferentes a maíz. In: XVI Congreso de la Sociedad Española de Malherbología, Pamplona.

PRADO C, CIRUJEDA A, PARDO G, MARÍ AI, FUERTES S, AIBAR J (2017). Profundidades máximas para la emergencia de teosinte. In: XVI Congreso de la Sociedad Española de Malherbología, Pamplona.

Bioeconomic model for optimal control of the invasive weed Zea mays ssp. mexicana ad int in Spain

Summary: Teosinte is an invasive weed which emerged recently in Northeastern Spain, an important corn-growing region in Western Europe. It is causing substantial agronomic and economic damages and is threatening the availability of corn in the region. Farmers and regulatory agencies can choose from a number of strategies to control for teosinte infestations including adoption of specific cultural practices such as manual control constructing false seedbeds, as well as adopting corn rotations with other annual and perennial crops. In spite of the potential negative impacts of this weed, little is known about what the optimal control strategies are, both from the private (e.g. the farm) and social (e.g. regulatory agencies) perspectives. In response, we develop a dynamic optimization model to identify the sequence of control strategies that minimize private and social costs under low- and high-infestation level scenarios, for a fifteen-year planning horizon. We calibrate the model using biological data from experimental trials and economic parameters collected from farmers in the region. Our results suggest the economic losses of teosinte infestation can reach up to 9229 and 9398 €/ha for low- and high-infestation scenarios if nothing is done to control it. In addition, results show that optimal private and social strategies are different. Results show false seedbed and manual controls, currently recommended by the regulatory agency in low-infestation cases, are not socially optimal.

Keywords: Dynamic programming, weed management, control strategies, economic impact, public costs.

¿El efecto del fuego puede romper la latencia de las semillas de avena loca (*Avena sterilis ludoviciana* (Durieu) Nyman)?

GARNICA I, LEZÁUN JA, SEGURA A, GOÑI J

Instituto Navarro de Tecnologías e infraestructuras Agroalimentarias INTIA, Avda. Serapio Huici 20-22, 31610-Villava (Navarra).
igarnica@intiasa.es, jlezaun@intiasa.es, asegura@intiasa.es, jgoni@intiasa.es

Resumen: Se programó un ensayo en laboratorio sobre el efecto que produce el calor de una llama sobre la germinación de semillas de ballueca (símil de la quema del rastrojo en campo). Para la experiencia se recolectaron semillas de avena loca en el mes de junio y en agosto se prepararon lotes de 100 semillas para exponerlas a la acción del calor. Se propusieron tres niveles de acuerdo al tiempo que duró la acción de la llama sobre las semillas: 0 segundos (testigo o tratamiento de referencia), 30 segundos y 60 segundos, realizándose 4 repeticiones de cada caso. Las semillas se sembraron en un recipiente con arena de sílice y se regaron antes de introducirse en la cámara de germinación regulada a un fotoperiodo 16 horas de luz y 8 de oscuridad con una temperatura constante de 20 ºC. Cuando se alcanzó el estado de desarrollo BBCH 11-12 (hoja y media), se arrancaron y se contaron las plantas nacidas.

Las semillas de ballueca flameadas durante 30 segundos aumentaron la germinación hasta el 55%, una diferencia significativa respecto a la tesis de referencia (4,75%). Las semillas que recibieron calor durante 60 segundos tuvieron una germinación de 43,25%, también significativamente mayor que la tesis de referencia, pero significativamente menor que las que solo estuvieron 30 segundos. En el tratamiento de referencia no nacieron en ningún caso las dos semillas de una misma espiguilla a la vez, sin embargo sí que se producen casos de germinación de las dos semillas cuando se sometieron al calor de la llama. Al comparar el tiempo de exposición, 30 segundos o 60 segundos, también se encuentran diferencias significativas entre ellas, siendo mayor el número de dobles plantas al aplicar calor durante un tiempo más largo.

Palabras clave: Malas hierbas, ensayos germinación, ballueca, control no químico

1. Introducción

Desde la llegada de las cosechadoras en la segunda mitad del S XX, ya no era necesario llevar la mies segada a la era para la trilla por lo que se retrasaba la fecha de recolección hasta que el grano estaba bien maduro y podía desgranarse con facilidad. En ese momento muchas de las semillas de malas hierbas ya habían caído al suelo.

La paja que se quedaba en las parcelas era un residuo que entorpecía y dificultaba las labores de preparación del terreno para el cultivo siguiente quedando la siembra comprometida si no se conseguía tapar adecuadamente la semilla.

La quema de rastrojeras de cereal fue una técnica cultural habitual en las últimas décadas que además de facilitar el laboreo del suelo tenía una influencia nada despreciable sobre algunas plagas, enfermedades y malas hierbas. Con la aplicación de la PAC y las medidas de condicionalidad (Reglamento (CE) 1782/2003) para el mantenimiento de la materia orgánica del suelo, esta práctica quedó prohibida a partir de 2005 excepto por razones fitosanitarias, siendo la Autoridad competente de cada Comunidad Autónoma la que debe decidir en cada caso.

Sin embargo, en una agricultura extensiva, con una predominancia del cultivo de cereales, la sanidad de los cultivos se basa casi exclusivamente en los productos fitosanitarios, y cada vez es más difícil mantener su eficacia con un coste razonable, cuestionándose su sostenibilidad.

Se plantea la necesidad de implantar la Gestión Integrada de Plagas, donde cabe la quema de rastrojo como una medida más. No obstante, además del riesgo de provocar incendios, la quema afecta a toda la vida presente en ese suelo, por lo que es necesario identificar y cuantificar los aspectos favorables.

En este trabajo se analiza si el fuego puede ayudar a combatir la ballueca o avena loca (*Avena sterilis subesp. ludoviciana* (Durieu) Nyman), una mala hierba muy presente en los secanos fresco de Navarra en donde causa pérdidas importantes de cosecha y para ello se ha planteó un ensayo de germinación de semillas de ballueca en laboratorio simulando el efecto producido por el fuego.

2. Material y Métodos

El objetivo de este trabajo es comprobar si el efecto de la quema de rastrojo es una medida eficaz para el control de ballueca o avena loca (*Avena sterilis subesp. ludoviciana* (Durieu) Nyman). Se diseñó un ensayo unifactorial completamente aleatorizado con 4 repeticiones. Las semillas de ballueca se recolectaron en junio y se secaron a temperatura ambiente a la sombra en un lugar ventilado. En agosto, se prepararon lotes de 100 semillas para exponerlas a la acción del calor producido por la llama de un soplete de gas butano en similitud a lo que puede ocurrir en la quema del rastrojo. Se propusieron tres niveles de acuerdo al tiempo que duró la acción de la llama sobre las semillas: 0 segundos (referencia), 30 segundos y 60 segundos. Las semillas se sembraron en un recipiente con en arena de sílice y se introdujeron en la cámara de germinación regulada con un fotoperiodo 16 horas de luz y 8 de oscuridad y una temperatura constante de 20 ºC. Cuando las plantas alcanzaron el estado de desarrollo BBCH 11-12, se dio por finalizado el experimento, se sacaron las bandejas de la cámara y se contaron las plantas nacidas. Se realizó un análisis de varianza de los datos obtenidos y una separación de medias por el método de Duncan.

3. Resultados y Discusión

No se han encontrado referencias en la literatura de ensayos similares, todas las referencias localizadas introducen las semillas en una estufa a una temperatura controlada durante un tiempo determinado. En nuestro ensayo no fue posible estimar la temperatura que soportaron las semillas expuestas a la llama, y el tiempo de duración se eligió en relación al que pudiera durar la quema de rastrojo.

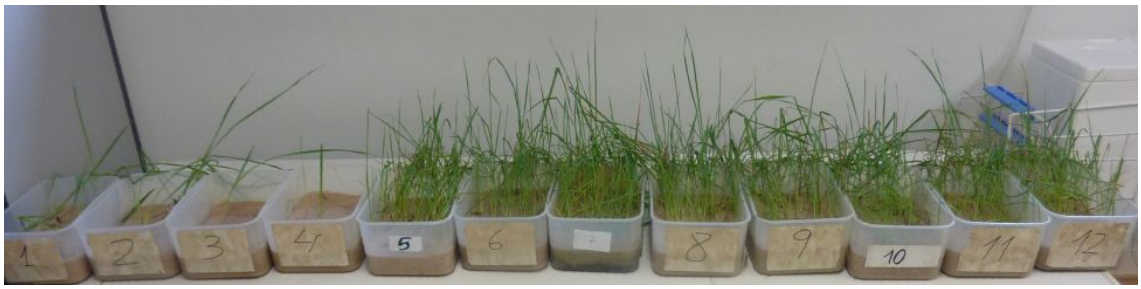


Foto 1. Vista del resultado del ensayo. Los recipientes numerados del 1 al 4 se corresponden con el tratamiento de referencia, los recipientes 5 al 8 con la exposición a la llama durante 30 segundos y las semillas de los recipientes 9 al 12 lo estuvieron durante 60 segundos.

Los resultados del test de germinación en el ensayo se recogen en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados de germinación de semillas de ballueca (en porcentaje) según el tiempo de exposición al calor producido por la llama de un soplete de gas. Valores entre tratamientos con la misma letra indica que no hay diferencias significativas. MDS: 5,658, C.V.: 9,52

Tratamiento	Promedio (%)	
Calor durante 30”	55,00	a
Calor durante 60”	43,25	b
Sin calor (referencia)	4,75	c

Las semillas de ballueca de la tesis de referencia (sin tratamiento de calor) tuvieron un germinación muy baja, de solo el 4,75% de media, debido a la dormancia de las semillas de esta especie. Según Fernández-Quintanilla y col (1997), la mayoría de las semillas recién producidas de *Avena sterilis* presentan una dormición innata. Dicha dormición se va perdiendo gradualmente durante todo el verano y, como consecuencia, una importante proporción de estas semillas, aproximadamente el 60%, están en condiciones de germinar en el otoño siguiente. Se llama dormición (De la Cuadra, 1992) a la incapacidad de germinar de las semillas viables cuando se encuentran bajo condiciones ambientales apropiadas para ello, incapacidad que se perderá después de un período de tiempo más o menos largo (posmaduración). En el caso de ballueca es bastante intensa si se la compara con la de semillas de otras especies. Así pues los resultados obtenidos con las semillas de referencia se encuentran en línea con la bibliografía, puesto que se trata de semillas jóvenes, fisiológicamente maduras, recolectadas al final de la primavera y en las fechas de realización del experimento, presentan dormición que impide su germinación total o parcial al exponerlas a condiciones apropiadas para hacerlo.

Las semillas de ballueca flameadas durante 30 segundos aumentaron la germinación hasta el 55%, una diferencia significativa respecto a la tesis de referencia debido a que

la temperatura elevada rompe la dormancia de las semillas que inician la germinación al encontrar condiciones ambientales apropiadas (temperatura, humedad, luz y oxígeno). Este resultado está en línea con Pérez y Pita (1999) que entre, las técnicas y tratamientos empleados para vencer la dormición de semillas, cita el tratamiento con calor, bien calor seco (estufa) o agua caliente, empleando temperaturas entre 50-100 ºC y diferentes tiempos según la mayor o menor dureza de las cubiertas seminales.

Las semillas que recibieron calor durante 60 segundos tuvieron una germinación de 43,25%, también significativamente mayor que la tesis de referencia, pero significativamente menor que las que solo estuvieron 30 segundos. El calor soportado por las semillas también rompió su dormancia al comparar con el testigo. Pero la germinación ha sido menor comparado con una exposición más corta lo que podría ser debido a que la temperatura alcanzada por las semillas fue lo suficientemente alta o durante un tiempo lo suficientemente largo para causar la muerte de algunas de ellas. El resultado está en línea con Nietschke et al (1996 citado por Storrie, 2014) cuando afirma que si bien la quema de rastrojo puede destruir la semilla de avena loca en la superficie del suelo, también puede estimular la emergencia de las plántulas modificando la dormancia de las semillas sobrevivientes. Y en esta misma línea, los datos preliminares de ensayos en Darling Downs, Queensland (AU), encontraron que un rastrojo otoñal quemaba semillas de rábano silvestre (*Raphanus raphanistrum*) en un 28%, semillas de avena loca (*Avena* sp.) en un 34% y semillas de alpiste (*Phalaris paradoxa*) en un 43% en el los 10 cm superiores de tierra (comunicación personal de SR Walker, 2005 citado por Storrie, 2014).

Tabla 2. Resultados de germinación de semillas dobles procedentes de una misma espiguilla de ballueca (en porcentaje) según el tiempo de exposición al calor producido por la llama de un soplete de gas. Valores entre tratamientos con la misma letra indica que no hay diferencias significativas. MDS: 1,383, C.V.: 12,14

Tratamiento	Promedio (%)
Calor durante 60”	12,00 a
Calor durante 30”	7,75 b
Sin calor (referencia)	0,00 c

También se observó si en algún caso, habían germinado las dos semillas provenientes de la misma espiguilla. Este resultado se muestra en la tabla 2.

El conteo no fue lo suficientemente detallado en el caso de que solamente germinara una semilla de la espiguilla para diferenciar si había germinado la primera o la segunda, no obstante, se interpreta que probablemente las pocas que germinaron en la tesis de referencia debían provenir de la primera semilla. En esta misma tesis, sin exponer a altas temperaturas, en ningún caso germinaron las dos semillas de la misma espiguilla.

Al comparar las dos semillas de una espiguilla, la segunda semilla tiene una dormición mucho más intensa que la primera, mientras las primeras semillas tardan en posmadurar desde unos pocos días a varios meses, las segundas semillas tardan desde unos pocos meses a varios años (De la Cuadra, 1992). Las semillas sometidas al calor difieren significativamente de la tesis de referencia, independientemente del tiempo al que

fueron expuestas. Se entiende que el calor saca de dormancia a las primeras semillas y también a algunas de las segundas semillas.

Al comparar el tiempo de exposición, 30 segundos o 60 segundos, también se encuentran diferencias significativas entre ellas, siendo mayor el número de dobles plantas al aplicar calor durante un tiempo más largo. Se entiende que en la exposición más corta (30 s) no se alcanzó la temperatura necesaria o no fue lo suficientemente larga para romper la dormancia de la segunda semilla en la mayoría de los casos. Si se tiene en cuenta que la germinación total en el caso de 60 segundos es más baja que en el caso de 30 segundos, a pesar de que hay mayor número de "segundas semillas" que han germinado se entiende que la acción de la llama en este caso provoca la muerte de mayor número de semillas.

La dormancia de las semillas se rompe cuando estas alcanzan una temperatura determinada o cuando se mantiene por encima de un umbral una duración determinada, pero también cuando se supera una cierta temperatura o se mantiene durante más tiempo se provoca la muerte de las semillas. Aunque sin poder dar una cifra concreta, este resultado está en línea con lo descrito por Gómez e Ibáñez (1980): La quema de rastrojos inmediata a la cosecha puede ayudar a reducir el depósito de nuevas semillas de avena loca en el terreno. Esta reducción dependerá de la duración y temperatura alcanzada en la quema. Parece comprobado que esta medida puede destruir hasta el 30% de semillas de avena loca y afectar al resto en sus condiciones de letargo en el sentido de acortar éste, con lo que se estimula la germinación, posibilitándose su destrucción por medios culturales o químicos.

4. Conclusiones

La experiencia desarrollada en laboratorio demuestra como el calor producido por una llama es capaz de producir cierta mortandad entre las semillas de ballueca cuando se supera una temperatura o su efecto se prolonga durante un tiempo determinado, aunque estos valores no han sido objetivo en este trabajo.

Se ha demostrado en el ensayo de laboratorio que las semillas de ballueca supervivientes al efecto de fuego han perdido la dormancia, iniciando la germinación cuando se producen las condiciones adecuadas (de humedad y temperatura principalmente). De esta manera, la nascencia puede producirse antes de la siembra del cultivo por lo que pueden ser destruidas con las labores preparatorias antes de que compitan con el cultivo.

5. Agradecimientos

Ensayo realizado gracias a la financiación del proyecto AGL2017-83325-C4-2-R del Programa Estatal de Fomento de la Investigación Científica y Técnica de Excelencia.

Referencias

DE LA CUADRA C (1992). Germinación, latencia y dormición de las semillas. Dormición en las avenas locas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Hoja divulgadora nº 3, 24 pg.

FERNÁNDEZ-QUINTANILLA C, NAVARRETE L, TORNER C y SÁNCHEZ DEL ARCO M J (1997). *Avena sterilis* L. en cultivos de cereales. Capítulo del libro Biología de las malas hierbas de España. SEMh y Phytoma-España, pg 11-23.

GÓMEZ AJ, IBÁÑEZ L (1980). La avena loca en cultivo cerealista. Ministerio de Agricultura. Hojas Divulgadoras nº 17-18, 24 pg.

NIETSCHKE BS, MEDD RW, MATTHEWS JM, REEVES TG & POWLES SB (1996). Managing herbicide resistant wild oats. Options and adoption. Eleventh Australian Weeds Conference Proceedings, pg 546-551.

PÉREZ F y PITA JM (1999). Dormición de semillas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Hoja divulgadora nº 2103, 20 pg.

STORRIE AM (ed). (2014). Integrated weed management in Australian cropping systems. Grains Research and Development Corporation. Tactics for manaing weed populations, pg 92-97.

Can the effect of fire break the dormancy of Winter wild-oat seeds (Avena sterilis ludoviciana (Durieu) Nyman)?

Summary: In this study a trial in the laboratory was carried out to analyse the effect of a flame on the germination of winter wild oat seeds (similar to stubble burning that is done in the field). Winter wild oat seeds were collected in June and in August 100 sedes sets were prepared to be exposed to heat. Three treatments with four replications were established according to the exposure time: 0 seconds (control), 30 seconds and 60 seconds.

Seeds were sown in a pot with silica sand and they were irrigated before introducing them in a germination chamber at 20 degrees and with 16/8h light/dark photoperiod. When growth stage was BBCH 11-12 (1,5 leaves unfolded), plants were uprooted and counted.

Winter wild oat seeds that were flamed during 30 seconds increased germination up to 55%, showing significant differences in relation to the control (4,75%). Seeds that were flamed during 60 seconds, increased up to 43,25%, significantly higher than the reference treatment, but significantly lower than those that were flamed during 30 seconds.

In some cases, when there was a heat treatment two seeds per spikelet emerged at the same time, while in the control this fact was never observed. When comparing time exposures, 30 and 60 seconds, results showed significant differences. When the time exposure was longer, the number of double plants per spikelet was higher.

Keywords: Weeds, germination trial, Winter wild-oat, non-chemical control trials.

¿Deben los modelos de emergencia de *Lolium rigidum* adaptarse en función de las condiciones climáticas?

SOUSA-ORTEGA C[1], CHAMBER E[2], URBANO JM[3], IZQUIERDO J[4], ESCORIAL C[5], MARÍ-LEÓN AI[6], CORDERO F[7], VARGAS M[8], SAAVEDRA M[9], LEZAUN JA[10], PARAMIO JA[11], FERNÁNDEZ JL[12], TORRA J[13], ROYO-ESNAL A[14]*.

[1, 2, 3] Dpto. Ciencias Agroforestales, Universidad de Sevilla, Sevilla.
carlos.sousa.ortega@gmail.com, urbano@us.es
[4] Dpt. Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia, Universitat Politècnica de Catalunya, Casteldefells, Barcelona.
jordi.izquierdo@upc.edu
[5] Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid.
escorial@inia.es
[6] Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA), Zaragoza.
ai.marileon@gmail.com
[7] Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Toledo.
fercorme@gmail.com
[8] Field Trial Services Agroconsulting (FTS), Sevilla.
mvargas@fts-spain.com
[9] Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), Córdoba.
mariam.saavedra@juntadeandalucia.es
[10] Instituto Navarro de Tecnologías e Infraestructuras Agroalimentarias (INTIA), Navarra.
jlezaun@intiasa.es
[11] Asociación de Investigación de Mejora del Cultivos de la Remolacha Azucarera (AIMCRA), Valladolid.
paramio15@gmail.com
[12] ADAMA Agriculture España SA, Madrid
joseluis.fernandez@adama.com
[13 14] Agrotecnio, Universitat de Lleida, Lleida.
joel@hbj.udl.cat, *aritz@hbj.udl.cat

Resumen: *Lolium rigidum* es una problemática mala hierba a nivel mundial que en España produce importantes pérdidas de cultivo y económicas. El grupo de Biología y Agroecología de Malas hierbas (BAMh) de la SEMh ha estudiado la emergencia de esta especie durante dos campañas, 2016-17 y 2017-18. Para ello, se estableció un experimento en 10 localidades con una población de *L. rigidum* recolectada en Cataluña y se realizó el seguimiento de su emergencia cada 2-7 días. La emergencia se parametrizó en función de registros de temperatura y humedad procedentes de un datalogger enterrado a 2 cm. Los resultados muestran que el uso de los grados térmicos horarios es suficiente para una correcta descripción de la emergencia, desechando la opción de aplicar los grados hidrotérmicos, más comunes en los modelos de malas hierbas de invierno. Sin embargo, la emergencia de esta población de *L. rigidum* fue diferente en el centro y noreste de España respecto al sur, sugiriendo un efecto ambiental debido a su adaptación climática. Por ello, se plantea la necesidad de incluir

poblaciones locales con el fin de adaptar el modelo desarrollado en el presente trabajo para los biotipos climáticos existentes.

Palabras clave: tiempo hidrotérmicos, tiempo térmico, función Weibull.

1. Introducción

Lolium rigidum Gaud. es una mala hierba problemática a nivel mundial. Además de su capacidad competitiva, que reduce las cosechas de los cultivos, desarrolla fácilmente resistencia a herbicidas. Por todo ello ha sido una de las malas hierbas más estudiadas por los científicos, llegando a desarrollar programas específicos para su control, como el RIM (Panell *et al.*, 2004).

Por otro lado, desde un punto de vista práctico, los modelos capaces de describir la emergencia de las malas hierbas han sido estudiados en los últimos años para numerosas especies, entre ellas *L. rigidum* (Izquierdo *et al.*, 2013). La mayor parte de estos trabajos han intentado buscar un modelo único que pudiera ser ampliamente aplicado, pero en la mayoría de los casos la precisión de dichos modelos disminuye a medida que cambian las condiciones en las que éstos fueron desarrollados (Izquierdo *et al.*, 2013). La explicación para esta tendencia puede ser tanto la variación intra-poblacional como inter-poblacional. Dentro del marco global de cambio climático, las dificultades que puede haber a la hora de desarrollar modelos de emergencia comunes pueden ser todavía mayores.

Con el objeto de estudiar el efecto de diferentes condiciones climáticas sobre la emergencia de *L. rigidum*, el Grupo de Trabajo de Biología y Agroecología de Malas hierbas de la SEMh decidió implementar un mismo protocolo de experimentación en varias localidades distribuidas por España.

2. Material y Métodos

2.1. Diseño experimental. Las semillas de *L. rigidum* se recogieron en Solsona (Lleida, Cataluña) en junio de 2016 y se distribuyeron entre todos los participantes. El experimento se ubicó en 10 localidades diferentes (Tabla 1). En cada una de las localidades se instalaron cuadros de 0,25 m x 0,25 m y se sembraron 100 semillas por cuadro, con cuatro repeticiones. La siembra se realizó removiendo el suelo con las semillas hasta una profundidad aproximada de 2 cm, de tal manera que éstas quedaran distribuidas lo más homogéneamente posible. La siembra se realizó en octubre de 2016 (Tabla 1) y los muestreos de las emergencias se realizaron cada 2-7 días de manera destructiva. El seguimiento de las emergencias continuó en la campaña 2017-18. Con el objeto de parametrizar la emergencia, se puso junto al experimento un datalogger, con un termómetro digital y un sensor analógico de humedad a 2 cm de profundidad.

Tabla 1: Coordenadas de las 10 localidades. Se aportan también las abreviaturas y las fechas de siembra.

	Lugar	Abreviatura	Latitud	Longitud	Fecha de siembra
1	Córdoba	COR	37º51’32’’N	04º48’03’’W	17/10/2016
2	Lleida	LLE	41º37’41’’N	0º35’32’’E	11/10/2016
3	Madrid	MAD	40º27’29’’N	03º45’01’’W	10/10/2016
4	Pamplona	NAV	42º49’04’’N	01º43’18’’W	11/10/2016
5	Sevilla FTS	FTS	37º07’39’’N	05º40’37’’W	21/10/2016
6	Sevilla ETSIA	ETSIA	37º21’07’’N	05º56’20’’W	11/10/2016
7	Sevilla 2H	2H	37º21’01’’N	05º53’35’’W	11/10/2016

8	Toledo	TOL	40º03’18’’N	04º25’33’’W	11/10/2016
9	Valladolid	VLL	41º38’49’’N	04º38’49’’W	18/10/2016
10	Zaragoza	ZAR	41º43’46’’N	0º48’28’’W	07/10/2016

2.2. Análisis estadístico. Para el análisis se utilizaron los datos de aquellas localidades y años en los que la emergencia fue superior al 10% para que pudieran ser suficientemente representativos (Guillemin *et al.*, 2013). Los datos de la emergencia acumulada fueron analizados en base a los grados térmicos (TT) ([1] y [3]) y grados hidrotérmicos (HTT) ([2] y [4]) de la siguiente manera:

Si $T_b<T_t<T_o$.

$$TT_t = \Sigma(T_t - T_b) \quad [1]$$

$$HTT_t = \Sigma(T_t - T_b)\,(H_t - H_b) \quad [2]$$

Y si $T_o < T_t < T_c$:

$$TT_t = \Sigma(T_c - T_t) \quad [3]$$

$$HTT_t = \Sigma(T_c - T_t)\,(H_t - H_b) \quad [4]$$

Donde T_b es la temperatura base, T_o la temperatura óptima, T_c la temperatura máxima, T_t la temperatura en el tiempo t, H es la humedad y H_b la humedad base. La humedad, a su vez, fue estimada a partir la conductividad eléctrica (EC): dado que la EC aumenta con la falta de humedad, el porcentaje de humedad se estimó con el inverso de los valores mínimos y máximos de EC en el suelo.

Estos datos de emergencia acumulada de analizaron mediante la función de Weibull [5].

$$Y = A * e^{(-e^{(b(\log(T) - \log(T50))})} \quad [5]$$

Donde *Y* es la emergencia acumulada, *A* la emergencia máxima, *b* el ritmo de emergencia en el punto T_{50}, que es el tiempo térmico o hidrotérmico necesario para alcanzar el 50% de emergencia.

La bondad de ajuste de los modelos se analizó mediante el error de la raíz de los mínimos cuadrados (RMSEP) [6].

$$RMSEP = \sqrt{1/n \sum_{i=1}^{n} (x_i - y_i)^2} \quad [6]$$

Donde x_i representa el porcentaje de emergencia observado, y_i es el porcentaje de emergencia predicho y *n* es el número de observaciones.

3. Resultados y Discusión

La emergencia de *L. rigidum* fue superior al 10% en todas las localidades en el primer año de experimentación, pero en el seguimiento del segundo año este valor sólo fue superado en Córdoba. Por ello, se usaron los datos de 2016-17 de nueve localidades más los dos años de Córdoba. Los resultados muestran que la emergencia de esta población de *L. rigidum* se pudo describir tanto con un modelo térmico como con otro hidrotérmico (Figura 1). En ambos casos el error medio de todas las localidades es aceptable, 12,6 y 12,5% respectivamente para el modelo basado en TT y HTT respectivamente (Tabla 2). A pesar de la ligera mejoría obtenida

por el modelo basado en HTT, ésta no resulta significativa, lo que nos llevó a desestimarlo debido a la mayor dificultad que entraña el cálculo de los grados HTT respecto a los grados TT.

Por otro lado, se observan dos grupos de localidades, bien diferenciados por el ajuste obtenido con los modelos desarrollados. El primero engloba aquéllas localidades donde el RMSEP es menor del 10%, todas ubicadas en el centro y noreste de España (LLE, MAD, NAV, TOL y ZAR), y el segundo con localidades donde el RMSEP fue mayor del 10% (COR 2016-17 y 2017-18, FTS, 2H, ETSIA y VLL) (Tabla 2).

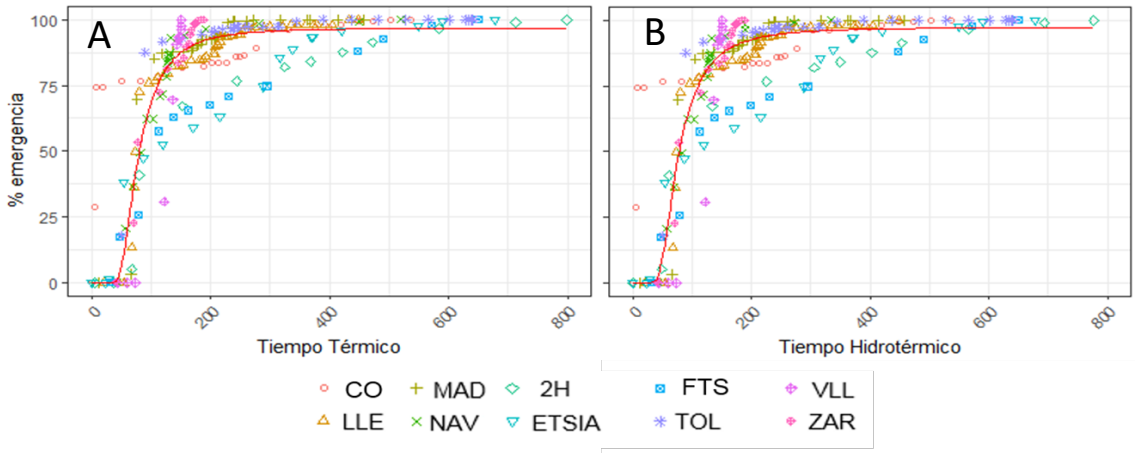


Figura 1: Emergencia acumulada en cada lugar (puntos) y modelo desarrollado (línea), A, en base a tiempo térmico (ºC); B, en base a tiempo hidrotérmico (ºC). Cada uno de los puntos representa la media de cuatro repeticiones. COR, Córdoba; LLE, Lleida; MAD, Madrid; NAV, Navarra; FTS, Sevilla FTS; 2H, Sevilla 2H; ETSIA, Sevilla ETSIA; TOL, Toledo, VLL, Valladolid; ZAR, Zaragoza.

Tabla 2. Valores de la raíz de los errores medios cuadrados (RMSEP) obtenidos por los modelos para cada localidad en 2016-17 y en Córdoba 2017-18 (única localidad con más del 10% de emergencia el segundo año), y la media de todos ellos.

Localidad	RMSEP modelo TT A = 97,1 b = -3,321 T_{50} = 114,2	RMSEP modelo HTT A = 97,4 b = -3,316 T_{50} = 110,3
Córdoba	26,1	25,8
Lleida	8,3	8,3
Madrid	8,4	8,4
Navarra	4,5	4,7
Sevilla FTS	18,2	18,3
Sevilla 2H	14,3	12,0
Sevilla ETSIA	16,3	16,2
Toledo	6,5	6,3
Valladolid	21,2	21,7
Zaragoza	5,5	5,7
Córdoba (2017-18)	13,9	13,7
Media	12,6	12,5

En vista de los resultados se separaron las localidades del centro y del noreste de las del sur y de Valladolid, y se aplicó nuevamente el modelo de Weibull para cada grupo (de las poblaciones del sur se excluyó Valladolid). Como resultado se obtuvieron dos modelos, uno para cada grupo, siendo los resultados muy diferentes (Tabla 3): el modelo desarrollado para las poblaciones del centro y noreste de España fue muy preciso (Figura 2A) y obtuvo un RMSEP medio de 5,9 (Tabla 3), mientras que el modelo desarrollado para las poblaciones del sur fue menos preciso (Figura 2B), obteniendo un RMSEP de 15,2.

Estos resultados sugieren que la adaptación a las condiciones climáticas de origen de la población escogida determinó su emergencia en el resto de localidades. Así, la emergencia fue muy parecida en localidades climáticamente más próximas, mientras que en aquéllas que presentaron climas diferentes, ésta varió. Queda, por lo tanto, la duda de si el comportamiento de la emergencia de las poblaciones locales, sobre todo aquéllas de las localidades del Sur, difiere o no de la población utilizada en este ensayo, y la necesidad o no de desarrollar modelos de emergencia específicos para cada región climática. Los estudios futuros del Grupo de Trabajo BAMh se dirigen hacia este aspecto.

Tabla 3. Valores de la raíz de los errores medios cuadrados (RMSEP) obtenidos con la función de Weibull para las localidades del Norte (A) y las del Sur (B), para describir la emergencia de L. rigidum. Norte: Lleida, Madrid, Navarra, Toledo y Zaragoza; Sur: Córdoba, Sevilla FTS, Sevilla 2H y Sevilla ETSIA. Se aportan los parámetros A, b y T_{50} de las fórmulas correspondientes. Los parámetros base fueron T_b = 7,0ºC, T_o = 10,6ºC y T_c = 20,4ºC en las localidades del norte, y T_b = 7,0ºC, T_o = 7,5ºC y T_c = 19,0ºC en las localidades del sur.

	RMSEP	*A*	*b*	T_{50}
Localidades Norte	5,9	98,40961	-3,602511	66,88
Localidades Sur	15,2	106,4847	-0,8516805	60,35

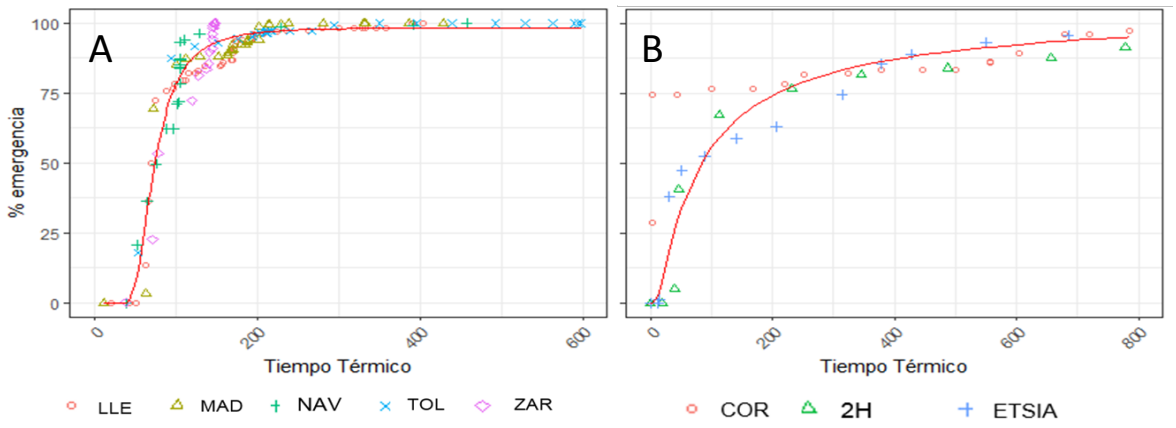


Figura 2: A, modelo Weibull de emergencia basado en tiempo térmico para las localidades del Norte (RMSEP = 5.9), excepto Valladolid; B, modelo Weibull de emergencia basado en tiempo térmico para las localidades del Sur (RMSEP = 15.2). COR, Córdoba; LLE, Lleida; MAD, Madrid; NAV, Navarra; FTS, Sevilla FTS; 2H, Sevilla 2H; ETSIA, Sevilla ETSIA; TOL, Toledo; ZAR, Zaragoza.

4. Conclusiones

Se ha desarrollado con éxito un modelo para la emergencia de *L. rigidum*, pero probablemente su aplicabilidad sea limitada al centro y noreste de España. Por otro lado, se demuestra la necesidad de validar este modelo con poblaciones locales, así como desarrollar otros modelos que puedan describir mejor la emergencia de poblaciones de *L. rigidum* adaptadas a condiciones climáticas diferentes a la utilizada en este trabajo.

5. Agradecimientos

Este estudio ha sido cofinanciado por la Cátedra Adama y por la Sociedad Española de Malherbología (SEMh). Así mismo, queremos agradecer a todas las personas que, de un modo u otro, han colaborado en la toma de datos de los experimentos.

Referencias

GUILLEMIN JP, GARDARIN A, GRANGER S, REIBEL C, MUNIER-JOLAIN N & COLBACH N (2013) Assessing potential germination period of weeds with base temperature and base water potentials. Weed Research 53, 76-87.

IZQUIERDO J, BASTIDA F, LEZÁUN JA, SÁNCHEZ DEL ARCO MJ & GONZÁLEZ-ANDÚJAR JL (2013) Development and evaluation of a model for predicting *Lolium rigidum* emergence in winter cereal crops in the Mediterranean area. Weed Research 53, 269-278.

PANELL DJ, STEWART V, BENNETT A, MONJARDINO M, SCHMIDT C & POWLES SB (2004). RIM: A bioeconomic model for integrated weed management of *Lolium rigidum* in Western Australia. Agricultural Systems 79, 305-325.

Should emergence models for *Lolium rigidum* be adapted depending on the climatic conditions?

Summary: *Lolium rigidum* is a worldwide spread noxious weed that produces important yield and economic losses in Spain. The Working Group of Weed Biology and Agroecology (BAMh) of the Spanish Weed Science Society (SEMh) has studied its emergence pattern over two seasons, 2016-17 and 2017-18. A common experiment was set in 10 sites over Spain, using the same *L. rigidum* population, harvested in Catalonia, in all of them, and its emergence was followed every 2-7 days. The emergence was parametrized with temperature and humidity data, recorded by a datalogger buried at 2 cm in the soil. The results show that thermal time is enough for a fair description of the emergence, discarding the use of hydrothermal time models, more common when describing the emergence of winter weeds. But the emergence of this population of *L. rigidum* was different in the Northern and Central sites of Spain from the Southern sites, suggesting an effect due to its climatic adaptation. For this reason, the inclusion of local populations is considered in order to adapt the developed model to the climatic biotypes of each site.

Keywords: hydrothermal time, thermal time, Weibull.

Caracterización de las nuevas malas hierbas invasoras en Cataluña

LLENES JM[1], CONSOLA S[1], MONTULL JM[2], TABERNER A

[1]Servicio Sanidad Vegetal, Generalitat de Catalunya
[2] Univeridad de Lleida.
josepma.llenes@gencat.cat, silvia.consol@gencat.cat, josemontull@hbj.udl.cat, taberner@hbj.udl.es

Resumen: Desde la década de los 80 del siglo pasado se han introducido en Cataluña varias especies nuevas de malas hierbas en los cultivos de maíz y arroz del territorio. En este trabajo se aporta la experiencia sobre que atributos de las especies invasoras, en concreto tamaño de la semilla, fertilidad de la planta, la longevidad del banco de semillas, el tipo de germinación o el medio agrícola al que afectan en las especies de más reciente introducción en Cataluña, como *Sicyos angulatus, Leptochloa fusca* o *Amaranthus palmeri*. De este análisis se extraen conclusiones a tener en cuenta para preveer la nocividad de una especie, como es su capacidad de dispersión en función del medio al que afectan o su capacidad para recargar el banco de semillas cuando afectan al cultivo, lo que a menudo va asociado a su adaptación a las labores agrícolas propias de cada cultivo. Con todo ello, se pretende enumerar los conceptos más importantes de un análisis de valoración de riesgo en el ámbito agrícola y, también, para el diseño de un plan de erradicación para futuras introducciones.

Palabras clave: *Abutilon teophrasti, Heteranthera reniformis, Sicyos angulatus, Leptochloa fusca, Leersia oryzoides, Amaranthus palmeri*

1. Introducción

Las introducciones de plantas invasoras que se comportan como malas hierbas de los campos españoles son un fenómeno cada vez más frecuente, con más consecuencias a nivel ambiental, económico y social y con más garantías de éxito debido a los intercambios comerciales y a los efectos asociados al cambio climático (Richardson et al. 2000).

Desde la década de los 80 del siglo XX han sido varias las introducciones de malas hierbas invasoras de los cultivos. Citamos como las que han tenido más incidencia en los cultivos de nuestra área agrícola a *Abutilon teophrasti, Sicyos angulatus, Leptochloa fusca*, y, recientemente, *Amaranthus palmeri*. No es hasta los primeros años del siglo XXI que se toman las primeras medidas para combatir las nuevas introducciones. Este cambio en la manera de proceder de las administraciones responsables es debido en

gran medida a la toma de consciencia de los cambios y daños que habían causado algunas malas hierbas invasoras introducidas a partir de los años 80. El hecho de disponer de una legislación como la Ley de Sanidad Vegetal de 2002 contribuyó a la adopción de dichas medidas brindándoles el apoyo legal necesario (Maillet 2003).

A pesar de las actuaciones llevadas a cabo los últimos 30 años-algunas de ellas muy exitosas- con intervenciones rápidas en el momento de la detección-factor determinante en el éxito de las estrategias de contención y erradicación (Taberner 2005)- y de constatarse el impacto medioambiental, económico y social de las nuevas introducciones (Recasens et al.2010) (Pardo, Cirujeda 2016) (Vilà et al. 2006), aún existe una gran falta de sensibilidad y de perspectiva de los responsables últimos de tomar las decisiones.

Salvo casos flagrantes como el de *Eichornia crassipes* (Llaban 2016), en general, no se percibe a las malas hierbas invasoras como un problema grave. Esto si sucede cuando se trata de plagas o enfermedades. La causa radica en que tanto plagas o enfermedades como fuego bacteriano o *Xylella fastidiosa* provocan daños agudos y rápidos sobre los cultivos, mientras que el efecto de las malas hierbas invasoras suele ser más lento, aunque constante y permanente, ya que lo que se coloniza no es un cultivo sino un territorio. Esta falta de percepción del problema influye negativamente en la toma de medidas rápidas por parte de las administraciones competentes.

A su vez, se constata una gran descoordinación entre los gestores del medio agrícola y los del medio natural, provocada en muchos casos por una disparidad en los criterios de actuación, pertenencia a administraciones distintas y también por una divergencia en las especies prioritarias que requieren de una intervención (Müller-schärer et al. 2018). Lo que favorece la dispersión, la recarga de genes de estas plantas invasoras o a la continuada reinfestación de áreas objeto de actuación facilitando su dispersión y dificultando enormemente estrategias encaminadas a su control o erradicación.

Los Weed Risk Assesment (WRA) son una herramienta útil a la hora de predecir si la mala hierba va a comportarse como invasora en una zona determinada teniendo en cuenta caracteres relevantes desde un punto de vista biológico y ecológico de la especie además de características propias del medio al que podrían afectar (del Monte 2004)(Weber et al. 2009). Uno de los WRA más utilizados en todo el mundo es el desarrollado por Pheloung (Pheloung et al.1999).

Las preguntas que plantean los WRA (Pheloung et al 1999), a menudo pueden resultar un poco genéricas ante la falta de recursos y de sensibilidad desde los estamentos que toman las decisiones, por ello en ocasiones estos sistemas permiten acotar poco las especies que van a suponer un verdadero problema.

Los cultivos, desde siempre, han sido objeto de introducciones de plantas exóticas, algunas con éxito se han convertido en malas hierbas invasoras de los cultivos (Weber, Gut 2004). En esta aportación se pretende analizar que atributos y que procesos contribuyen al éxito de una mala hierba invasora, con el fin de poder ayudar a concretar

más los WRA para plantas que afectan al medio agrícola. Para ello, se tienen en cuenta bibliografia disponible sobre el tema y algunas introducciones de plantas exóticas que han tenido un éxito más importante en su expansión como malas hierbas invasoras de los cultivos de Cataluña desde los años 80 del siglo XX y también aquellas sobre las que se ha actuado mediante campañas de control y erradicación.

Desde los años 80, se han detectado afectando a los campos de maíz de Cataluña, *Abutilon theophrasti, Sicyos angulatus, Solanum carolinense* y Teosinte. En la actualidad Abutilon está ampliamente distribuida por los maizales de todo el territorio y su expansión ha implicado cambios sustanciales en el cultivo con la incorporación obligada de un tratamiento herbicida para la mala hierba. En el caso de *Sicyos, Solanum* o teosinte, fueron objeto de una actuación rápida por parte de la administración y en la actualidad se encuentran bajo control. Si bien es cierto, que en otras zonas de Europa plantas como Sicyos son malas hierbas muy problemáticas para el cultivo. Ninguna de estas plantas ha destacado por afectar de forma muy contundente e invasora el medio natural, o zonas ruderales en la zona en que se han encontrado afectando a los cultivos. Lo que indica que no tienen capacidad de expandirse por sí mismas fuera de ellos.

Otro caso es el de *Amaranthus palmeri*, de reciente introducción y con una gran capacidad de afectar al medio natural y zonas ruderales a parte de los cultivos. Lo que le confiere una gran peligrosidad y dificulta enormemente las estrategias que se quieran plantear.

En el caso de malas hierbas que afectan al arroz que se han introducido los últimos 30 años se observa lo mismo. Aunque el medio acuático facilita mucho la expansión de las malas hierbas, es difícil encontrar *Heteranthera* fuera de los campos de cultivo.

Los cultivos suelen aportar las condiciones favorables para el establecimiento de determinadas malas hierbas invasoras que suelen ir muy asociadas a ellos ya que a menudo los territorios que afectan no tienen las condiciones adecuadas para que puedan dispersarse. Si han tenido éxito en su expansión ha sido por atributos que permiten su adaptación a las labores agrícolas, lo que puede contribuir también a medio-largo plazo a la colonización de otros medios diferentes por la recarga del banco de semillas.

Atributos que favorecen la dispersión de las malas hierbas invasoras en el medio agrícola.

Las características biológicas de las especies invasoras está ampliamente descrita (Recasens y Conesa 2003). Sin embargo la experiencia adquirida estos años en el manejo y control de malas hierbas invasoras nos permite destacar algunos de los atributos más influyentes en el éxito de la introducción de una nueva mala hierba invasora. Entre ellos destacan su capacidad para producir un gran número de semillas, la longevidad de éstas en el suelo, su forma de germinar (escalonada o agrupada), su tamaño respecto al cultivo y la dehiscencia de las semillas.

Muchos de estos atributos ya se ven reflejados en los distintos WRA como el de Pheloung (1999). Por la experiencia adquirida en estos últimos años hay que destacar que longevidades del banco de semillas superiores a los 4 años dificultan enormemente las posibles medidas encaminadas a su control o erradicación, es el caso de *Sicyos angulatus*. A su vez longevidades inferiores permiten la posibilidad de abordar estrategias con garantías de éxito como en el caso de Teosinte en Cataluña.

Por otro lado, los WRA no acostumbran a tener en cuenta atributos relevantes desde el punto de vista agrícola como es, por ejemplo, la forma de germinación. Aspecto que en el caso de Abutilon o Sicyos con germinaciones muy escalonadas han influido en la capacidad de los herbicidas para controlarlas.

Con la excepción de *Sicyos angulatus* que tiene un hábito trepador y por consiguiente la capacidad de desplazarse de parcela en parcela a través de sus zarcillos, el resto de especies de malas hierbas invasoras que se han encontrado en los cultivos de Cataluña basan su estrategia de dispersión en asegurar una gran abundancia de sus semillas en la parcela que afectan. La dehiscencia de las semillas es un atributo clave que tampoco se contempla en los WRA y que favorece la resiembra de la mala hierba y dificulta enormemente su control. Es el caso de *Leptochloa fusca* en arroz.

Otro atributo clave que se observa en la mayoría de malas hierbas invasoras que han tenido éxito en su implantación en los cultivos de Cataluña y que tampoco se tiene en cuenta en los WRA es el tamaño de la semilla. Que la semilla sea más pequeña que la del cultivo implica que en las labores de cosecha en el proceso de separación del grano la mayoría de semillas de la mala hierba no se mezclen con el grano recolectado y una vez han pasado por la cosechadora vuelvan a esparcirse en el campo, consiguiendo una resiembra de la misma.

Si por el contrario la semilla es grande o con un tamaño similar al cultivo que afecta, en el momento de la recolección se elimina del campo mucha de la semilla de la mala hierba dificultando su dispersión y sus posibilidades de éxito. Este sería el caso de *Sicyos angulatus* que, si bien tiene semillas longevas, capacidad de dispersarse de parcela a parcela por su hábito trepador y bastante dehiscencia de sus semillas, no es capaz en estadios iniciales de asegurar grandes infestaciones en la parcela debido a que mucha semilla es retirada del campo con la cosechadora.

El tamaño de la semilla también tiene otras implicaciones que pueden ayudar a responder otras preguntas del WRA o al menos añadirles más énfasis. Como se ha comentado, el hecho que la semilla sea más pequeña que el cultivo favorece que en el momento de recolección se vuelva a depositar en el campo la semilla de la mala hierba. Algunas semillas pueden escapar y mezclarse con el producto recolectado con lo que la pregunta del WRA - ¿Los propágulos probablemente se dispersan como contaminante? - se podría responder de forma afirmativa. La dispersión como contaminante se puede ver agravada si las invasoras tienen semillas muy pequeñas de tamaños inferiores a 2 mm, esto puede favorecer que se pierdan en los procesos de transporte de los granos recolectados lo que las puede expandir a muchos quilómetros de distancia. Es el caso de

Amaranthus palmeri, cuya semilla es muy pequeña y puede escapar por las juntas o grietas de los remolques de los camiones, puede explicar que los primeros individuos fueran detectados siempre al lado de fábricas de pienso que son grandes receptoras de granos importados y muy probablemente contaminados con sus semillas.

Otro aspecto en el que el tamaño de la semilla es crucial es la producción de piensos en el que semillas de tamaño inferior a los 2mm tienen más probabilidad de escapar al proceso de molturación y peletizado del pienso. Aumentando la probabilidad de propagación de la mala hierba a grandes distancias del foco original. Con todo, cabe destacar que la probabilidad es relativamente baja, ya que se ha observado que algunas semillas no son capaces de sobrevivir inmersas en los purines de cerdo o vaca.

Se acepta que todas las malas hierbas, pueden ser transportadas por las cosechadoras de campo a campo, por lo que la pregunta del WRA –los propágulos probablemente son dispersados involuntariamente por el hombre- se puede considerar positiva para todas las malas hierbas invasoras.

Referencias

DEL MONTE JP., ZARAGOZA C. 2004. “La Introduccion Deespecies Vegetales y La Valoracion de Que Se Conviertan En Malas Hierbas.” *Boletin Sanidad Vegetal*, no. 30: 65–76.

LLABAN AS. 2016. “The USDA Area-Wide Projects: Intgrated Science and Operation for Adaptive Management.” In *21st Century Challenges in Aquatiic Weed Management*, 230.

MAILLET J., C. ZARAGOZA C. 2003. “Some Considerations about Weed Risk Assesment in France and Spain.” In *Expert Consultation on Weed Risk Assessment. Workshop. Madrid, 11-13 June (2002)*, edited by FAO, 21–32. Madrid: FAO.

MÜLLER-SCHÄRER, H., SUN Y, CHAUVEL B., KARRER G., KAZINCZI G., KUDSK P., LANSINK A. OUDE. 2018. “Cross-Fertilizing Weed Science and Plant Invasion Science to Improve Efficient Management : A European Challenge.” *Basic and Applied Ecology* 33. Elsevier GmbH: 1–13. doi:10.1016/j.baae.2018.08.003.

PARDO G, CIRUJEDA A., MARTINEZ Y. 2016. “Evaluación Del Impacto Economico de Una Especie Invasora En El Regadio de Aragon: El Teosinte.” *Revista Española de Estudios Agrosociales y Pesqueros*, no. 245: 67–96.

PHELOUNG PC, WILLIAMS PA., HALLOY SR. 1999. “A Weed Risk Assessment Model for Use as a Biosecurity Tool Evaluating Plant Introductions,” no. August 1998: 239–51.

RECASENS J, CONESA J. 2003 Atributs biològics de la flora arvense al·lòctona de Catalunya. Acta Botanica Barcinonensia.48:45–56.

RECASENS J., JOSEP CONESA A., MILLAN, J., TABERNER A., SANS M.. 2010. “stimating the economic benefits of an early eradication of an invasive weed in agrosystems .” In , edited by EWRS, 46. Liubliana (Eslovenia): EWRS.

RICHARDSON, DAVID M, PYSEK P., REJMÁNEK M., BARBOUR M., PANETTA D., WEST C. 2000. “Naturalization and Invasion of Alien Plants : Concepts and Definitions,” 93–107.

TABERNER A., SANS M. 2005. “PROCEDIMIENTO DE ERRADICACIÓN DE SICYOS ANGULATUS L.” In *Congreso 2005 de La Sociedad Española de Malherbología*, 4.

VILÀ M, BACHER S., HULME P., KENIS M., KOBELT M, NENTWIG W., SOL D., SOLARZ W. 2006. “Impactos Ecológicos de Las Invasiones de Plantas y Vertebrados Terrestres En Europa” 15 (2): 13–23.

WEBER E., DANIEL G. 2004. “Assessing the Risk of Potentially Invasive Plant Species in Central Europe.” *Journal for Nature Conservation* 12 (3): 171–79. doi:10.1016/j.jnc.2004.04.002.

WEBER E., F PANETTA D., VIRTUE J, PHELOUNG P. 2009. “An Analysis of Assessment Outcomes from Eight Years ’ Operation of the Australian Border Weed Risk Assessment System.” *Journal of Environmental Management* 90 (2). Elsevier Ltd: 798–807. doi:10.1016/j.jenvman.2008.01.012.

Characterization of the new invasive weeds in Catalonia

Summary: Since the 80s of the last century, several new weed species have been introduced into Catalonia in the corn and rice crops of the territory. This work provides the experience on what attributes of the invasive species, in particular seed size, plant fertility, the longevity of the seed bank, the type of germination or the agricultural environment they affect in the species of more recent introduction in Catalonia, such as *Sicyos angulatus, Leptochloa fusca or Amaranthus palmeri*. This analysis draws conclusions to be taken into account to prevent the harmfulness of a species, such as its dispersal capacity depending on the environment they affect or its ability to recharge the seed bank when they affect the crop, which often goes associated with its adaptation to the agricultural work of each crop. With all this, it is intended to enumerate the most important concepts of a risk assessment analysis in the agricultural field and, also, for the design of an eradication plan for future introductions.

Keywords: abutilon, heteranthera, sicyos, leptochloa, leersia, amaranthus palmeri

XVII CONGRESO DE MALHERBOLOGÍA

SEMH 2019

COMUNICACIONES PÓSTER

Echinochloa spp. en campos de arroz de Aragón y Navarra: Susceptibilidad actual a distintos tratamientos herbicidas en función de la especie y mutación

IBAÑEZ C[1], GARNICA I[2], MARÍ AI[1], CIRUJEDA A[1], ROMANO Y[3], OSUNA MD[3], PARDO G[1]*

[1] Unidad de Sanidad Vegetal. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza). Avda. Montañana , 930
*gpardos@aragon.es
[2] INTIA (Instituto Navarro de Tecnologías e Infraestructuras Agroalimentarias). Aranaz y Vides, 11 bajo. 31500 Tudela (Navarra)
[3] Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), Guadajira (Badajoz)

Resumen: Plantas de 28 poblaciones de *Echinochloa* spp. de arrozales de Aragón y Navarra fueron tratadas con 6 herbicidas, a dosis estándar, en un ensayo de invernadero diseñado para 7 tratamientos: A) testigo, B) clomazona, preemergencia C) cihalofop, estadio BBCH 11-12, D) imazamox, BBCH 11-12 y 13 y E) penoxulam, F) penoxulam (doble dosis), G) profoxidim en BBCH 13. Por otro lado, utilizando técnicas moleculares, esas mismas poblaciones fueron identificadas a nivel de especie en dos grupos: *crus-galli-hispidula* u *oryzicola-oryzoides*. Asimismo, se analizaron las secuencias de ADN de la ALS y de la ACCasa para ver si presentaban alguna mutación ligada a mecanismos de resistencia. Los resultados mostraron que las 9 poblaciones de Huesca pertenecen al grupo *crus-galli-hispidula* y las 8 de Zaragoza y 11 de Navarra al *oryzicola-oryzoides* y que solo 5 de éste último grupo presentaron mutación, siendo la más frecuente pro/leu 197 con 3 casos en Navarra. Estas tres poblaciones fueron significativamente menos sensibles al imazamox, respecto a las que no mostraron mutación. Clomazona, cihalofop y profoxidim consiguieron significativamente más afecto en poblaciones del grupo *crus-galli-hispidula* e imazamox en el grupo *oryzicola-oryzoides* salvo en las poblaciones con mutación. Penoxsulam, incluso a dosis doble, apenas logró control alguno.

Palabras clave: eficacia, control, malas hierbas, materias activas, resistencia a herbicidas.

1. Introducción

En España, las especies del género *Echinochloa* spp. son las más frecuentes y las que requieren mayor control en cultivo de arroz (Osuna *et al*., 2012). Su manejo resulta muy complejo porque se trata de especies gramíneas muy similares al cultivo, con gran diversidad genética, germinación escalonada y gran capacidad de ahijamiento (Vidotto, 2013). Además, se sabe que las distintas especies de *Echinochloa* spp. muestran desigual sensibilidad a los herbicidas que se usan en arroz (Salguero *et al.,* 2015; Vidotto *et al*., 2007) pero sin embargo no existe demasiada información al respecto, entre otros motivos, por la dificultad de identificarlas correctamente.

La mayoría de herbicidas usados para controlar *Echinochloa* spp. en el cultivo del arroz son del grupo A o B (Pardo et al., 2015). Con tan poca variedad de materias activas es fácil que se generen resistencias (Heap, 2019). Tal es así que en España, en zonas de Extremadura, ya se han detectado biotipos resistentes de *Echinochloa* spp. a herbicidas inhibidores de la ALS y ACCasa (Romano *et al*., 2017). En relación a este tema, se sabe que mutaciones en el ADN de la ALS y de la ACCasa pueden ser responsables de la aparición de fenómenos de resistencia en *Echinochloa* spp. (Romano *et al*., 2017).

Con todo esto, las quejas sobre la falta de eficacia de los herbicidas y escasez de materias activas sobre *Echinochloa* spp. en campos de arroz cada vez son más frecuentes en Aragón, (Susana Hernández y Mª Carmelo García, com. pers.) por lo que es necesario evaluar la eficacia de tratamientos herbicidas con las poblaciones actuales.

En el presente trabajo se analiza la eficacia de distintos tratamientos herbicidas sobre poblaciones de *Echinochloa* spp. recogidas en campos de Aragón y Navarra relacionándolas con el grupo de especie a que pertenecen y con la presencia o no de diversas mutaciones en su ADN asociadas al fenómeno de resistencia.

2. Material y Métodos

Como material vegetal se utilizó semillas de 28 poblaciones de *Echinochloa* spp. recogidas en octubre de 2017 en campos de arroz de Aragón y Navarra, y que por tanto habían sobrevivido a los tratamientos que los agricultores habían efectuado durante la campaña. En concreto 9 poblaciones provinieron de la provincia de Huesca, 8 de la de Zaragoza y 11 de Navarra. Una muestra de cada población se envió al Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX) para su identificación a nivel grupo de especie (*crus-galli-hispidula* u *oryzicola-oryzoides*) por métodos moleculares. Asimismo, se analizaron las secuencias de ADN de la ALS y de la ACCasa para estudiar si presentaban alguna mutación ligada a mecanismos de resistencia. La técnica utilizada para ambos objetivos se describe en Romano *et al*. (2017).

El ensayo se desarrolló en uno de los invernaderos del CITA en julio-agosto de 2018. La refrigeración se programó para que no se superaran los 35ºC en ningún momento. La semillas de *Echinochloa* se colocaron en macetas de plástico de 7 x 7 x 8 cm rellenas previamente con sustrato hortícola (90% materia orgánica, 10% cenizas y 0,2% nitrógeno y 0,1% fósforo) a razón de unas 12-18 semillas de acuerdo a la capacidad germinativa de cada población, evaluada previamente en un ensayo para tal fin. Antes de realizar los tratamientos de postemergencia y en los testigos se realizaron aclareos limitando la densidad a 10 plantas/maceta. Las macetas se colocaron en bandejas, manteniendo una elevada lámina de agua para simular las habituales condiciones de inundación del cultivo de arroz. Los tratamientos (Tabla 1) se realizaron con un equipo de pulverización experimental aplicando cada herbicida con un volumen de caldo de 300 l/ha, usando boquillas Teejet® XR 110 a presión de 2 bar.

El diseño experimental para cada población fue de bloques al azar con 6 repeticiones y los 7 tratamientos descritos en la tabla 1. La parcela elemental fue la maceta con 10 plantas de *Echinochloa*. Los parámetros evaluados al finalizar el ensayo fueron: eficacia a los 28 días después de los últimos tratamientos (42DDS) calculada como porcentaje de plantas muertas en cada maceta respecto al total (10) y biomasa seca, expresada en porcentaje sobre la del testigo (A). Para el tratamiento de preemergencia (B) la eficacia se calculó en base al nº de plantas emergidas en las macetas testigo (A) antes de realizar el aclareo descrito.

Tabla 1: Características de los tratamientos efectuados

Tratamiento	Nombre comercial	Ingrediente activo (%)	Dosis producto (l/ha)	Fenología *Echinochloa* (BBCH)	DDS
A	-	-	-	-	-
B	Command	clomazona (36%)	1,0	0	3
C	Clincher plus	cihalofop-butil (20%)	1,5	11-12	11
D*	Pulsar 40	imazamox (4%)	0,875 0,875	11-12 13	11 14
E	Viper max	penoxsulam (2,04%)	2	13	14
F	Viper max	penoxsulam (2,04%)	4	13	14
G	Aura	profoxidim (20%)	1	13	14

DDS: días después de la siembra, 6 de julio de 2018. *Se aplicó 2 veces.

Los datos se analizaron en función del grupo de especie (*crus-galli-hispidula* u *oryzicola-oryzoides*) una vez identificada cada población, para ver el efecto de los tratamientos en ambos grupos. Asimismo, dentro de cada grupo de especie se comparó, por separado, la eficacia de cada tratamiento en poblaciones que presentaban mutación en las secuencias de ADN de la ALS o de la ACCasa frente a las que no tenían mutación.

Como con las habituales trasformaciones usadas en malherbología no fue posible normalizar los datos se optó por realizar una estadística descriptiva representándolos en gráficos de cajas y bigotes o *boxplot.* En ellos, aparte de mostrar su información intrínseca (mediana, cuartiles, límite superior e inferior y datos atípicos) se añadió la media aritmética. Estos gráficos se realizaron con ayuda del software R (R Core Team, 2014).

3. Resultados y discusión

En cuanto a la identificación por grupo de especie, éstas, estuvieron totalmente condicionadas por la ubicación. Así, las 9 poblaciones de Huesca pertenecen al grupo *crus-galli-hispidula* (Cg/h) mientras que las 8 de Zaragoza y 11 de Navarra al *oryzicola-oryzoides* (O/o). Esto puede tener cierta lógica, ya que las zonas arroceras de Huesca son más recientes y en zonas nuevas de cultivo de arroz la especie predominante es *E. crus-galli*, menos adaptada a las inundaciones y probablemente más sensible a la mayoría de herbicidas que se aplican en arroz. Las otras especies se adaptan mejor y en zonas más viejas de cultivo de arroz, como las navarras y las de Zaragoza, acaban predominando. En cinco poblaciones se detectaron mutaciones, siendo la más frecuente pro/leu 197 con 3 casos en Navarra y 2 pro/ser 197 con un caso en Zaragoza y otro en Navarra. Estas mutaciones pueden explicar la falta de eficacia de algunos tratamientos por ser responsables de los denominados mecanismos de resistencia "target-site". No obstante, puede haber mutaciones distintas a las analizadas en este trabajo asociadas a la resistencia o también que la resistencia sea de otro tipo, como metabolismo o transporte, etc. que no se han estudiado por ahora.

En relación a la eficacia en el control, hay que señalar que generalmente fue muy baja prácticamente en todos los casos (figura 1). Este hecho sugiere que la falta de eficacia observada en campo no se debe, normalmente, a fallos de aplicación. Hay que tener en cuenta que, si un tratamiento no funciona en condiciones controladas, con planta pequeña y equipo preciso, todavía menos lo hará en condiciones de campo con plantas más heterogéneas, algunas más desarrolladas y endurecidas y aplicaciones en peores condiciones. Aunque sería recomendable llevar a cabo ensayos más específicos para confirmar y cuantificar la resistencia, todo indica que nos encontramos ante casos, cuando

menos, muy problemáticos. El caso más extremo es el penoxsulam que incluso al doble dosis de la recomendada (tratamiento F) apenas consigue un 10 % de eficacia en el mejor de los casos (grupo *oryzicola-oryzoides*). En la dosis estándar (tratamiento E) incluso parece manifestarte un proceso de hormesis, pues en muchos casos la biomasa es mayor que en el testigo.

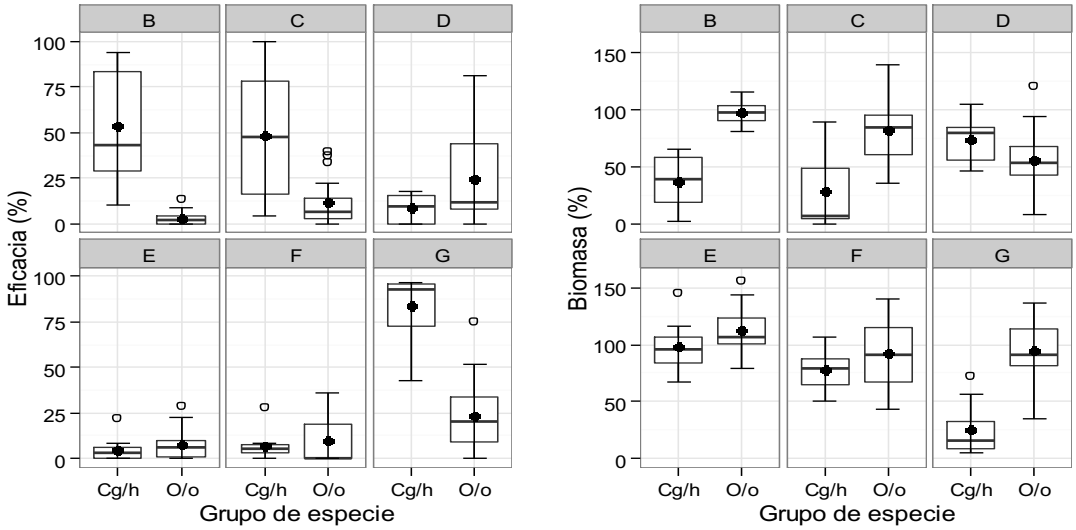


Figura 1: Resultados de eficacia (izquierda) y biomasa, en % sobre testigo (derecha) según tratamiento (**B**: clomazona, **C**: cihalofop-butil, **D**: imazamox, **E**: penoxulam, **F**: penoxsulam (doble) **G**: profoxidim) y grupo de especie de *Echinochloa* (**Cg/h**: *crus-galli/hispidula*, 9 poblaciones, **O/o**: *Oryzicola/oryzoides*, 19 poblaciones).

Sí se ha observado, no obstante, que la eficacia de algunas materias activas varía notablemente según al grupo de especie a que pertenece. Así, clomazona (B), cihalofop (C) y profoxidim (G) consiguieron significativamente mayor eficacia en poblaciones del grupo *crus-galli-hispidula* tanto en eficacia como en biomasa (figura 1) El resultado está en la línea de lo que afirma Taberner (2006) para cihalofop y profoxidim, mientras que para clomazona, Coria (2017) encontró algo parecido en alguno de sus ensayos. Imazamox (D), por el contrario, fue más efectivo en el grupo *oryzicola-oryzoides* salvo en las 3 poblaciones con mutación pro/leu 197 del gen de la ALS, en las que no consiguió efecto alguno (figura 2). Esto confirmaría un mecanismo *target-site* en estas tres poblaciones. Del mismo modo, dichas poblaciones también empeoraron los ya de por si malos resultados del penoxulam (trat E y F). Sin embargo, hubo otras dos poblaciones con mutación pro/ser 197 que no tuvieron un comportamiento peor que el resto de poblaciones (figura 2).

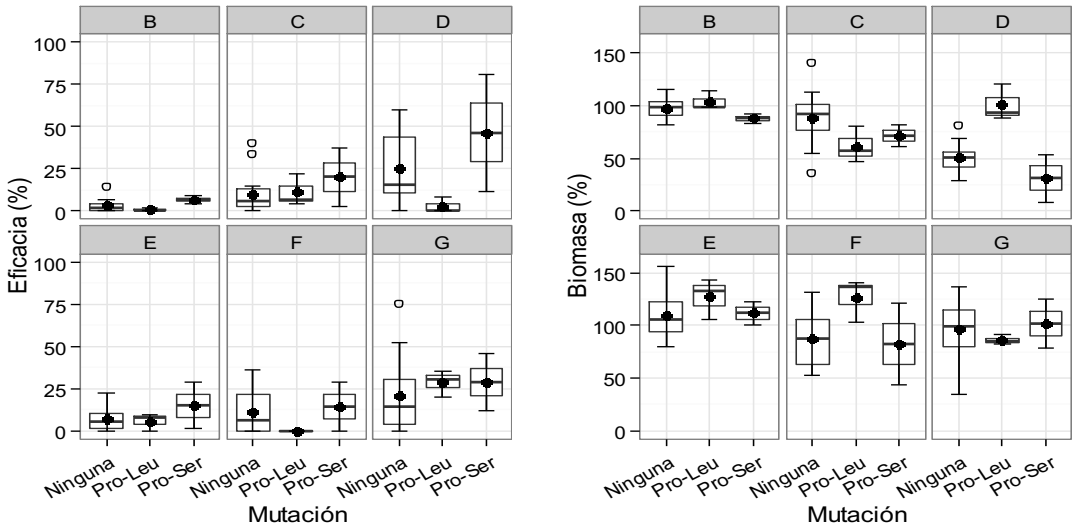


Figura 2: Resultados de eficacia (izquierda) y biomasa en % sobre testigo (derecha) en poblaciones de *Echinochloa*, grupo *Oryzicola/oryzoides* según tratamiento: (**B**: clomazona, **C**: cihalofop-butil, **D**: imazamox, **E**: penoxulam **F**: penoxsulam (doble) **G**: profoxidim) y tipo de mutación: (**Ninguna**, 13 poblaciones, **Pro-Leu**: prolina-leucina 197, 3 poblaciones, **Pro-Ser**: prolina-serina 197, 2 poblaciones)

En resumen, los resultados indican (i)que el control de *Echinochloa* con las materias activas probadas en este trabajo está seriamente comprometido en muchas zonas de cultivo arroz de Aragón y Navarra, siendo los indicios de aparición de resistencia muy altos, sobre todo para el herbicida penoxsulam. (ii) que las especies del grupo *crus-galli-hispidula* son más susceptibles a clomazona, cihalofop y profoxidim, mientras que las del grupo *oryzicola-oryzoides* lo son al imazamox. (iii) que la mutación pro-leu 197 sería responsable de aumentar la insensibilidad del imazamox a poblaciones del grupo *oryzicola-oryzoides*.

Agradecimientos

Al proyecto RTA2014-0333-C03-03, la financiación. A Susana Hernández y Mª Carmelo García Floria, la localización de las parcelas, a Cristina Prado y Ester Armero, la toma de datos y a José Ángel Alins y Fernando Arrieta la aplicación de los herbicidas.

Referencias

CORIA S (2017) Respuesta de diferentes biotipos de *Echinochloa* spp. a los herbicidas clomazona, pendimentalina y penoxsulam. Trabajo Fin de Master. Universitat Politecnica de Valencia, 24pp.

HEAP I (2019) The international survey of herbicide resistant weeds. Online. Internet. Available www. weedscience.com

OSUNA MD, ROMANO Y & QUILES JM (2012) Principales malas hierbas y métodos de control en el cultivo de arroz en España. *Vida Rural*, 339: 74-77

PARDO G, MARÍ A, FERNÁNDEZ-CAVADA S, GARCÍA-FLORIA C, HERNÁNDEZ S, ZARAGOZA C & CIRUJEDA A (2015) Alternativas al penoxsulam para control de *Echinochloa* spp. y ciperáceas en cultivo de arroz en el nordeste de España. *ITEA*, vol. **111** (4), pp. 295-309

ROMANO, Y, MENDOZA F, PALMERÍN JA, QUILES JM, AMARO I, OSUNA MD (2017). Distribución de poblaciones resistentes de *Echinochloa* spp. a herbicidas inhibidores de la ALS y ACCasa

en Extremadura. Actas del XVI Congreso de la Sociedad Española de Malherbología, 269-273 Pamplona, España.

R CORE TEAM (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL http://www.R-project.org/.

SALGUERO J, ROMANO Y, ÁLVAREZ-BARRIENTOS A, TORRALBO P, ALARCÓN, MV, AMARO-BLANCO I & OSUNA, MD (2015) Identificación de especies de *Echinochloa* spp. en arrozales de Extremadura mediante citometría de flujo. XV Congreso de la Sociedad Española de Malherbología. pp. 451-457.

TABERNER A, (2006) Control de malas hierbas en arroz. Dossier Tecnic 12: 19-24. https://www.miteco.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_DT%2FDT_2006_12_19_24.pdf

VIDOTTO F & FERRERO A (2013) Weed management in Italian Rice. Actas del XIV Congreso de la Sociedad Española de Malherbología, 139-144. Valencia, España.

VIDOTTO F, TESIO F, TABACCHI M & FERRERO A (2007) Herbicide sensitivity of *Echinochloa* spp. accessions in Italian rice fields. *Crop Protection*, **26**: 285-293.

Echinochloa spp. in rice fields in Aragon and Navarre: Current susceptibility to different herbicide treatments depending on the species and mutation.

Summary: Plants from 28 populations of *Echinochloa* spp. provenient from rice fields in Aragon and Navarra were treated with 6 herbicides, at standard doses, in a greenhouse trial designed for 7 treatments: A) Control, B) clomazone in pre-emergence C) cyhalofp-butyl, stage BBCH 11-12 D) imazamox, stage BBCH 11-12 y 13 and E) penoxsulam, F) penoxulam (double dose) G) profoxydim at stage BBCH 13. On the other hand, the same populations were identified at the species level in two groups by using molecular techniques: *crus-galli-hispidula* or *oryzicola-oryzoides*. The ALS and ACCasa DNA sequences were also analyzed in order to seek for mutations linked to resistance mechanisms. The results showed that the 9 populations of Huesca belong to the *crus-galli-hispidula* group while the 8 of Zaragoza and 11 of Navarra to the *oryzicola-oryzoides* and that only 5 of these presented mutation, being the most frequent pro/leu 197 with 3 cases in Navarra and pro/ser 197 the other identified mechanism with one population from Navarra and the other from Zaragoza. The three first populations were significantly less sensitive to imazamox than those that showed no mutation. Clomazone, cyhalofop and profoxydim had significantly more effect on populations of the *crus-galli-hispidula* group and imazamox in the *oryzicola-oryzoides* group except in mutated populations. Penoxsulam, even at double dose, had an effect on very few populations

Keywords: efficacy, weed control, active ingredient, herbicide resistance.

Mutaciones de lugar de acción presentes en poblaciones de *Lolium rigidum* resistentes a herbicidas inhibidores de la enzima acetolactato sintetasa

ESCORIAL MC, HORNOS Z, CHUECA MC, LOUREIRO I

Dpto. Protección Vegetal. INIA. Ctra. La Coruña Km.7,5 28040 Madrid, ESPAÑA.
escorial@inia.es, zeus.hornos@inia.es, chueca@inia.es, loureiro@inia.es

Resumen: Se ha determinado la base molecular para la resistencia a herbicidas inhibidores del enzima acetolactato-sintasa (ALS) en 23 poblaciones de *Lolium rigidum* procedentes de campos de Castilla y León y Lleida que habían sido clasificadas como resistentes después de la aplicación del herbicida clorsulfurón en condiciones de invernadero. De cada población, se clonaron 100 plantas cuando éstas se encontraban en estado de 3-4 hijuelos, obteniendo 3 clones de cada planta y se dejaron crecer durante una semana. Un clon de cada planta se tomó como control, otro se pulverizó con clorsulfurón (SU, sulfonilurea) y el tercero con imazamox (IMI, imidazolinona). Se incluyó además una población sensible como control. A las tres semanas de los tratamientos, cuando los herbicidas habían hecho su efecto en la población sensible, se evaluó la supervivencia de los clones y se analizó la presencia de dos mutaciones de lugar de acción asociadas con la resistencia a inhibidores de ALS: Pro_{197} que confiere resistencia a sulfonilureas, y Trp_{574} que confiere resistencia a sulfonilureas y a imidazolinonas. La mayoría de las poblaciones resistentes eran heterogéneas y contenían tanto individuos resistentes como sensibles. El porcentaje de plantas resistentes fue superior al 45% en todas poblaciones resistentes menos en una, en la que fue del 26%. Se ha detectado la presencia de ambas mutaciones en todas las poblaciones excepto en siete. En seis de éstas sólo se detectó la mutación en Pro_{197} mientras que en una se detectó únicamente la mutación Trp_{574}.

Palabras clave: resistencia a herbicidas, ALS, AHAS, Pro_{197}, Trp_{574}, vallico.

1. Introducción

El enzima acetolactato sintetasa (ALS) es una enzima clave en la biosíntesis de aminoácidos ramificados cuya inhibición causa la muerte de la planta. Este enzima es la diana de los herbicidas inhibidores de ALS, que incluyen a las sulfonilureas (SU), imidazolinonas (IMI), triazolopirimidinas (TP), pirimidiniltiobenzoatos (PTB) y sulfonilamino-carbonil-triazolinonas (SCT). Estos herbicidas han sido ampliamente utilizados en la agricultura mundial desde su introducción a principios de la década de

1980 debido a su amplio espectro de control de malas hierbas, a su eficacia y a la amplia selectividad de los cultivos. Sin embargo, este uso extensivo y continuado ha llevado a la aparición de poblaciones resistentes, siendo en la actualidad el grupo de herbicidas con más casos de resistencia, con biotipos resistentes en 161 especies en más 40 países (Heap, 2019).

Se han descrito 8 aminoácidos conservados en el gen que codifica el enzima ALS que están implicados en el sitio de acción de los herbicidas inhibidores de ALS y cuya mutación da lugar a resistencia en las malas hierbas: Ala_{122}, Pro_{197}, Ala_{205}, Arg_{377}, Asp_{376}, Trp_{574}, $Ser_{65}3$ y Gly_{654} (Tranel *et al.*, 2019). Dependiendo de la mutación se observarán patrones distintos de resistencia cruzada a las familias de herbicidas. Entre éstas, las mutaciones en Pro_{197} y Trp_{574} son las que se detectan más frecuentemente (Powles & Yu, 2010).

El vallico (*Lolium rigidum* Gaud.) es una mala hierba gramínea presente en la mayoría de los cultivos de cereal de invierno en todas las regiones de España, con una gran capacidad para desarrollar resistencias a los herbicidas utilizados para su control (CPRH 2015; Loureiro *et al.*, 2017). En *L. rigidum* se han identificado mutaciones de sitio de acción que confieren resistencia a inhibidores de ALS en los aminoácidos $Pro_{197,}$ que se caracteriza porque confiere resistencia a SUs pero no a IMIs, y Trp_{574}, que confiere resistencia tanto a SUs como a IMIs (Tranel *et al.*, 2019).

En este trabajo se ha determinado la base molecular para la resistencia a inhibidores de ALS en poblaciones de *L. rigidum* procedentes de campos de diferentes provincias de Castilla y León y de la provincia de Lleida (Cataluña) que habían sido resistentes a la aplicación de clorsulfurón en condiciones de invernadero.

2. Material y Métodos

2.1. Material vegetal. En el presente estudio se ha utilizado la semilla madura de 23 poblaciones de *L. rigidum,* 19 procedentes de campos de Castilla y León y 4 de Lleida y que habían sido confirmadas como altamente resistentes (RRR) según la clasificación de Moss *et al.* (1999) a la aplicación de clorsulfurón en condiciones de invernadero (Loureiro *et al.*, 2017). Se utilizó además semilla de la población de *L. rigidum* 314, recolectada en Castilla y León, y que había sido previamente caracterizada como sensible. En la Tabla 1 se muestra la procedencia de cada población.

2.2. Caracterización de fenotipos. Se sembraron semillas de todas poblaciones de *L. rigidum*, se germinaron y se llevaron a plántula, con un total de 100 plántulas para cada población. Cuando las plántulas tenían 3 hijuelos, éstos se separaron, se trasplantaron, se identificaron y se dejaron crecer durante una semana. Transcurrido este tiempo, un clon de cada planta se utilizó como control, otro se pulverizó con 15 g m.a. ha^{-1} de clorsulfurón 75% (Glean®, DuPont) y otro con 50 g m.a. ha^{-1} de imazamox 4% (Pulsar®, BASF). Los tratamientos se realizaron con un pulverizador automático (Devries Manufacturing, Hollandale, EEUU) equipado con una boquilla plana Teejet 8002-E calibrado para pulverizar 175 $L.ha.^{-1}$ a 130 kPa. A las tres semanas de los tratamientos, cuando los herbicidas habían hecho su efecto en una población sensible (314) incluida como control,

se identificaron fenotipos sensibles (SS), resistentes a sulfonilureas y sensibles a imidazolinonas (R-SU/S-IMI) y resistentes a sulfonilureas e imidazolinonas (R-SU/R-IMI). Los ensayos se realizaron en cámara con un fotoperiodo de 16 horas de luz (250-300 μE $m^{-2}s^{-1}$ PAR) a 22 ± 1° C y 8 de oscuridad a 16 ± 1° C.

Tabla 1. Origen de las poblaciones de *Lolium rigidum* resistentes a herbicidas inhibidores de ALS (RRR según Moss *et al.*, 1999) empleadas en el estudio.

Comunidad Autónoma	Provincia	Número de poblaciones (*)
Castilla y León	Ávila	2 (522,539)
	León	1 (684)
	Palencia	1 (713)
	Salamanca	7 (528, 529, 531, 660, 661, 664, 681)
	Soria	1 (559)
	Valladolid	1 (314)
	Zamora	7 (495, 497, 652, 678, 681, 682, 679)
Cataluña	Lleida	4 (612, 616, 617, 620)
	Total	24

*Los números de las poblaciones corresponden a la referencia de la población en la colección de poblaciones de malas hierbas del laboratorio de Malherbología del INIA.

2.3. Caracterización de genotipos. Para la detección de las mutaciones (sin conocer la sustitución precisa) se utilizó la técnica dCAPs (*derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*), con cebadores específicos que amplificaban el fragmento de la ALS a partir del ADN genómico de los individuos resistentes a la vez que introducían un punto de corte para un enzima de restricción. Para la identificación de Pro_{197} se utilizaron los cebadores RG197F y RG197R y el enzima de restricción *ApaI*, y para Trp_{574} los cebadores RG574F y ALV7R y el enzima de restricción *Bst*XI, siguiendo el protocolo descrito en Délye *et al.* (2009).

3. Resultados y Discusión

El análisis molecular del ADN genómico de 3 plantas de cada fenotipo y población confirmó la presencia de las mutación Pro_{197} en las plantas R-SU/S-IMI, de Trp_{574} en las plantas R-SU/R-IMI y la ausencia de éstas mutaciones en las plantas sensibles. El porcentaje medio de individuos resistentes a inhibidores de ALS en las poblaciones clasificadas como RRR procedentes de Castilla y León fue de 79 ± 13% (Tabla 2). Entre poblaciones, este valor varió entre 54 y 98%. En el 58% de las poblaciones el porcentaje de plantas portadoras de la mutación Pro_{197} fue mayor que el de portadoras de Trp_{574}, con un 21% de esas poblaciones en las que además Pro_{197} era la única mutación presente. Sólo se encontró una población en las que todas las plantas resistentes tenían la mutación Trp_{574}.

Tabla 2. Respuesta de las poblaciones de *Lolium rigidum* resistentes (RRR según MOSS *et al.*, 1999) a los herbicidas inhibidores de ALS clorsulfurón (SU) e imazamox (IMI) aplicados a la dosis de campo.

Origen	Población *	S-SU/S-IMI (SS)	R-SU/S-IMI (Pro_{197})	R-SU/R-IMI (Trp_{574})	Plantas resistentes (%)
Castilla y León					
Ávila	522	20	58	22	80
	539	8	6	86	92
León	684	42	42	16	58
Palencia	713	24	44	32	76
Salamanca	660	38	62	0	62
	664	32	68	0	68
	528	30	44	26	70
	531	25	27	48	75
	661	10	86	4	90
	665	8	18	74	92
	529	6	42	52	94
Soria	559	2	6	92	98
Valladolid	314†	100	0	0	0
Zamora	681	46	52	2	54
	652	36	64	0	64
	682	18	67	14	82
	678	16	84	0	84
	497	16	24	60	84
	679	14	44	42	86
	495	10	0	90	90
$\overline{x}$ ± DE					79 ± 13
Cataluña					
Lleida	612	74	26	0	26
	617	54	46	0	46
	616	52	28	20	48
	620	4	65	31	96
$\overline{x}$ ± DE					54 ± 30

S-SU/S-IMI=plantas sensibles a ambos herbicidas; R-SU/S-IMI= resistentes a sulfonilureas y sensibles a imidazolinonas; R-SU/R-IMI: resistentes a ambos herbicidas. Las poblaciones se ordenan por el nº de individuos resistentes a inhibidores de ALS. *Los números de las poblaciones corresponden a la referencia de la colección de poblaciones de malas hierbas del laboratorio de Malherbología del INIA. †Población caracterizada previamente como sensible.

En el caso de las poblaciones procedentes de Lleida, la media de plantas resistentes fue del 54 ± 30% (26-96), menor que en Castilla y León. Al igual que en el caso de Castilla y León, fueron más las poblaciones con mayor porcentaje de plantas con la mutación Pro_{197} que Trp_{574}, siendo Pro_{197} la única mutación presente en el 50% de las poblaciones era (Tabla 2).

Estas mutaciones identificadas en las poblaciones muestreadas ya han sido previamente descritas en *L. rigidum* (Powles & Yu 2010; Tranel *et al.*, 2019). La distribución de los alelos de resistencia sugiere que en algunas poblaciones la resistencia

ha podido evolucionar de forma independiente (ej. poblaciones 495 y 652 procedentes de Zamora), y/o que ha habido un flujo de genes, vía polen o a través del movimiento de semillas resistentes entre poblaciones de áreas más o menos cercanas (660 y 664 de Salamanca). Puesto que *L. rigi*dum es una especie fundamentalmente alógama no podemos descartar que en las plantas resistentes R-SU/R-IMI de poblaciones que poseen las dos mutaciones sean ambas las que puedan estar presentes en una sola planta, lo cual debe ser investigado. Estos resultados sobre mutaciones en el sitio de acción no excluyen la posible participación en la resistencia de otros tipos de mecanismos que no sean de sitio de acción, lo que explicaría que las poblaciones procedentes de Lleida se clasificaran como RRR con un porcentaje de plantas resistentes relativamente bajo en comparación con otras poblaciones.

Referencias

CPRH, Comité Prevención Resistencia Herbicidas (2015) Resistencia a los herbicidas. *Lolium rigidum* (vallico) ¿Cómo manejar una población de vallico (*Lolium rigidum*) resistente en cereal de invierno?. http://semh.net/wp-content/uploads/2016/01/Ficha-Lolium-CPRH-definitiva.pdf

DÉLYE C, BOUCANSAUD K, PERNIN & V LE CORRE (2009) Variation in the gene encoding acetolactate-synthase in *Lolium* species and proactive detection of mutant, herbicide-resistant alleles. Weed Research **49**, 226-236.

HEAP I (2019) The international survey of herbicide resistant weeds. Online. http://www.weedscience.org. 5/27/2019.

LOUREIRO I, ESCORIAL C, HERNÁNDEZ-PLAZA E, GONZÁLEZ ANDÚJAR JL & CHUECA MC (2017) Current status in herbicide resistance in *Lolium rigidum* in winter cereal fields in Spain: Evolution of resistance 12 years after. Crop Protection **102**, 10-18.

MOSS SR, CLARKE JH, BLAIR AM et al. (1999) The occurrence of herbicide-resistant grass-weeds in the United Kingdom and a new system for designating resistance in screening assays. In: BCPC (Ed.), The Brighton Conference - Weeds, England, pp. 179-184.

POWLES SB & YU Q (2010) Evolution in action: plants resistant to herbicides. Annual Review of Plant Biology **61**, 317-347.

TRANEL PJ, WRIGHT TR & HEAP IM (2019) Mutations in herbicide-resistant weeds to ALS inhibitors. Online. http://www.weedscience.org/Mutations/MutationDisplayAll.aspx. 5/27/2019.

Target site mutations present in *Lolium rigidum* populations resistant to acetolactate synthase inhibitor herbicides

Summary: The molecular basis for herbicide resistance to acetolactate-synthase (ALS) inhibitor herbicides has been determined in 23 populations of *L. rigidum* proceeding from fields from Castilla y León and Lleida that were classified as resistant after the application of chlorsulfuron herbicide under greenhouse conditions. Of each population, 100 plants were cloned when 3-4 tillers were present and 3 clones of each plant were obtained and

were left to grow during one week. A clone from each plant was used as control, a second one was treated with chlorsulfuron (SU, sulfonylurea) and a third one with imazamox (IMI, imidazolinone). In addition, a susceptible population was included as a control. Three-weeks after treatment, when herbicides had made their effect on the susceptible population, clones were evaluated for their survival. The presence of two target site mutations associated with ALS inhibitors resistance was analyzed: Pro_{197}, that confers sulfonylurea resistance, and Trp_{574} which confers both sulfonylurea and imidazolinone resistance. Most of the resistant populations were heterogeneous and contained both resistant and sensitive individuals. The percentage of resistant plants was over 45% in all populations except one in which it was only 26%. The presence of both mutations was detected in all populations except in seven. In sis of these populations only the Pro_{197} mutation was found while in the other only the Trp_{574} mutation was detected.

Keywords: herbicide resistance, ALS, AHAS, Pro_{197}, Trp_{574}, rigid ryegrass

Potential basis of glyphosate resistance in *Lolium perenne* from Douro vineyards

MENDES A[1], PORTUGAL J[2], CALHA IM[1], ANDRADE E[1]

[1]INIAV, Quinta do Marquês, Oeiras, PORTUGAL
avilson_in@hotmail.com, isabel.calha@iniav.pt, eugenia.anadrade@iniav.pt
[2] ESABeja/IPBeja, Beja, PORTUGAL
jportugal@ipbeja.pt

Abstract: Glyphosate resistant *Lolium perenne* populations have been identified in Douro vineyards – north Portugal whose resistance mechanisms were not yet fully elucidated. Therefore, we studied the resistance of these two biotypes under greenhouse and laboratory conditions. The objective of this study was to confirm whether target site resistance could explain the differences between sensitive and resistant *L. perenne* biotypes. In order to confirm this hypothesis, shikimate leaf disc assay, sequencing of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (*EPSPS*) gene and the estimation of its number of copies were carried out. After being exposed to glyphosate, the GR population showed a lower accumulation of shikimate compared to a reference susceptible population. The sequencing of cDNA sequence encoding the EPSPS enzyme revealed that the most frequent point mutations responsible for glyphosate resistance [Pro106Ser/Thr/Gly/Cys/Ala/Ile/Val/Met/Leu] were not present. The estimation of the relative *EPSPS* gene copy number, by means of quantitative real time-PCR and ΔΔCt value, revealed a two-fold amplification of the *EPSPS* gene. The overexpression of the *EPSPS* gene had contributed as a mechanism of resistance to glyphosate. Further studies on glyphosate translocation are in course.

Key words: resistance, non target-site (NTSR), EPSPS, shikimate, real-time PCR

1. Introduction

Over the last decades herbicides, and particularly glyphosate, have been crucial imputs in agriculture for the management of several different species of weeds (MCDOUGALL, 2018). However, its improper use provoked the loss of effectiveness leading to the appearance of glyphosate-resistant weeds (BONNY, 2016). Currently, at least 41 weed species with glyphosate-resistant (GR) populations have been documented (HEAP, 2019). Glyphosate targets the enzyme 5-enolpyruvylsilylate-3-phosphate synthase (EPSPS) which is involved in the synthesis of aromatic amino acids (phenylalanine, tyrosine and tryptophan). (DUKE & POWLES, 2008; DOMINGOS, 2014). Resistant weeds can carry mutations altering the target enzyme, provoking insensivity of the plant to the presence of the herbicide. There are relatively few single nucleotide mutations in the EPSPS gene that confer resistant to glyphosate. Whereas

target site resistance (TSR) evolves from the selection of mutations at a single gene locus, non TSR (NTSR) evolution is likely to result from selection at multiple gene loci. TSR mechanisms include increased expression of EPSPS or structural changes to the herbicide binding site and NTSR includes any other mechanism (decreased absorption and /or translocation or enhanced metabolization) (SALAS *et al*., 2012; DELYE *et al.,* 2013;YANNICCARI *et al.,* 2017). Among GR weed species is *Lolium perenne* L., a monocotyledon belonging to the family Poaceae. To control this grass weed, glyphosate herbicide has been repeatedly used, and the existence of resistance was for the first time confirmed in 2008 in Argentina and five years later in Douro vineyards in the North of Portugal (CALHA *et al.* 2013). Currently, two mutations in the EPSPS gene responsible for glyphosate resistance have been identified in *Lolium* species, namely those that lead to the substitution of amino acids Thr102 and Pro106 (LI *et al.,* 2018). In this study, the mechanism of resistance to glyphosate present in one GR population of *L. perenne* from Douro vineyards was investigated.

2. Material and Methods

2.1 **Plant material-** *Lolium perenne* seeds were obtained from Douro vineyards which have been treated an average of two times per year with 540-1440 Kg a.e.ha^{-1} glyphosate for the past 10 years. Seventeen seed samples were harvested in 2015, out of which 15 revealed to be resistant by means of a dose response assay conducted in the greenhouse. Seeds from two resistant biotypes (L4, L12) , i.e., the offspring of plants surviving after the application of 540 kg ea.ha^{-1}of glyphosate were used to perform all of the assays described below. Seeds of the susceptible population (LS), used as reference, were purchased commercially.

2.2 **Seed germination and growing conditions -**Seeds from all biotypes were sterilized and stratified in the cold. For sterilization, about 25 seeds were placed in a goblet containing 20 mL of sodium hypochlorite (3%, v/v) and stirred for about 2 min. After this period, they were transferred to a colander and rinsed with a stream of abundant water. For stratification, seeds were submerged in 20 mL of distilled and sterilized water and incubated in the refrigerator at 4 °C for 7 days (no light supplied). Germination rate was assessed 7 days after seeding (DAS). Seedlings were transplanted to pots and maintained in a growth chamber at 23 °C / 18 °C (day/ night) with a photoperiod of 16 h for seven days. At this time the youngest full expanded leaf was harvested for the shikimic acid accumulation assay (2.3.)

2.3 **Shikimic acid accumulation assay-**The accumulation of shikimic acid in the leaves of the resistant (L4 and L12) and susceptible biotypes was assessed according to the protocol described by NOL *et al.,* 2012 [14] with minor modifications. Fifty (50) mg of leaf strips were plated on Petri dishes covered with Whatman paper embedded with 10 mL of 3.60 mg a.e.L^{-1} glyphosate. Sealed plates were incubated during 16 hours at 25 °C under continuous light. Controls suffered the same treatment but in the absence of glyphosate. The concentration of shikimate was measured according to the procedure of CROMARTIE and POLGE (2002). Shikimate accumulation was optically determined at 380 nm using a NanoDrop™ 2000 spectrophotometer. The calibration curve was established with non-treated leaves on solutions of known concentrations of shikimic acid. Analysis was conducted in triplicates.

2.4 **DNA and RNA isolation-**Genomic DNA was extracted from leaves from both resistant and susceptible to glyphosate *L. perenne* plants from all biotypes using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany). Three plants from each biotype were analysed independently. For each plant, a pool of three leaves was grinded with N_2 (liquid) and three subsamples of 100 mg were taken for DNA extraction. Total RNA was extracted from leaf sheaths from the same plants used for DNA extraction, using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) following the manufacturer recommendations. Purification was achieved

through the digestion with PerfeCta DNase I (Quanta, Beverly, MA), to eliminate completely any potential genomic DNA contamination. The resulting RNA was immediately stored at -80 °C until further use.

2.5 **cDNA synthesis and sequencing-**Total RNAs (120-200 ng) were reverse transcribed, in triplicates, with qScript One-Step RT-qPCR Kit (Quanta, Beverly, MA) according to manufacturer instructions. cDNAs were diluted to 20 ng/µL and then 10-fold diluted prior to be used on PCR. Amplifications were carried out, in triplicates, in 25 µL (final volume) containing 5 µL of diluted cDNA, 1x Master mix AccuStar (Quanta, Beverly, MA), 0.5 µL of each primer (10 µM). Reactions took place in a Techne Touchgene Gradient thermocycler (Staffordshire, UK) or in a PTC-100 MJResearch (BioRad, California, USA): 94 °C for 3.5 min followed by 35 cycles at 94 °C for 45 s , 57 °C for 45 s, and 72 °C for 1.5 min and a final extension at 72 °C for 8.5 min. PCR amplification products were separated and visualized on 1.5% (m/v) agarose gel prepared in SGTB buffer (GRISP, Porto, Portugal). As PCR conditions were optimized, only one fragment was obtained that was purified with Ilustra ExoProStar 1-Step kit (GE Healthcare Life Sciences, New York, USA) for further Sanger sequencing reactions. PCR products were directly sequenced in both directions with BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, ThermoScientific) in an automated Applied Biosystem 3100A sequencer. The primers used to generate the PCR products are "primer forward" (LP106F): 5′AGCTGTAGTCGTTGGCTGTG-3′ and "reverse" (LP106R): 5′GCCAAGAAATAGCTCGCACT-3′ [9]. The sequences were aligned with software BioEdit 7.0.4.1. Blast software at NCBI was used on order to identify the genomic sequence.

2.6 **Gene copy number estimation-**Estimation of *EPSPS* gene-copy amplification in genomic DNA extracted from leaves was achieved through relative quantitative real-time PCR. The amplification fold change was estimated by double delta Ct analysis using the cinnamoyl-CoA reductase (*CCR*; EC 1.2.1.44) gene as a reference assay as this is a single copy gene in the ryegrass genome (Larsen, 2004). Amplification efficiencies for both genes were determined to ensure identical cycling performance during real-time PCR being used on the efficiency corrected calculation model.

$$\text{Fold change} = \frac{[(E_{reference})^{Ct(resistant)}/(E_{target})^{Ct(resistant)}]}{[(E_{target})^{Ct(susceptible)}/(E_{reference})^{Ct(susceptible)}]}$$

Real-time PCRs run on CFX96 Touch™ Detection System (BioRad) using Maxima Sybr mastermix (TermoScientific). The PCR mix consisted of 300 ng of genomic DNA (5 µL), 0.5 µL of each primer (10 µM) and 12.5 µL of Maxima Sybr™Green qPCR (2x) mastermix (ThermoScientific). MilliQ water was added to a final volume of 25 µL. The amplifications were performed using the following cycling programme: 50 °C for 2 min for activation of the enzyme Uracil-N-glycosylase (UNG) that degrades carryover dsDNA, 94 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 15 s at 94 °C and 1 min at 60 °C. Fluorescence acquisition was performed in the extension step. At the end, the temperature was increased from 65 °C to 90 °C, with increments of 0.5 °C every 5 s to determine the melting temperature of the fragment produced. A standard curve with four serial dilution points of each DNA was included to determine the efficiency of the amplification. All DNA were analysed in triplicate.

3 Results and Discussion

3.1 **Shikimate assay -**Susceptible plants tend to accumulate more shikimic acid than resistant plants after glyphosate application. In our study, the susceptible biotype (LS) accumulated more shikimic acid than the other two resistant biotypes (L4 and L12). Sixteen (16) hours after the treatment, the LS population accumulated 2.39 times more shikimate than the L12 biotype, but no significant difference were found in relation to the L4 (1.03). There was greater accumulation of shikimate in the L4 population than in L12, indicating that resistance levels are not the same in all resistant populations (KOGER *et al.,* 2005). The rate of accumulation is variable through the time. In other studies, it was observed that at 24 and 48 hours after the treatment, resistant and susceptible plants were not distinguishable. However, after 72 hours, the susceptible biotype began to accumulate more shikimic acid (WAKELIN & PRESTON, 2006; GONZÁLEZ-TORRALVA *et al*., 2014) In this study, the differentiation between the biotypes L12 and LS started very early. It was possible to detect clear differences after 16 hours. No measurements were done after longer periods. However, it would be expected an increase in the accumulation of shikimate in the LS plants becoming then more distant from the L4 biotype. In the absence of values for the shikimic acid accumulation after longer periods and because target site mutations usually only confer 2- to 3-fold glyphosate resistance in several weeds (KOGER *et al*., 2005) which is coincident with the value detected for the L12 biotype, it was expected to have target-site mutations in our resistant biotypes. Therefore, *EPSPS* cDNA sequence analysis was conducted.

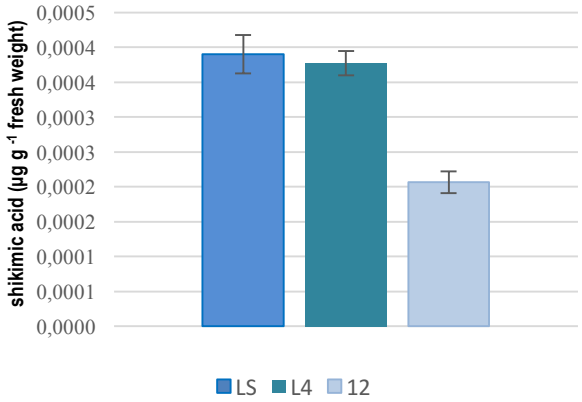


Figure 1. Shikimic acid accumulation of three populations of *Lolium perenne* after 16 h exposure to 3.6 mg a.e.L^{-1}glyphosate

3.2 cDNA of the *EPSPS* gene sequencing

The sequences obtained for both the susceptible (Figure 2) and resistant biotypes were aligned with the known *EPSPS* sequence of *Lolium multiflorum* (DQ153168.2) and *Lolium rigidum* (AF349754.1) using the BLAST for nucleotides (NCBI 2019). The results showed a high homology and no mutations on the DNA triplets for the amino acids Pro-106 (blue boxes) and Tre-102 (orange boxes).

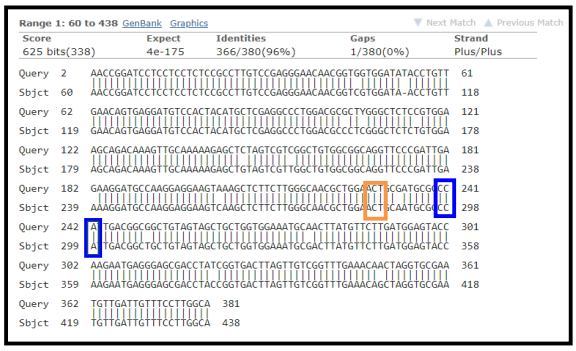


Figure 2 - alignment of the consensus sequence obtained using the primers LP106 for the susceptible population of *L. perenne* with the sequence of *L. multiflorum* (DQ153168.2). The sequence obtained covers the region of Tre-102 (orange box) and Pro-106 (blue box). Similar results were obtained with the GR *L. perenne* populations (L4 and L12)

It was concluded that the Tre-102 and Pro-106 mutations are not governing the confirmed resistance in the L4 and L12 biotypes. This finding had already been reported in other studies with *L. perenne* also including populations from the Douro region (MORENO *et al.,* 2017). In addition, very few reports on *Lolium* species show direct correlation between mutated *EPSPS* genotypes and resistant phenotypes (WAKELIN & PRESTON, 2006; GONZÁLEZ-TORRALVA *et al*., 2014; MORENO *et al*., 2017).

3.3 Gene copy number

Because no mutation was detected and lower accumulation of shikimic acid was measured, our results indicated that the EPSPS enzyme was still functioning. Therefore, an increase in the *EPSPS* gene copy number or on its expression in resistant biotypes relative to susceptible plants was expected. Gene copy number was estimated and varied between 1.5 and 2-fold for the L4 and L12 biotypes, respectively. These values are in line with the observations made. The resistant plants with the lowest relative *EPSPS* gene copy accumulated more shikimate than the plants with higher copy number.

4 Conclusion

The genome of resistant plants contain 1.5-2 fold more copies of the *EPSPS* gene that the genome of susceptible plants. The occurrence of gene amplification as an herbicide resistance mechanism in a naturally occurring weed population was still not known in the Portuguese populations of *L. perenne*. However, the estimated variation is too small to justify the levels of resistance observed. Therefore, quantitative real time-PCR on cDNA to determine the *EPSPS* expression and also the M10 and M11 translocators is still under study. As *EPSPS* expression was already positively correlated with genomic EPSPS relative copy number (GAINES *et al.,* 2010) we expect to detect weak overexpression of the EPSPS gene.

References

BONNY S (2016) Genetically Modified Herbicide-Tolerant Crops, Weeds, and Herbicides: Overview and *Impact. Environmental Management* 57, 31–48.

CALHA IM *et a.l* (2013) Distribution and characterization of glyphosate resistance in perennial crops in Portugal. *Proc*. CROMARTIE TH & POLGE ND (2002) Method of detecting shikimic acid. United States Patent 6482654. Available at: *http://patft.uspto.gov/* (last accessed 26 September 2018).

DELYE C *et al*. (2013) Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics* 29 (11): 649 -658

20th Symposium EWRS, 24-28 Jul, Samsun, Turkey.

DOMINGOS D (2014) Contribuição para o estudo dos mecanismos de resistência ao glifosato em *Conyza canadensis. Dissertação de Mestrado*. ISA/ULisboa.

DUKE S & POWLES S (2008) Glyphosate: a once-in-a-century herbicide, *Pest Manag Sci*. 64(4):319-25.

GAINES *et al*. (2010). Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *PNAS*. 107 (3): 1029–1034

GONZÁLEZ-TORRALVA F *et al* (2012). Target site mutation and reduced translocation are present in a glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* Lam. biotype from Spain. *Plant Physiol. Biochem*. 58, 16–22

GONZÁLEZ-TORRALVA F *et al*. (2014). First evidence for a target site mutation in the EPSPS2 gene in glyphosate-resistant Sumatran fleabane from citrus orchards. *Agronomy for Sustainable Development*, 34 (2):553-560.

HEAP I (2019) International survey on herbicide resistant weeds http://www.weedscience.org [Accessed: 27-May-2019]

KOGER C *et al.* (2005) Assessment of two nondestructive assays for detecting glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*), *Weed Science*, 53 (5): 559-566.

LI J *et al* (2018) A novel EPSPS Thr-102-Ser substitution endows glyphosate resistance in *Tridax procumbens, J Agric Food Chem*. 66(30):7880-7888.

MCDOUGALL P (2018). *Evolution of the Crop Protection Industry since 1960*. Agribusiness Informa November 2018. 20 pp. https://croplife-r9qnrxt3qxgjra4.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/2018/11/Phillips-McDougall-Evolution-of-theCrop-Protection-Industry-since-1960-FINAL.pdf, [Accessed: 24-May-2019].

MORENO P *et al* 2017, Differential Resistance Mechanisms to Glyphosate Result in Fitness Cost for *Lolium perenne* and *Lolium multiflorum*, *Front Plant Sci*. 8: 1796.

NCBI (2019). Basic Local Alignment Search Tool http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/ [Accessed: 20-June-2019]

NOL N *et al.* (2012). Shikimate leaf disc assay for early detection of glyphosate resistance in Conyza canadensis and relative transcript levels of EPSPS and ABC transporter genes. *Weed Research* 52, 233–241

SALAS R, DAYAN F, PAN Z *et al.* (2012) EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. *multiflorum*) from Arkansas, *Pest Manag Sci*.68(9):1223-30.

WAKELIN AM & PRESTON C (2006) A target-site mutation is present in a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population. *Weed Research* 46, 432–440

YANNICCARI M *et al* (2017) Mechanism of Resistance Glyphosate in *Lolium perenne* from Argentina. *Front. Ecol. Evol. 5:123.*

Resistencia al glifosato en *Lolium perenne* de viñedos del Duero

Resumen: Se han identificado poblaciones de *Lolium pere*nne resistentes al glifosato (GR) en los viñedos del Duero, en el norte de Portugal, cuyos mecanismos de resistencia aún no se han dilucidado por completo. Por lo tanto, estudiamos la resistencia de estos dos biotipos en condiciones de invernadero y laboratorio. El objetivo de este estudio fue confirmar si la resistencia del sitio de acción (TSR) podría explicar las diferencias entre los biotipos de *L. perenne* sensibles y resistentes. Para confirmar esta hipótesis, se realizó un ensayo de shiquimato con discos de hojas, secuenciación del gen 5-enolpiruvil shiquimato 3-fosfato sintasa (EPSPS) y la estimación de su número de copias. Después de exponerse al glifosato, la población de GR mostró una menor acumulación de shiquimato en comparación con una población susceptible de referencia. La secuenciación de ADNc que codifica la enzima EPSPS reveló que las mutaciones puntuales más frecuentes [Pro106Ser / Thr / Gly / Cys / Ala / Ile / Val / Met / Leu] no estaban presentes. La estimación del número relativo de copias del gen *EPSPS*, por medio de PCR cuantitativa en tiempo real y valor de ΔΔCt, reveló una amplificación doble del gen *EPSPS*. La sobreexpresión del gen *EPSPS* contribuyó como mecanismo de resistencia al glifosato. Otros estudios sobre la translocación de glifosato están en curso.

Palabras Clave - resistencia, non del sitio de acción (NTSR), EPSPS, shiquimato, PCR en Tiempo Real

Estimación de las ocasiones favorables para realizar tratamientos herbicidas en cereales de invierno empleando datos meteorológicos. Aplicación en Aragón

SOLANO A, AIBAR J[1]

[1]Escuela Politécnica Superior. Universidad de Zaragoza. Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural. Instituto agroalimentario de Aragón (IA2). Universidad de Zaragoza.
jaibar@unizar.es

Resumen: Se ha constatado la dificultad que entraña la realización de los tratamientos con herbicidas en los cereales de invierno en las fechas óptimas de aplicación, ya que es necesario que coincida el momento fenológico adecuado del cereal y de la flora arvense con unas condiciones meteorológicas apropiadas. Se han estudiado una serie de datos meteorológicos del periodo 1 diciembre – 31 de mayo (2003-2017), tomados en ocho estaciones ubicadas en las tres comarcas de Aragón más productivas de cereal de invierno, la Hoya de Huesca, Los Monegros y Cinco Villas, y se les ha sometido a una serie de criterios limitantes en relación con tres tipos de herbicidas a aplicar. Los herbicidas de contacto son los que presentan un mayor número de ocasiones favorables para realizar los tratamientos. En segundo lugar, se encuentran los herbicidas residuales, y por último, los herbicidas hormonales con un menor número de ocasiones favorables a tratar. Las principales causas meteorológicas que hubieran impedido la aplicación en el resto de los días, han sido el viento excesivo y las heladas inmediatamente antes o después del tratamiento. La falta de humedad en el suelo dificulta frecuentemente la acción de los herbicidas residuales. Los resultados indican que los agricultores de cereal se ven obligados frecuentemente a tratar con herbicidas en condiciones adversas, con riesgos de obtener poca eficacia y de contaminar el medio.

Palabras clave: Herbicidas hormonales, herbicidas residuales, herbicidas de contacto

1. Introducción

En España la superficie estimada de cultivo de cereales de paja (trigo, cebada, centeno, avena y triticale) fue de 5,6 millones de hectáreas en el año 2016, de las cuales la comunidad autónoma de Aragón posee un 15% (MAPAMA, 2017). Dentro de los diferentes inputs empleados en agricultura se utilizaron en torno a 15.586 toneladas de herbicidas en la península en el año 2015.

El éxito en el control de las plagas, enfermedades y malas hierbas depende tanto del producto elegido, como de las condiciones meteorológicas en el momento de aplicación, así como de la técnica de pulverización (Llop y Gil, 2017). También será importante controlar la deriva y exposición a la pulverización de los márgenes de los campos para mantener su hábitat (Carlsen et al., 2006) y limitar los riesgos de las aplicaciones fitosanitarias mediante la técnica de pulverización (Planas, 2001).

Los problemas causados por herbicidas aplicados en estados fenológicos del cultivo inadecuados, son relativamente frecuentes, estos accidentes se producen a veces por un error en la apreciación del agricultor sobre la fenología del cultivo o por obviar totalmente las recomendaciones sobre el momento de aplicación, sobre todo en el caso de cultivos herbáceos. A veces parte de estos problemas están influenciados, indirectamente, por condiciones climatológicas adversas (vientos, lluvias o heladas) que pueden obligar a retrasar excesivamente los tratamientos. En otros casos, la disponibilidad de tiempo o de la maquinaria necesaria por parte del agricultor tienen esa misma consecuencia (Monserrat, 1994).

La eficacia de los herbicidas se ve afectada por las condiciones ambientales antes, durante y después de la aplicación de herbicidas. Entre estos factores, están los siguientes: insolación, temperatura, humedad del aire, precipitaciones y viento entre otros (Villarías, 2015).

El viento es uno de los mayores inconvenientes para lograr una buena aplicación ya que, además de impedir un reparto homogéneo de las gotas de caldo, estas gotas pueden ser trasportadas a los campos vecinos y provocar daños si los cultivos son sensibles al herbicida empleado (efecto deriva) o contaminaciones en acequias, canales de riego o en fincas de agricultura ecológica (Aibar y Zaragoza, 1987; Gil et al., 2008; Zivan et al., 2016).

A pesar de que suelen ser frecuentes los problemas derivados de la aplicación de herbicidas en condiciones meteorológicas poco idóneas (baja eficacia, problemas de deriva, fitotoxicidad en el cultivo…) la legislación española solo contempla una normativa sobre el empleo de herbicidas en el caso de productos hormonales (Orden de 8 de octubre de 1973, B.O.E. de 17 de octubre) en la que, además de indicar las distancias mínimas a las que se deben encontrar los cultivos sensibles, se especifica que la velocidad del viento no puede superar los 5,4 Km/h y la temperatura ha de ser menor de 25ºC en el momento de tratamiento. Las condiciones meteorológicas en el momento de aplicación no están reguladas para el resto de productos herbicidas en ninguna normativa específica y ocasionalmente es la casa comercial la que indica alguna limitación o recomendación (Aibar y Zaragoza, 1987).

En este trabajo se plantean conocer, al menos teóricamente, las posibilidades de realizar tratamientos herbicidas efectivos teniendo en cuenta las condiciones meteorológicas en Aragón, con la idea de poder ayudar a las empresas que aplican estos productos y a los agricultores que emplean personalmente los mismos en su toma de decisiones, a la hora de comprar equipos, de contratar mano de obra temporal, etc..

2. Material y Métodos

Para la realización del presente estudio, se partió de los datos meteorológicos diarios de una serie de 14 años (2003-2017) de ocho estaciones meteorológicas ubicadas en las tres zonas más importantes de producción de cereal de invierno en Aragón, como son la Hoya de Huesca (Huesca y Gurrea de Gállego), Los Monegros (Sariñena, Grañén y Valfarta) y Cinco Villas (Luna, Ejea de los Caballeros y Sádaba) referenciadas en la Tabla 1, tomados en sus respectivas estaciones, a través del SIAR (Sistema de Información Agroclimática para el Regadío, 2017), cuyas localizaciones son las siguientes:

Tabla 1. Estaciones meteorológicas

Estaciones meteorológicas	Latitud	Longitud	Altura sobre el nivel del mar (m)
Hoya de Huesca			
Huesca	42° 5' 4" N	0° 19' 32"	469
Gurrea de Gállego	42° 0' 45" N	0° 45' 42" O	344
Los Monegros			
Sariñena	41° 47' 57" N	0° 9' 39" O	267
Grañén	41° 56' 30" N	0° 22' 10" O	321
Valfarta	41° 33' 27" N	0° 7' 58" O	412
Cinco Villas			
Ejea de los Caballeros	42° 7' 16" N	1° 8' 23" O	326
Luna	42° 10' 8" N	0° 55' 48" O	460
Sádaba	42° 16' 52" N	1° 16' 20" O	435

Los datos que se han tomado para su posterior elaboración han sido temperaturas: medidas en ºC de las máximas, mínimas y medias **diarias**, la pluviometría: medida en mm a lo largo de un **día** civil y la velocidad del viento: medida en Km/h, tomando la **media diaria**. Los datos se toman entre el 1 de diciembre y el 31 de mayo ya que entre esas fechas se sitúan casi todos los tratamientos herbicidas en los cereales de invierno en Aragón, prescindiendo de los aplicados en pre-emergencia del cultivo.

Criterios seguidos para la determinación de días favorable: Se establecieron, además de los criterios que marca la Orden Ministerial de 8 de octubre de 1973 que regula las condiciones ambientales requeridas para la aplicación de productos hormonales, otras condiciones obtenidas de diferentes estudios, y de folletos informativos de diferentes

casas comerciales, los criterios aplicados son coincidentes con los empleados por Aibar y Zaragoza en 1987 y se expresan en la Tabla 2. Estos criterios pueden afectar al éxito de un tratamiento herbicida, como son la velocidad del viento, la ausencia de lluvias en días anteriores al tratamiento, la presencia de lluvias en días posteriores al mismo, fenómenos de heladas o de temperaturas elevadas… etc.

Tabla 2. Criterios adoptados como condicionantes meteorológicos al realizar tratamientos (Aibar y Zaragoza, 1987)

	Tipo de herbicida		
Criterio	**Hormonal**	**Contacto**	**Residual**
Temperatura media	> 7ºC	-	-
Temperatura máxima	< 25ºC	-	-
Sin heladas el día de tratamiento y días anterior y posterior	Sí	Sí	Sí
Precipitación en el día del tratamiento	< 1 mm	< 1 mm	< 5 mm
Precipitación en el día anterior a tratamiento	< 10 mm	< 10 mm	< 10 mm
Precipitación dos días antes del tratamiento	< 15 mm	< 15 mm	< 15 mm
Necesidad de precipitación en dos días anteriores o posteriores al tratamiento	-	-	Sí
Velocidad máxima del viento al tratar	< 5,4 Km/h	< 12 Km/h	< 12 Km/h

*El criterio de "Necesidad de precipitación en dos días anteriores o posteriores al tratamiento" será denominado como "Período seco".

Con las restricciones anteriores a la hora de realizar eficazmente el tratamiento se procesaron los datos meteorológicos diarios de los cuales se obtuvieron las medias y desviación típica para cada una de las ocho localidades objeto del trabajo.

3. Resultados y Discusión

En la figura 1 se muestra, por localidades y tipos de herbicidas el número de ocasiones favorables para realizar esos tratamientos atendiendo a las restricciones meteorológicas expuestas anteriormente, que concuerdan con las condiciones exigibles para hacer un tratamiento herbicida eficaz y seguro.

Los tratamientos con herbicidas hormonales son los que menos ocasiones favorables presentan, especialmente en Luna y Valfarta, con apenas 10 días propicios por campaña para realizar tratamientos con esos productos de forma correcta, hecho motivado por la frecuente presencia de días ventosos, que dificulta cumplir con la OM que regula las condiciones meteorológicas para este tipo herbicidas.

En el caso de los herbicidas residuales, la limitación más frecuente es por la ausencia de humedad en el suelo, lo cual limitaría su eficacia. Los herbicidas de contacto son los que presentan un mayor número de ocasiones favorables para tratar, debido a que no poseen limitaciones tan estrictas como los hormonales en cuanto al viento o los residuales por el período seco.

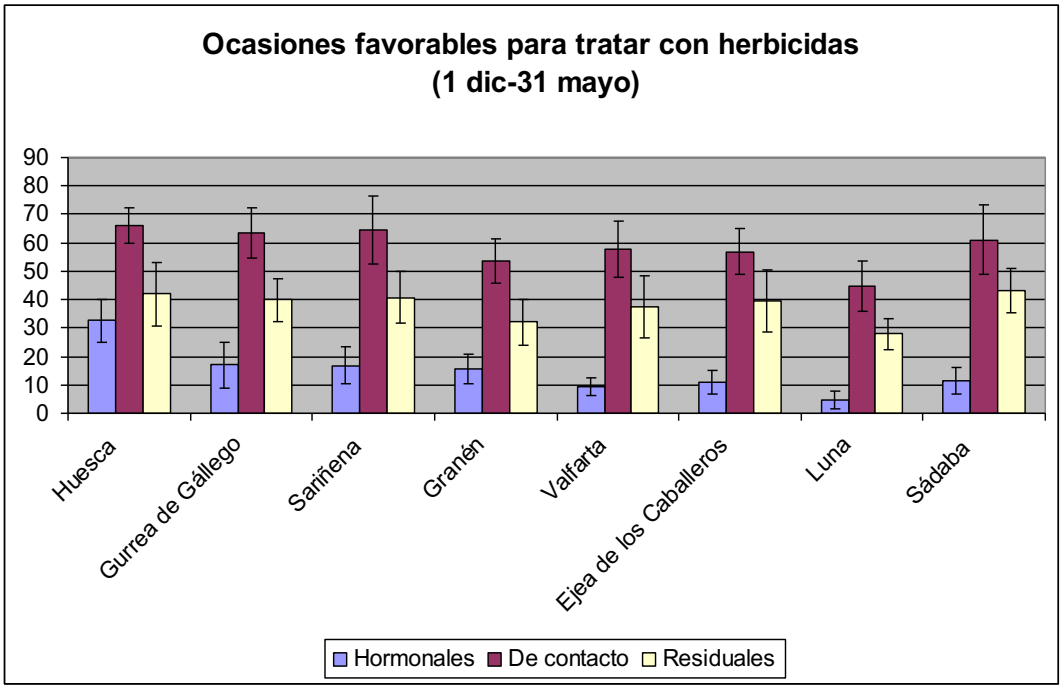


Figura 1. Número de ocasiones (días) favorables para tratar con herbicidas (Eje Y) entre el 1 diciembre y el 31 de mayo en las diferentes comarcas estudiadas (Eje X)-

Los resultados son coincidentes con trabajos realizados en lugares con condiciones meteorológicas similares, y se demuestra la dificultad de la aplicación correcta de los herbicidas en cereales de invierno con métodos convencionales, teniendo en cuenta que las ocasiones favorables desde el punto de vista meteorológico deben coincidir con los estados fenológicos óptimos tanto del cultivo como de las malas hierbas.

4.- Bibliografía

AIBAR J, ZARAGOZA C (1987). Estimación de las ocasiones favorables para realizar tratamientos herbicidas en cereales empleando datos meteorológicos. *ITEA*, 71, 41-54.

CARLSEN S, SPLIID N, SVENSMARK B (2006). Drift of 10 herbicides after tractor spray application. *Primary drift* (droplet drift). Volumen 64, Número 5 ,julio de 2006, páginas 778-786

GIL Y, SINFORT C, GUILLAUME S, BRUNET Y, PALAGOS B (2008). Influence of micrometeorological factors on pesticide loss to the air during vine spraying: Data analysis with statistical and fuzzy inference models. *Biosystems Engineering* Vol 100, Issue 2, 184-197.

KUDSK P, KRISTENSEN JL (1992). Effect of environmental factors on herbicide performance. In *Proceedings of the First International Weed Control Congress*. Victoria, Australia: Weed Science Society of Victoria. Vol. 1, 173-186.

LLOP J, GIL E (2017). Calibración: la clave para un uso eficiente de los fitosanitarios. *Agricultura*, 1009, 690-696.

MAPAMA. (2017). Encuesta sobre Superficies y Rendimientos Cultivos (ESYRCE).

MONSERRAT A (1994). Daños de herbicidas en los cultivos: sus causas y síntomas. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.86 pág.

PLANAS S (2001). Prevención de la deriva en los tratamientos fitosanitarios. *Vida Rural*, 123, 54-57.

SIAR (2017). http://eportal.mapama.gob.es. Recuperado el 5 de Noviembre de 2017.

VILLARÍAS JL (2015). Gestión integrada del control de las malas hierbas en los cultivos. Madrid, España: Ediciones Agrotécnicas, S. L. 916 pág.

ZIVAN O, SEGAL-ROSENHEIMER M, DUBOWSKI Y (2016). Airborne Organophosphate Pesticides Drift in Mediterranean climate: The Importance of Secondary Drift. *Atmospheric Environment.* Vol 127, 155-162.

Estimation of favorable occasions to carry out herbicide treatments in winter cereals using meteorological data. Application in Aragon

Summary: The difficulty of carrying out the treatments with herbicides in the winter cereals at the optimum dates of application has been confirmed, since it is necessary to coincide the phenological moment of the cereal and of the arable flora with suitable meteorological conditions. A series of meteorological data from the period 1 December - 31 May (2003-2017), taken at eight stations located in the three most productive districts of winter cereal in Aragon, La Hoya de Huesca, Los Monegros and Cinco Villas, have been studied, and they have been subjected to a series of limiting criteria in relation to three types of herbicides to apply. The contact herbicides were the ones that presented a greater number of favorable occasions to carry out the treatments. Secondly, the residual herbicides were found, and finally, hormonal herbicides with fewer favorable occasions to treat. The main meteorological causes that prevented the application in the rest of the days, were the excessive wind and the frosts immediately before or after the treatment. The lack of moisture in the soil often made the action of residual herbicides difficult. The results indicated that cereal farmers are frequently forced to deal with herbicides in adverse conditions, with risks of low efficiency and contaminating the environment

Keywords: Hormonal herbicides, residual herbicides, contact herbicides

Resistencia a inhibidores de ALS en una población española de *Echinochloa cruss-galli* de un campo de maíz

TORRA J[1]*, MONTULL JM[1], ROYO-ESNAL A[1], TABERNER A[1], SALAS M[2]

[1] Agrotecnio, Universitat de Lleida, Lleida, SPAIN.
joel@hbj.udl.cat*, josemontull@hbj.udl.cat, aritz@hbj.udl.cat, tabernerl@hbj.udl.cat
[2] Corteva Agriscience™, Agriculture Division of DowDuPont™, Saint Quentin Yvelines, FRANCE.
maria.salas@corteva.com

Resumen: Los herbicidas inhibidores de la enzima acetolactato sintasa (ALS) son ampliamente usados en España para el control de gramíneas en el cultivo del maíz en post-emergencia. El monocultivo y su uso recurrente ha resultado en la evolución de varias poblaciones de *Echinochloa crus-galli* resistentes a este modo de acción. Hasta la fecha, solo un mecanismo de resistencia ligado al lugar de acción, la sustitución del triplete Pro-197-Ser ha sido citada como responsable de la resistencia a estos herbicidas en España. Se estudió una población de *E. crus-galli* potencialmente resistente a nicosulfuron-metil de la provincia de Lleida. Se secuenciaron las posiciones del gen ALS 197 y la 574. De esta manera se estimó la frecuencia inicial de plantas resistentes. Después de secuenciar 245 plantas en esas posiciones, el 28% de ellas eran heterocigóticas para la sustitución Trp-574-Leu, y el 72% restante sin modificaciones. Después de secuenciar más de 500 plantas en diversos muestreos, ninguna planta mostró una alteración del gen ALS en la posición 197. Los experimentos de dosis-respuesta en invernadero confirmarían la baja frecuencia de plantas resistentes en la población, con factores de resistencia alrededor de dos tanto para nicosulfurón como imazamox. Es la primera vez que se cita la sustitución Trp-574-Leu en esta especie en una población de un campo de maíz español.

Palabras clave: ligado al sitio de acción, mecanismo de resistencia, mutación, nicosulfurón, posición 574, Trp-574-Leu

1. Introducción

Echinochloa crus-galli (L.) P. Beauv. (mijera o pata de gallo) es una de las malas hierbas gramíneas más problemáticas en los cultivos extensivos de regadío (maíz sobretodo) del mundo y de la Península Ibérica. Su capacidad de persistencia e infestación se debe a su alta fecundidad (hasta 400.000 semillas por planta), competencia y cuantiosos bancos de semillas (Holm et al., 1977; Norris et al., 1992). *E. crus-galli* es la segunda especie en el ranking mundial de malas hierbas con capacidad

para desarrollar resistencias a más modos de acción herbicidas diferentes (Heap, 2019). Desde el año 2000, la resistencia a herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS), una enzima clave en la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada, se ha detectado en varios países europeos en el cultivo del maíz, como Italia, España, Austria, Francia, República Checa y Alemania (Heap, 2019). Para el caso particular de España, en 2015 se reportaron quejas de fallos de control de *E. crus-galli* en maíz con herbicidas inhibidores de la ALS. En posteriores análisis preliminares se confirmó en dos poblaciones que el mecanismo de resistencia era ligado al sitio de acción, como consecuencia de la sustitución del aminoácido Prolina por una Serina en la posición 197 de la proteína de la ALS (Heap, 2019).

En este estudio se ha caracterizado la resistencia a herbicidas inhibidores de la ALS (nicosulfuron-metil e imazamox) de una de las dos poblaciones referidas anteriormente mediante experimentos de curvas dosis-respuesta, y se secuenció el gen de la ALS en las posiciones 197 y 574 para establecer la frecuencia de plantas resistentes en la población de campo.

2. Material y Métodos

2.1. Material vegetal. En septiembre de 2018 se cogieron semillas de al menos 50 plantas escogidas el azar realizando un transecto en zigzag de una parcela de maíz, ubicada en la localidad de Torres de Segre (Lleida). Previamente se había reportado la falta de control con inhibidores de la ALS sobre la población de *E. crus-galli*. Anteriormente, en agosto de 2017, se habían recolectado semillas de una población de *E. crus-galli* en los márgenes de un camino de la ciudad de Lleida, que nunca había recibido herbicidas, y que fue utilizada como estándar sensible.

2.2. Caracterización del biotipo de E. crus-galli. Posteriormente, las semillas se pusieron a germinar conjuntamente con el estándar sensible en bandejas de aluminio con turba comercial y fueron ubicadas en un invernadero durante dos semanas. Se trasplantaron cuatro plántulas por maceta (7x7x7 cm) rellenada con una mezcla de arena y turba (3:1). En el estadio de 2-3 hojas, las plantas del biotipo estudiado fueron tratadas con nicosulfurón-metil (Victus OD, DuPont, 4%) a 160, 80, 40, 20, 10 y 0 g m.a. ha^{-1}, y con imazamox (Pulsar 40, BASF, 4%) a 200, 100, 50, 25, 12.5 y 0 g m.a. ha^{-1}. El biotipo sensible fue tratado a 40, 20, 10, 5, 2.5 y 0 g m.a. ha^{-1} de nicosulfurón-metil, y 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 y 0 g m.a. ha^{-1} de imazamox. Se incluyeron un total de cuatro repeticiones para cada dosis. Los herbicidas se aplicaron utilizando un pulverizador de precisión de mesa a 200 l ha^{-1}, a una presión de 215 kPa. Cuatro semanas después de los tratamientos, se recogió la parte aérea de las plantas y se estimó para cada biotipo el peso fresco y el porcentaje de reducción de peso seco de las plantas tratadas respecto a los testigos no tratados, así como la supervivencia.

2.3. Secuenciación del gen ALS. Para evaluar la frecuencia de plantas resistentes a herbicidas inhibidores de la ALS (nicosulfurón), se realizaron dos muestreos: el primeo en abril (antes de la siembra del maíz) de 2018 (96 plantas), y el segundo en julio de 2018 (149 plantas). En cada muestreo se cogieron un pequeño fragmento de hoja por planta. El DNA fue extraído de las muestras, su concentración medida con un espectrofotómetro y se guardaron a -20ºC hasta su uso.

Las mutaciones en las posiciones Pro-197 y Trp-574 del gen de la ALS fueron analizadas en todas las muestras. Los fragmentos del gen que incluían las regiones con estos dos codones fueron amplificados con cebadores específicos. Los productos de la

amplificación por PCR fueron separados en un gel de agarosa. Los geles se observaron bajo luz UV (320 nm), y se tomaron imágenes con un gel de fotografía. Los fragmentos de ADN amplificados fueron purificados con un kit específico i posteriormente secuenciados. Los análisis de restricción se realizaron para definir dobles picos detectados en los cromatogramas de la secuenciación. Las bandas obtenidas en la electroforesis se visualizaron bajo luz UV. El perfil de digestión se comparó con su respectivo perfil no digerido y un control susceptible, para inferir los haplotipos de las muestras.

Para determinar el frecuencia de plantas resistentes en cada uno de los dos muestreos, se calculó el porcentaje de plantas con mutaciones en algunas de las dos posiciones, ya fueran homocigóticas o heterocigóticas, del total de plantas muestreadas.

2.4. Análisis estadístico. Los datos del experimento de dosis respuestas fueron analizados usando un modelo de regresión no lineal con el programa Sigmaplot 11.0. La dosis de herbicida que causa el 50% de reducción (*X*50) de crecimiento en peso fresco (*RC*50) o de supervivencia (*LD*50) de las plantas fue calculada usando una curva logística de cuatro de parámetros del tipo:

$$y = \mathrm{c} + \frac{(d - c)}{1 + \mathrm{EXP}[b(\log(x) - \log(X50)]}$$

donde *c* es el límite inferior (fijado a 0), *d* es el límite superior (fijado a 100), *X50* la dosis de herbicida para reducir el crecimiento o supervivencia un 50% y *b* la pendiente en la *X50*. En esta ecuación, la dosis herbicida (g m.a. ha^{-1}) era la variable independiente (*x*) y el peso fresco (porcentaje de reducción del control no tratado para cada población) o supervivencia eran la variable dependiente (*y*). Posteriormente se calculó el factor de resistencia (FR) para los dos herbicidas como la proporción de las *X*50 entre el biotipo resistente y el sensible.

3. Resultados y Discusión

3.1. Caracterización del biotipo de E. crus-galli

En los estudios de curvas dosis-respuesta se obtuvieron unos FR bajos tanto para el nicosulfurón como el imazamox (< 2.6). Para el supervivencia, los FR fueron de 1,7 y 1.6, para cada herbicida, respectivamente; para el reducción de peso fresco los FR fueron algo superiores, de 1.8 y 2.6, respectivamente (Figura 1 y Tabla 1).

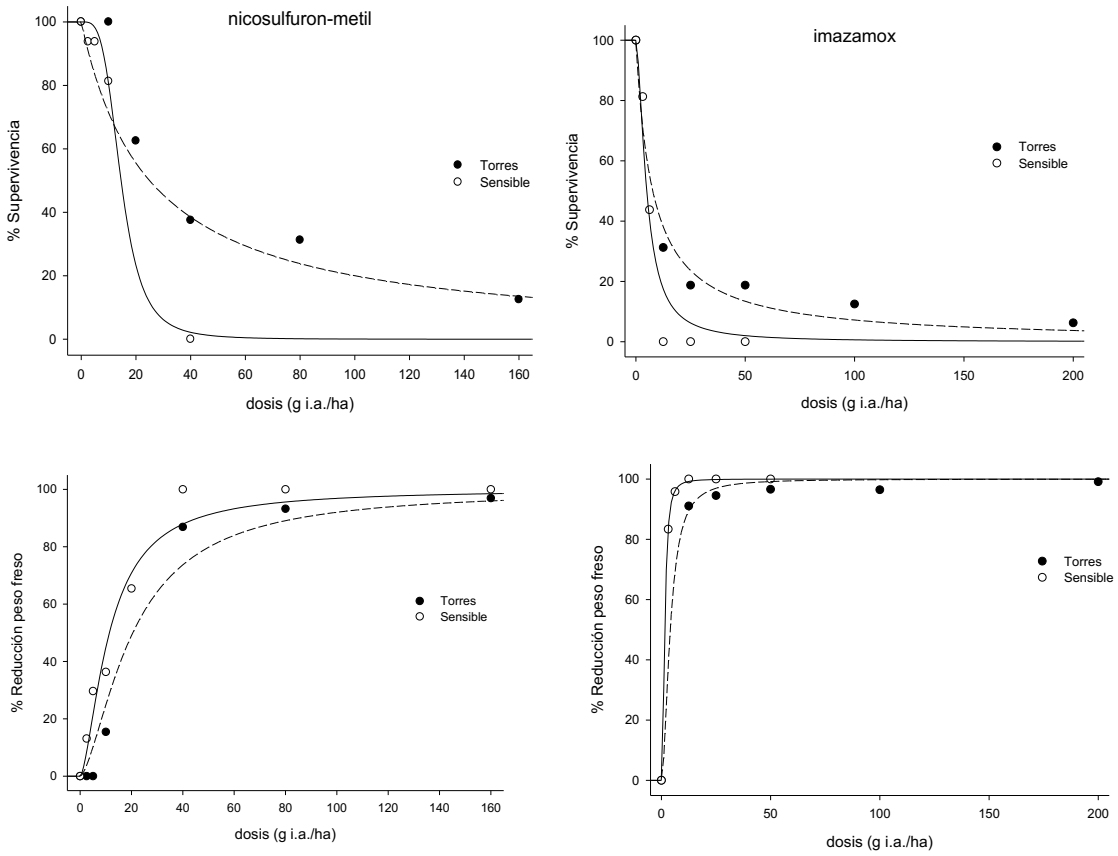


Figura 1. Curvas de regresión del experimento de dosis-respuesta de una población resistente (Torres) y una sensible a inhibidores de la ALS (nicosulfurón a la izquierda; imazamox a la derecha) de Echinochloa crus-galli. Los datos son expresados en porcentaje de supervivencia (gráficos superiores) o de reducción del peso fresco respecto al testigo no tratado (gráficos inferiores).

Tabla 1. Efecto de los herbicidas nicosulfurón-metil y imazamox en la supervivencia y reducción del peso fresco (respecto a control no tratado) para dos poblaciones de Echinochloa crus-galli: DL50 y RC50 en g m.a. ha^{-1}*, b (pendiente), y factor de resistencia (FR).*

Supervivencia	**Población**	***DL*50**	***b***	**FR**
Nicosulfuron	Torres	25.0	-1.0	1.7
	Sensible	14.6	-3.8	-
Imazamox	Torres	7.7	-1.0	1.6
	Sensible	5.0	-1.7	-
Peso fresco	**Población**	***RC*50**	***b***	**FR**
Nicosulfuron	Torres	20.5	8.9	1.8
	Sensible	11.4	1.6	-
Imazamox	Torres	4.1	1.9	2.6
	Sensible	1.6	2.3	-

Los valores obtenidos de *DL*50 para el nicosulfurón (14 a 25 g m.a. ha^{-1}) y el imazamox (5 a 8 g m.a. ha^{-1}), y de *RC*50, 11 a 20 g ha^{-1} y de 2 a 4 g m.a. ha^{-1}, respectivamente, están en el rango obtenido para la especie en estudios previos (Panozzo et al., 2017; Panozzo et al., 2013).

3.2. Frecuencia de plantas resistentes a inhibidores de la ALS

Del total de plantas secuenciadas entre los dos muestreos (245), algunas de ellas presentaron una alteración en el gen de la ALS. De estas, todas resultaron ser heterocigóticas para la posición 574 del gen, con una substitución del aminoácido triptófano por una leucina (Trp-574-Leu). No se detectó ninguna mutación en la posición Prolina 197, como se había descrito en trabajos previos (Heap, 2019). En el primer muestreo el 20% de las plantas secuenciadas resultaron ser resistentes y heterocigóticas (Trp-574-Leu), mientras que en el segundo muestreo el porcentaje fue del 40%.

Estos resultados indican que la población no es totalmente resistente ni mucho menos, y que se encuentra en un estadio inicial del desarrollo de la resistencia. Los bajos FR obtenidos en el experimento de dosis-respuesta apoyarían en cierta medida esta tesis. Aun teniendo en cuenta los valores bajos de los FR, fruto de la baja frecuencia de plantas resistentes en la población, los datos parecen indicar que habría cierta resistencia cruzada entre las sulfonilureas y las imidazolinonas en esta población de *E. crus-galli*. Estudios previos han constatado la resistencia cruzada a todas las familias de inhibidores de la ALS en esta especie fruto de la mutación Trp-574-Leu (Panozzo et al., 2013).

4. Conclusiones

Los datos de este estudio confirman la presencia de una población de *Echinochloa crus-galli* con cierto grado de resistencia a los inhibidores de la ALS en el cultivo del maíz. Es la primera vez que se describe la mutación Trp-574-Leu en la especie en España en este cultivo.

5. Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por la empresa DuPont de Nemours SA (Corteva Agrscience™, Agriculture Division of DowDuPont™).

Referencias

HEAP I (2019). The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponible en: http://weedscience.org/ [accedido 16 de Mayo de 2019].

HOLM LG, PLUCKNETT DL, PANCHO JV & HERBERGER JP (1977). "*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. Poaceae, grass family," in The World's Worst Weeds: Distribution and Biology (Honolulu, HI: University of Hawaii Press), 32–40.

NORRIS RF (1992). Relationship between inflorescence size and seed production in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). *Weed Science* **40**, 74–78.

PANOZZO S, SCARABEL L, ROSAN V & SATTIN M (2017). A New Ala-122-Asn Amino Acid Change Confers Decreased Fitness to ALS-Resistant *Echinochloa crus-galli*. Frontiers in Plant Science 8:2042.

PANOZZO S, SCARABEL L, TRANEL PJ & SATTIN M (2013). Target-site resistance to ALS inhibitors in the polyploid species *Echinochloa crus-galli*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **105**, 93-101.

Resistance to ALS inhibitors in a Spanish population of *Echinochloa crus-galli* from a corn field

Summary: Acetolactate synthase (ALS) inhibiting herbicides are widely used in Spain for grass weeds control in post-emergence in maize crops. Maize monoculture and their repeated use have resulted in the evolution of several *Echinochloa crus-galli* populations resistant to this mode of action. Up-to-date, only one target-site resistance mechanism, a Proline by Serine amino acid substitution in position 197 of the ALS protein, has been reported as responsible for the resistance to these herbicides in Spain. Here, a putative *E. crus-galli* population resistant to nicosulfuron-methyl from Lleida province was studied. Positions 197 and 574 of the ALS gene were sequenced, aiming to establish the frequency of resistant plants within the field population. After sequencing 245 plants in these two positions, 28% of them were all heterozygous for the substitution Trp-574-Leu, which represents an estimation of the frequency of resistant plants. After sequencing more than 500 plants in different samplings, no plant showed an ALS gene alteration in the position 197. Greenhouse dose-response experiments would further confirm the low frequency of resistant plants within the population, with resistant factors around two for nicosulfuron and imazamox. This study represents the first report in Spain of the amino acid substitution Trp-574-Leu in this species in an ALS inhibitors resistant population from a corn field.

Keywords: Mutation, nicosulfuron-methyl, position 574, resistance mechanism, target-site resistance, Trp-574-Leu.

Resistencias *Target site* en una población de *Amaranthus palmeri* con resistencia múltiple a Glifosato y a Piritiobac-Na.

BARCO-ANTOÑANZAS M, ZULET-GONZÁLEZ A, GIL-MONREAL M, ROYUELA M, ZABALZA A.

Instituto Multidisciplinar de Biología Aplicada (IMAB), Universidad Pública de Navarra, Pamplona, SPAIN
maria.barco@unavarra.es

Resumen: *Amaranthus palmeri* es una de las malas hierbas que más problemas causan en los cultivos debido, entre sus características biológicas, a que es capaz de desarrollar resistencias múltiples a distintas familias de herbicidas. En este estudio se ha caracterizado y valorado el nivel de resistencia de una población con resistencia múltiple al glifosato y a piritiobac-Na (inhibidor de la ALS) comparándolo con una población sensible. Todos los individuos analizados de la población con resistencia múltiple fueron resistentes al glifosato, y el mecanismo de resistencia estaba basado en la diana (*target-site, TS),* específicamente por amplificación génica de la enzima *EPSPS.* El número de copias génicas se correlacionó con una baja acumulación de siquimato tras ser tratadas con glifosato. La resistencia a piritiobac-Na no fue tan homogénea, y se detectó en el 77% de los individuos analizados. El mecanismo de resistencia fue también *TS*, provocado por hasta 4 mutaciones puntuales del gen que codifica para la enzima *ALS* en las posiciones: Ser653, Ala122, Trp574 y Gly654. Se detectaron individuos con mutaciones dobles y simples, lo cual estuvo correlacionado con el nivel de la resistencia al inhibidor de la ALS, siendo mucho más elevado en el caso de las mutaciones dobles.

Palabras clave: resistencia múltiple, glifosato, piritiobac sódico, *Amaranthus palmeri*, *ALS*, mutación.

1. Introducción

Amaranthus palmeri S. Watson (Amaranthaceae), especie C4, anual, dioica, es una mala hierba nativa de EEUU muy problemática para los cultivos debido a su elevada capacidad competitiva, rápido crecimiento, alta fecundidad, alta variabilidad genética y por su capacidad de desarrollar resistencias múltiples a distintas familias de herbicidas (Heap, 2019). Estas resistencias están causadas por la enorme presión de selección que se ejerce sobre estas poblaciones de malas hierbas con el uso continuado de herbicidas con el mismo mecanismo de acción. Uno de los casos más comunes de resistencia múltiple en esta especie es la resistencia al glifosato y a los inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS).

El glifosato es un herbicida no selectivo y sistémico que inhibe la enzima 5-enol-piruvato-siquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) en la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Powles and Yu, 2010). En esta especie, se han descrito poblaciones con el mecanismo de resistencia al glifosato por modificación de la diana (*target site, TS)* específicamente por amplificación génica del gen *EPSPS* (Gaines et al., 2010). Por otra parte, el herbicida piritiobac-Na es un inhibidor de la ALS que participa en la vía de biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada. En el caso de las poblaciones de *A. palmeri* resistentes a inhibidores de ALS, los mecanismos de resistencia pueden ser muy diversos, aunque el más frecuente también es *TS* y suele deberse a mutaciones

puntuales en el gen *ALS* que resultan en un enzima menos sensible a la unión con estos herbicidas (Tuesca et al., 2016).

Dada la tendencia de *A. palmeri* a adquirir resistencia a varios mecanismos de acción, es de gran relevancia conocerlos y caracterizarlos para poder establecer prácticas sostenibles en el manejo de malas hierbas. Por todo ello, los objetivos de este trabajo fueron caracterizar y valorar el nivel de resistencia de diversos individuos de una población que presentando resistencia a glifosato por sobreexpresión de la diana, también presentan resistencia a piritiobac-Na por mecanismo desconocido.

2. Material y Métodos

2.1 Material vegetal y tratamientos

Las semillas del biotipo AR-R (con resistencia múltiple) y las del biotipo NC-S (sensibles) fueron proporcionadas por el Dr. Gaines (Colorado State University, Fort Collins, CO, USA). Las plantas fueron crecidas en cultivo hidropónico puro con aireación forzada en condiciones controladas como en Fernández-Escalada et al. (2016). Cuando las plántulas contaban con aproximadamente 20 días y un aspecto uniforme se aplicaron los siguientes tres tratamientos en cada una de las dos poblaciones: glifosato (G) a la dosis recomendada para el control de *A. palmeri* en campo (0,84 kg ha^{-1}, Culpepper et al., 2006), piritiobac-Na (P) a la dosis recomendada en campo (89 g ai/ha, Wise et al., 2009), y la aplicación conjunta (G+P), aplicando primero el glifosato y después el piritiobac-Na para evitar interacciones químicas entre los compuestos herbicidas en el caldo de aplicación. Un grupo de plantas fue dejado como control (C) sin tratar. Las plantas fueron muestreadas tres días después del tratamiento con herbicidas, para que fuese un tiempo suficientemente largo para poder ver los efectos del tratamiento sobre los parámetros fisiológicos sin que las plantas lleguen a la letalidad o se recuperasen. Se recolectaron las hojas, tomando réplicas de 0,1 g en viales y después fueron congeladas a -80ºC.

2.2 Determinación del contenido en siquimato

Se determinó el contenido en siquimato según Fernández-Escalada et al. (2016). Para ello se congelaron dos discos de hoja (cuatro mm de diámetro) de las hojas más jóvenes de cada individuo en el momento del muestreo y posteriormente se determinó el siquimato espectrofotométricamente.

2.3 Determinación del número de copias del gen EPSPS y secuenciación del gen ALS

La extracción de DNA genómico se realizó como Fernández-Escalada et al. (2016). Para cuantificar el número de copias del gen *EPSPS* se empleó la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) tomando como referencia el gen *CPS* según Gaines et al. (2010) y Fernández-Escalada et al. (2016). Se realizó el estudio de la secuencia de la *ALS*, amplificando los fragmentos de interés mediante PCR y secuenciándolos tras su purificación. Los *primers* utilizados para tal fin fueron diseñados a partir de la secuencia de la *ALS* de número de accesión KT833339 del Genbank (*A. palmeri*) utilizando el programa PRIMER 3 PLUS (Romano et al., datos no publicados).

2.4 Ensayo ALS *in vitro*

Se prepararon los extractos enzimáticos a partir de 1 g de hojas congeladas de las dos poblaciones AR-R y NC-S. Se determinó la actividad de la ALS *in vitro* (Gaston et al., 2002) tras su incubación con diferentes concentraciones del piritiobac-Na para la determinación de la concentración de herbicida que inhibía la actividad un 50 % (I_{50}).

3. Resultados y Discusión

3.1 Resistencia a Glifosato: Número de copias del gen EPSPS y contenido en siquimato

Se determinó el número de copias génicas de los individuos de la población con resistencia múltiple (AR-R) comparándolo con el número de copias de los individuos de la población sensible (NC-S). Los individuos de la población NC-S mostraron una media de 0,64 copias del gen *EPSPS* relativas al gen referencia *CPS* y los individuos de la población AR-R mostraron valores superiores a 30 con una media de 57 copias (Figura 1.A). Esta sobreexpresión del gen *EPSPS* observada, es el mecanismo de resistencia *target-site* al glifosato más habitual en *A. palmeri,* descrito por primera vez en 2010 (Gaines et al., 2010) y corroborado en todos los individuos de la población AR-R evaluados en este trabajo.

Se seleccionaron individuos de ambas poblaciones y se dividieron en cuatro grupos para realizar los tratamientos: glifosato (G), piritiobac-Na (P) y la mezcla de ambos herbicidas (G+P). En todos estos individuos (tanto sensibles como resistentes), se analizó el contenido en siquimato a los tres días de tratamiento (Figura 1B).

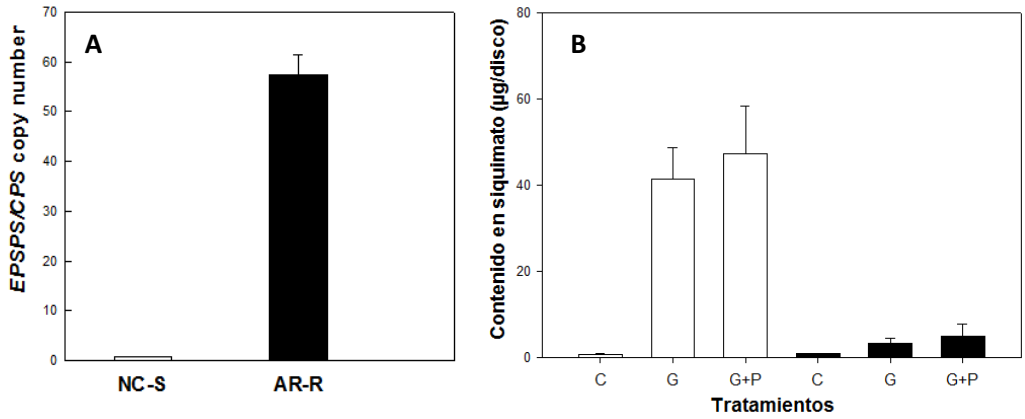


Figura 1. Caracterización de la resistencia a glifosato en los individuos de la población AR-R (representada en negro) y NC-S (representada en blanco). **A**. Número de copias del gen *EPSPS* relativo al gen *CPS* en la población sensible (NC-S) y en la población con resistencia múltiple (AR-R) (n=15-17). **B.** Contenido en siquimato (µg/disco) en plantas de la población sensible (NC-S) y resistente múltiple (AR-R) sin tratar (control, C) o tratadas con glifosato (G) o con la mezcla de ambos herbicidas (Glifosato y piritiobac-Na; G+P) tres días después de aplicar los tratamientos (n= 4-6).

Después del tratamiento con glifosato o de su mezcla con piritiobac-Na, el siquimato se acumuló en plantas sensibles (Figura 1.B). La acumulación de siquimato provocada por glifosato fue mínima en los individuos de la población resistente, confirmando con ello su resistencia y tal y como había sido descrito anteriormente en *A. palmeri* (Gaines et al., 2010; Fernández-Escalada et al., 2016).

Se estableció una correlación entre el número de copias y el contenido de siquimato entre los individuos de ambas poblaciones tratados con glifosato o la mezcla de herbicidas, como se muestra gráficamente en la Figura 2. El elevado número de copias del gen *EPSPS* se correlacionó con una concentración baja de siquimato en los individuos de la población AR-R tratadas con glifosato. Por el contrario, en los individuos de la población NC-S, que presentaron una única copia relativa del gen *EPSPS*, se detectó una alta acumulación del contenido de siquimato tras el tratamiento con glifosato (Figura 2).

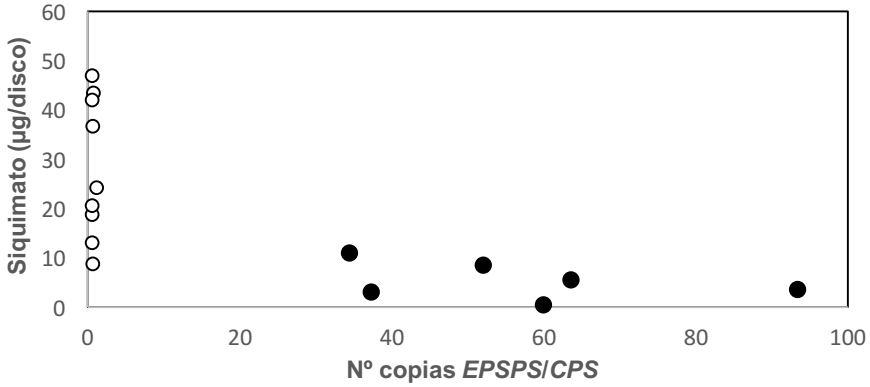


Figura 2. Relación entre el número de copias génicas del gen *EPSPS* y el contenido de siquimato de cada planta al tercer día del tratamiento con glifosato. Símbolos negros: individuos de la población con resistencia múltiple (AR-R). Símbolos blancos: individuos de la población sensible (NC-S).

3.2 Resistencia a piritiobac-Na (inhibidor de la ALS)

3.2.1 Número de copias del gen ALS

Se analizó el número de copias del gen *ALS* en los individuos de la población resistente, para comprobar si el mecanismo de resistencia a inhibidores de ALS era debido a la sobreexpresión del gen. Los resultados (no mostrados) revelaron que todos los individuos presentaron tan solo una copia relativa del gen *ALS,* igual que en la población sensible, descartándose por ello la amplificación génica del gen *ALS* como mecanismo de resistencia, tal y como ha sido descrito en otras poblaciones de *A. palmeri* (Larran et al., 2017).

3.2.2 Secuenciación del gen ALS

El mecanismo de resistencia más habitual a inhibidores de ALS es el mecanismo *TS* por modificación de la diana, por lo que se evaluó la presencia de posibles mutaciones en los individuos de la población AR-R. La secuenciación del gen *ALS* determinó que cuatro individuos no presentaron mutaciones (23 %) mientras que en los demás individuos se detectaron mutaciones localizadas en cuatro aminoácidos: Gly654, Ser653, Ala122 y Trp574. En la Figura 3, se muestra la importancia de cada una ellas respecto al total de individuos analizados. La modificación más abundante fue la modificación a nivel del Trp574, y las menos abundantes las Gly654 y Ala122.

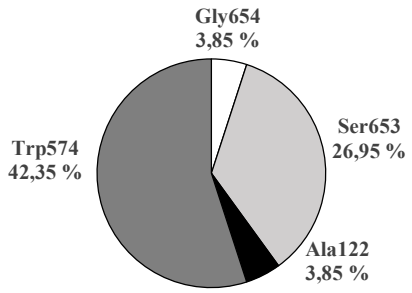


Fig. 3. Relevancia relativa de cada tipo de mutación en el gen *ALS* por sustituciones en residuos de aminoácidos respecto al total encontrado (n= 17).

Todas estas mutaciones ya habían sido relacionadas con la resistencia a las distintas familias químicas de inhibidores de ALS. En concreto, habían sido descritas para la familia de pirimidinilbenzoatos (Heap, 2019). La resistencia conferida por las mutaciones Ser653, Ala122 y Trp574 ya estaba descrita en *A. palmeri* (Molin et al., 2016; Larran et al., 2017) pero la mutación Gly654 se describe por primera en el presente estudio en esta especie.

3.2.3 Actividad ALS *in vitro*

Se realizó un estudio de la inhibición de la actividad ALS *in vitro* para determinar el nivel de resistencia e intentar correlacionarlo con las mutaciones presentes en el individuo. Se seleccionaron dos individuos con una mutación simple a nivel de la Ser653, otros dos con mutación doble a nivel de la Ser653 y Trp574 y un individuo que no presentó mutaciones, para confirmar una falta de resistencia. Se obtuvieron valores del I_{50} (μM) y del factor de resistencia (RF) en comparación con el I_{50} que se determinó como media de dos individuos analizados de la población sensible (0,0925 μM) (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad ALS y mutaciones en el gen *ALS.* Se expresa la actividad ALS *in vitro* como valor I_{50} (concentración de herbicida requerida para causar el 50% de la reducción de la actividad ALS). Los factores de resistencia (FR) de la población AR-R se calcularon respecto al I_{50} medio de las plantas de la población NC-S.

Individuo	Población	Mutación Simple/doble	Mutaciones	I_{50} (μM)	FR
1	NC-S	-	No presenta	0,099	-
2	NC-S	-	No presenta	0,086	-
3	AR-R	-	No presenta	0,110	1,2
1	AR-R	Simple	Ser653	0,480	5,2
6	AR-R		Ser653	1,100	11,9
7	AR-R	Doble	Ser653 y Trp574	69,400	>500
2	AR-R		Ser653 y Trp574	17.782,79	>1.000

Los individuos con dos mutaciones (Ser653 y Trp574) mostraron valores del RF mucho más elevados que los individuos con sólo una mutación. El individuo de la población AR-R que no presentaba mutación, no mostró resistencia, confirmándose las mutaciones como el mecanismo de resistencia a inhibidores de la ALS en esta población. En general, la elevada resistencia del sitio diana a los herbicidas inhibidores de ALS indica la presencia de una o más mutaciones puntuales que resultan en sustituciones de aminoácidos en la (s) región (es) conservada (s) de la secuencia de *ALS* en la población resistente.

4. Agradecimientos

M B-A y A Z-G y son beneficiarias de una beca predoctoral de la UPNA. Proyecto financiado con el proyecto AGL2016-77531-R. Agradecemos la colaboración de Yolanda Romano por su asistencia técnica y al CICYTEX (Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura) por todas las facilidades para dicho estudio.

5. Referencias

CULPEPPER AS, GREY WK, VENCILL JM *et al.* (2006) Glyphosate-resistance Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) confirmed in Georgia. *Weed Science* **54**, 620-626.

FERNÁNDEZ-ESCALADA M, GIL-MONREAL M, ZABALZA A & ROYUELA M (2016) Characterization of the *Amaranthus palmeri* physiological response to glyphosate in susceptible and resistant populations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **64**, 95-106.

GAINES TA, ZHANG W, WANG D *et al.* (2010) Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 1029-1034.

GASTON S, ZABALZA A, GONZÁLEZ EM, ARRESE-IGOR C, APARICIO-TEJO PM & ROYUELA M (2002) Imazethapyr, an inhibitor of the branched-chain amino acid biosynthesis, induces aerobic fermentation in pea plants. *Physiology Plantarum* **114,** 524–532.

HEAP I (2019). The international Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Available at: www.weedscience.org (last accessed 28 April 2019)

LARRAN AS, PALMIERI VE, PEROTTI VE *et al.* (2017) Target-site resistance to acetolactate synthase (ALS)-inhibiting herbicides in *Amaranthus palmeri* from Argentina. *Pest Management Science* **73**, 2578–2584.

MOLIN WT, NANDULA VK, WRIGHT AA & BOND JA (2016) Transfer and expression of *ALS* inhibitor resistance from Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) to an *A. spinosus* × *A. palmeri* hybrid. *Weed Science* **64**, 240 - 247.

POWLES SB & YU Q (2010) Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 317-347.

TUESCA D, PAPA JC & MORICHETTI S (2016) *Amaranthus palmeri* (S.) Watson. Bases para su manejo y control en sistemas de producción. *Manejo de malezas problema*, vol **6**. Ed. REM-AApresid.

WISE AM, TIMOTHY G, PROSTKO E, VENCILL W *&* WEBSTER T (2009) Establishing the geographical distribution and level of acetolactate synthase resistance in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) accessions in Georgia. *Weed Technology* **23**, 214-220.

Target site resistances in a population of *A. palmeri* with multiple resistance to Glyphosate and Pirithiobac-Na.

Summary: *Amaranthus palmeri* is one of the most problematic weeds to control in crops because, among its biological characteristics, it is able to develop multiple resistance to different families of herbicides. In this study, the resistance level of a population with multiple resistance to glyphosate and piritiobac-Na (ALS inhibitor) has been characterized and valued, comparing it with a sensitive population. All evaluated individuals from the multiple resistant population were resistant to glyphosate, and the resistance mechanism was based on the target (*target-site, TS*), specifically by gene amplification of the *EPSPS* enzyme. The gene copy number was correlated with a low shikimate accumulation after glyphosate treatment in the multiple resistant population. The resistance to piritiobac-Na was not so homogeneous, and it was detected in 77% of the individuals analyzed. The resistance mechanism was also *TS*, caused by four point mutations of the *ALS* gene in the positions: Ser653, Ala122, Trp574 and Gly654. Some individuals showed simple and some others double mutations, which was correlated with the level of resistance to the ALS inhibitor, being much higher in the case of double mutations.

Keywords: multiple resistance, glyphosate, piritiobac-Na, *Amaranthus palmeri*, *ALS,* mutation.

Norharmane, un alcaloide con potencial bioherbicida

LÓPEZ-GONZÁLEZ D, LEDO D, COSTAS-GIL A, GRAÑA E, REIGOSA MJ, SÁNCHEZ-MOREIRAS AM

Facultad de Biología, Universidad de Vigo, Campus Lagoas-Marcosende s/n, E-36310, Vigo, España.
davidlopez@uvigo.es

Resumen: El Norharmane (NOR) es un indol alcaloide que se puede encontrar en plantas superiores y cianobacterias como *Nostoc insulare*. El NOR posee actividad alguicida, antibacteriana y farmacológica. Se ha observado en estudios previos que plántulas de *Arabidopsis thaliana* mostraban efectos inhibitorios en el crecimiento radicular, fenómenos de torsión, así como formación de raíces laterales y adventicias. En este trabajo, plantas de *Arabidopsis* de 15 días fueron trasplantadas a perlita y pulverizadas o regadas con diferentes concentraciones de NOR (0-612 µM) cada 2 días durante 21 días y se determinaron diferentes parámetros asociados a la medida de fluorescencia de la clorofila *a*. Posteriormente, fueron cosechadas y se determinaron los potenciales hídrico y osmótico, el contenido en antocianinas y proteínas, la relación peso seco/peso fresco, el análisis colorimétrico de las hojas y la superficie foliar.

Palabras clave: compuesto natural, fluorescencia, malas hierbas

1. Introducción

En la agricultura actual, el manejo de las malas hierbas es una prioridad para obtener la mayor eficiencia a la hora de producir especies cultivables. La forma más rápida y sencilla de contener el problema es la utilización de herbicidas sintéticos, lo que puede provocar serias alteraciones en el medioambiente, y a menudo las malas hierbas son capaces de generar resistencias frente a los mismos. Por ello, buscar alternativas a estos herbicidas es cada vez más necesario. La búsqueda de compuestos naturales puede ser una de ellas, ya que presentan numerosas ventajas (Dayan y Duke, 2006): (1) son fácilmente modificables para que sean más selectivos en su modo de acción, (2) son *a priori* biodegredables, por lo que son más respetuosos con el medio ambiente y (3) presentan más dianas moleculares y, con ello, más modos de acción.

El norharmane (NOR) es un metabolito secundario de origen vegetal perteneciente al grupo de los alcaloides, que son un conjunto de metabolitos secundarios que comparten tres características comunes: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. Aparece con frecuencia en plantas de las familias Gramineae, Sapotaceae y Zygophyllaceae, y en organismos marinos como *Noctiluca miliaris* o cianobacterias como *Nodularia*

harveyana (Volk, 2006). Este compuesto posee actividad algicida, antibacteriana y anticianobacteriana (Sharma et al., 2010). También se pueden encontrar usos farmacológicos del NOR, como la inhibición de diversas enzimas (Robinson et al., 2003). Con todo, poco se sabe de sus efectos sobre el metabolismo de plantas superiores, por lo que el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto del norharmane sobre el crecimiento de plantas de la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, con el fin de profundizar en su modo de acción.

2. Material y Métodos

2.1 Crecimiento y tratamiento de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Semillas de *A. thaliana*, previamente esterilizadas en EtOH 50% durante 3 min y NaOCL al 0,5% con tritón al 0,01% durante otros 3 min, fueron lavadas 3 veces en agua destilada autoclavada. Las semillas se conservaron en agar al 0,1% a 4 ºC durante 48 h para permitir su vernalización y sincronización del proceso germinativo. Posteriormente se sembraron en placas Petri con agar al 0,8% suplementado con una mezcla de nutrientes (Murashige-Skoog, Sigma-Aldrich) suplementado con sacarosa al 1%, y se dejaron crecer a 22 ± 2 ºC, con un fotoperiodo de 8 h luz (120 μmol m^{-2} s^{-1}) y 16 h oscuridad a una humedad relativa del 55%. Transcurridos 15 d, se trasplantaron un total de 48 plantas en 8 maceteros de plástico (20x12x5 cm), con 6 macetas por macetero y 1 planta por maceta, haciendo un total de 6 réplicas por tratamiento. Se usó perlita como sustrato. Los maceteros fueron regados cada 2 d, durante 15 d, con solución de Hoagland al 50%. Pasado este tiempo se inició el tratamiento con 153, 306 y 612 μM de NOR (Sigma-Aldrich). Se emplearon como controles plantas sin tratar con NOR. Cuatro de los maceteros se usaron para el tratamiento de riego con NOR (3 maceteros/concentración NOR, 1 para el control), y los otros cuatro se emplearon para el tratamiento de pulverización con NOR (3 maceteros/concentración NOR, 1 para el control). Estos tratamientos duraron 21 d durante los cuales, las plantas tratadas mediante riego, eran regadas cada 2 d con la solución nutritiva y con el NOR a las concentraciones ensayadas, mientras que las tratadas mediante pulverización, eran pulverizadas con las diferentes soluciones de NOR todos los días y eran regadas con solución nutritiva cada 2 d.

2.2 Medida de fluorescencia de la clorofila *a*

La medida de fluorescencia de la clorofila *a* se monitorizó cada 2 d durante 21 d mediante el uso del fluorímetro Maxi-Imaging PAM Fluorescence System (Walz. Alemania), con el que se puede conocer el estado a nivel fotosintético de las plantas a través de la medición de los parámetros Y(II) (eficiencia del PSII: cantidad de luz que la planta transforma en energía química mediante la fotosíntesis); Y(NPQ) (*quenching* no fotoquímico: pérdida regulada de energía en forma de calor); Y(NO) (pérdida no regulada de energía en forma de fluorescencia); *Fv/Fm* (eficiencia máxima del PSII) y ETR (medición de la tasa de flujo electrónico). Previo a las mediciones, las plantas se dejaron en oscuridad durante 20 min para abrir todos los centros de reacción de los fotosistemas. Estos parámetros se monitorizaron durante 5 min y la exposición a pulsos de luz saturantes se realizó cada 20 s a una intensidad de 2700 μmol m^{-2} s^{-1}.

2.3 Medidas poscosecha

Tras 21 días de tratamiento, las plantas se cosecharon para realizar las siguientes medidas:

a) Potencial hídrico (Ψ_h) y osmótico (Ψ_s): en 3 plantas por tratamiento. El Ψ_h mediante la cámara de Scholander y el Ψ_s mediante el osmómetro Löser Type 6.
b) Contenido en antocianinas: según el método de Close et al. (2000).
c) Relación peso seco/peso fresco (PS/PF): se pesaron 3 plantas frescas por tratamiento (peso fresco) y se secaron 72 h en estufa a 70 ºC y se volvieron a pesar (peso seco).
d) Análisis colorimétrico y superficie foliar: se tomaron imágenes de 3 plantas completas por tratamiento y se analizaron con el software Image ProPlus (Media Cybernetics Inc., USA) para calcular el área foliar total, así como distinguir las distintas coloraciones observadas (áreas verdes, amarillentas o violáceas).

2.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados con el programa estadístico SPSS v15.0. Primero se realizó un análisis exploratorio de los datos mediante un diagrama de cajas para detectar *outliers*. A continuación, para comprobar la normalidad de los datos, se realizó una prueba de Kolmogorov-Smimov seguida de un Test de Levene para comprobar la homocedasticidad de los mismos. Si los datos eran homocedásticos se procedió a realizar un ANOVA con DMS (diferencias mínimas significativas), y si no lo eran se analizaron mediante la T2 de Tamhane. Los datos no normales fueron analizados mediante Kruskal-Wallis. En el análisis de datos se establecieron tres grados de significación representados por asteriscos. Un asterisco indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$), dos diferencias muy significativas ($p \leq 0,01$) y tres diferencias altamente significativas respecto al control ($p \leq 0,001$).

3. Resultados y Discusión

Se presentan los resultados obtenidos en los tratamientos donde el NOR fue regado, ya que en los tratamientos de pulverización no hubo diferencias significativas. Tras 21 d de tratamiento, las plantas regadas con NOR (Figura 1) presentaron un menor tamaño que las plantas control y mostraron en las hojas zonas pigmentadas de color violeta, que sugieren el acúmulo de antocianinas. Estos pigmentos suelen ser indicativos de estrés hídrico en plantas (Chalker-Scott, 1999). Estos efectos se acentuaron a medida que aumentaba la concentración. En altas concentraciones aparecieron síntomas de clorosis representados por zonas amarillentas en las hojas. La aparición conjunta de antocianinas y zonas cloróticas puede ser indicativa de carencias de nitrógeno (Taiz y Zeiger, 2006).

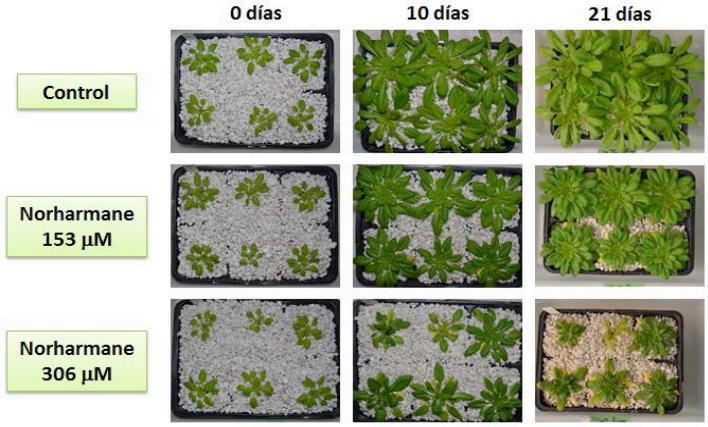


Figura 1: Plantas de *Arabidopsis thaliana* regadas durante 21 días con 0, 153 y 306 µM de norharmane.

Con respecto a la fluorescencia de la clorofila *a* (Figura 2), Y(II) presentó una bajada significativa a partir del día 15 de tratamiento a las concentraciones más altas ensayadas, lo que implica una bajada en la capacidad fotosintética global. En el caso de Y(NPQ) no hubo diferencias respecto al control a lo largo del ensayo, pero sí en el caso de Y(NO), que tuvo un aumento significativo ya a partir del día 5 de tratamiento, sobre todo a las concentraciones más altas. Este aumento es indicativo de que los mecanismos de disipación de energía de la planta son ineficientes, por lo que la planta está dañada o a punto de estarlo (Graña, 2013). En cuanto a ETR, el parámetro fue menor respecto al control en todas las concentraciones a lo largo de los 21 d de ensayo, por lo que la tasa de flujo electrónico es ineficiente, ya sea por una ralentización de la fase fotoquímica o por inhibición de la fase bioquímica (Graña, 2013).

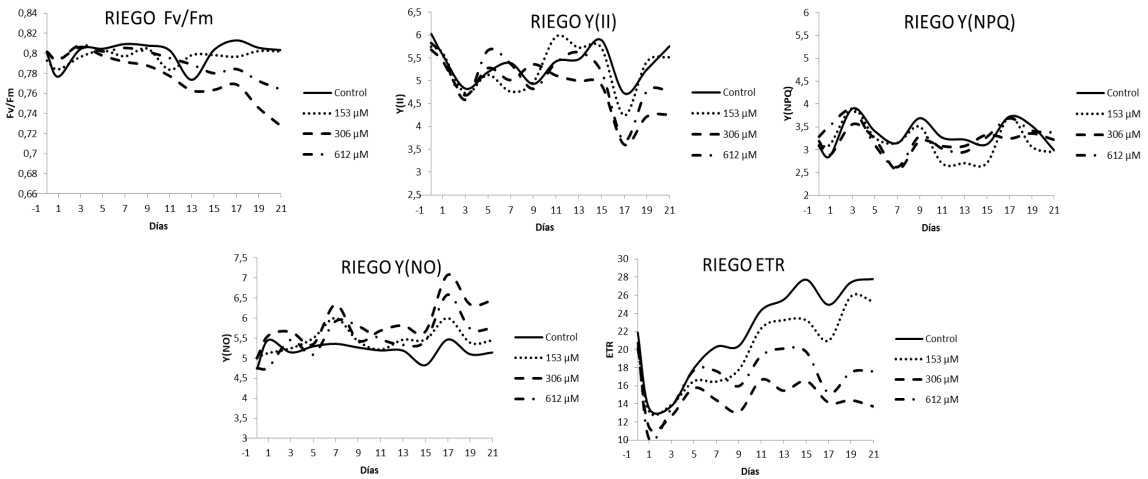


Figura 2: Parámetros Y(II), Y(NPQ), Y(NO), Fv/Fm y ETR durante 21 días de plantas de *Arabidopsis* regadas con NOR

En cuanto a las medidas poscosecha, se encontró un aumento de zonas cloróticas y violáceas (Figura 3A). La clorosis (zonas amarillas) está asociada con déficit hídrico y de macronutrientes (Martínez et al., 2009). En el caso de las violáceas, asociadas a la aparición de antocianinas, están relacionadas con la neutralización de radicales libres y a la disipación de energía, cuando los mecanismos normales son alterados (del Valle et al., 2005). El área foliar se vio disminuida en todos los tratamientos (Figura 3B), apoyando la teoría de que las plantas están sometidas a déficit hídrico y tratan de minimizar la

superficie de pérdida de agua (Valladares et al., 2004). El aumento del ratio peso seco/peso fresco (Figura 3C) en todas las concentraciones ensayadas, también apoya la presencia de estrés hídrico en las plantas. Dicho estrés se confirmó con la medida del potencial hídrico (Figura 3D), donde se vio reducido en las tres concentraciones ensayadas. Este déficit hídrico puede inhibir la tasa fotosintética y el crecimiento de las plantas. En cuanto al potencial osmótico (Figura 3E), se vio reducido en las concentraciones más altas ensayadas. Este valor es indicativo de la acumulación de solutos en el interior celular, muchas veces relacionado con alteraciones en el potencial hídrico (Taiz y Zeiger, 2006). En cuanto al contenido de antocianinas (Figura 3F), como ya se explicó, su aumento está relacionado con la neutralización de radicales libres y la disipación de energía cuando los sistemas habituales no están en funcionamiento debido a una situación de estrés (del Valle et al., 2005).

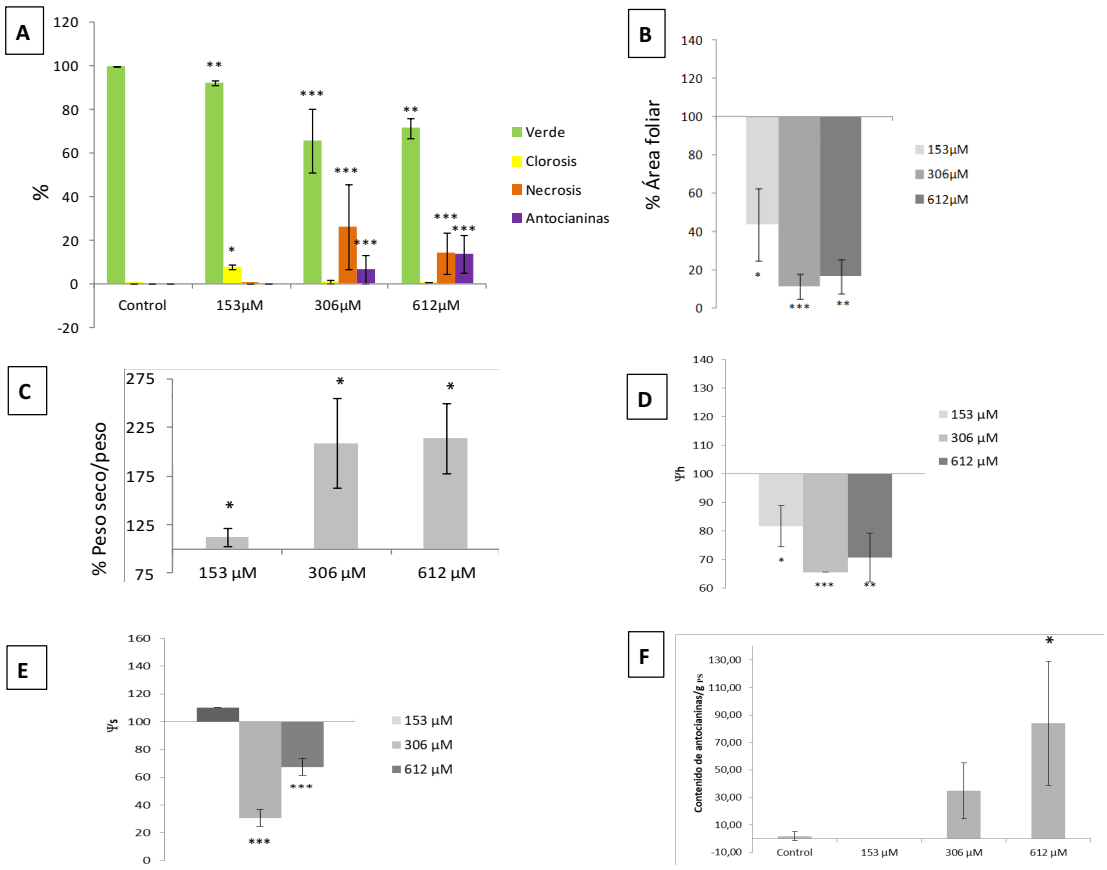


Figura 3: Medidas realizadas en el tratamiento de riego con NOR. A, distintas zonas foliares. B, área foliar total. C, peso seco/peso fresco. D, Potencial hídrico. E, Potencial osmótico. F Contenido en antocianinas. Las gráficas B,C,D y E muestran los datos en % con respecto al control. Donde * indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$), ** muy significativas ($p \leq 0,01$) y *** altamente significativas ($p \leq 0,001$).

Como conclusiones, podemos decir que el NOR es más efectivo cuando es aplicado mediante riego, haciendo que las plantas sufran una alteración de su estado hídrico, inhibiendo su crecimiento y provocando alteraciones en su aparato fotosintético.

Referencias

CHALKERR-SCOTT L (1999). Environmental Significance of anthocyanins in Plant Stress Responses. *Photochemistry and Photobiology* 70, 1-9.

CLOSE DC, BEADLE CL, BROWN PH, et al (2000). Cold-induced photoinhibition affects establishment of *Eucalyptus nitens* (Deane and Maiden) Maiden and *Eucalyptus globulus* Labill. *Trees* **15**, 32-41.

DAYAN FE & DUKE SO (2006). Clues in the search for new herbicides. In *Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications* (eds MJ REIGOSA, N PEDROL, L GONZÁLEZ) 63-83. Springer. The Netherlands.

DEL VALLE G, GONZÁLEZ A, BÁEZ R (2005). Antocianinas en uva (*Vitis vinífera* L.) y su relación con el color. *Revista Fitotecnia Mexicana* **28**, 359-368.

GRAÑA E, SOTELO T, DÍAZ-TIELAS C et al (2013) The phytotoxic potential of the terpenoid citral on seedlings and adult plants. *Weed Science* **61**, 469-481.

MARTÍNEZ FE, SARMIENTO J, FISCHER G, JIMÉNEZ F (2009). Síntomas de deficiencia de macronutrientes y boro en plantas de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Agronomía Colombiana* 27,169-178.

ROBINSON ESJ, ANDERSON NJ, CROSBY J, et al. (2003) Endogenous *b*-carbolines as clonidine-displacing substances. *Annals New York Academy of Sciences* **1009**, 157-166.

SHARMA KN, TIWARI PS, TRIPATHI K et al. (2010) Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): facts and challenges. *Journal of Applied Phycology* **23**, 1050-1081

TAIZ L & ZEIGER E (2006). *Fisiología Vegetal Vol. 1* (TAIZ L & ZEIGER E) Publicaciones de la Universitat Jaume I. Castelló de la Plana. España

VALLADARES F, VILAGROSA A, PEÑUELAS J (2004). Estrés hídrico: ecofisiología y escalas de la sequía. In *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante* (ed VALLADARES F). 163-190 Egraf,. Madrid. España.

VOLK RB (2006). Antialgal activity of several cyanobacterial exometabolites. *Journal of Apllied Phycology* 1**8**, 145-151.

Norharman, an alkaloid with bioherbicide potential

Summary: Norharmane (NOR) is an alkaloid indole from plants and cyanobacteria such as *Nostoc insulare*. This compound has algicidal, antibacterial and pharmacological activity. In previous studies, *Arabidopsis* roots showed inhibitory effects on root growth, torsion phenomena, and lateral and adventitious root formation after NOR treatment. In this work, *Arabidopsis* plants of 15 days were transplanted to perlite and sprayed or watered with different concentrations of NOR every two days for 21 days. Then, different parameters were determined related to the fluorescence of chlorophyll *a*. Later, plants were harvested and water and osmotic potentials, the content of anthocyanins and proteins, and dry weight/fresh weight ratio were determined, and colorimetric analysis of the leaves and leaf surface was carried out.

Keywords: natural compound, fluorescence, weeds

Estudio de la fitotoxicidad de diferentes herbicidas en el cultivo de la cebolla en siembra directa

GÓMEZ DE BARREDA FERRAZ D[1], MARTÍNEZ DESCALZO J[1], ROCHE TORRES A[1], DE LUCA FABRA V[1], VERDEGUER SANCHO M[2]

[1]Departamento de Producción Vegetal, Universitat Politècnica de València, Valencia, SPAIN.
diegode@btc.upv.es
[2]Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universitat Politècnica de València, Valencia, SPAIN.
merversa@doctor.upv.es

Resumen: La cebolla es un cultivo poco competitivo frente a las malas hierbas, sobre todo cuando se práctica la siembra directa en régimen intensivo donde las adventicias se desarrollan más rápidamente que el cultivo. En la huerta de la ciudad de Valencia, se ha detectado ya desde hace años, que la mala hierba *Coronopus didymus* (L.) Sm., se ha adaptado perfectamente a la siembra directa de la cebolla siendo muy difícil su control químico con las materias activas autorizadas. El objetivo de esta experimentación fue testar tanto en invernadero como en campo, el nivel de fitotoxicidad de diferentes productos herbicidas sobre el cultivo. Los herbicidas testados fueron: etofumesato a 3 dosis, bromoxinil, bromoxinil + oxifluorfen a 2 dosis y un extracto natural de *Thymus capitatus* (L) Hoffmanns & Link, en pre y postemergencia temprana de la cebolla. Se concluye que la aplicación de etofumesato en preemergencia de la cebolla a una dosis de 0,5 kg de ma ha^{-1} y las aplicaciones en postemergencia temprana de la cebolla de la mezcla de oxifluorfen + bromoxinil a 6 + 9 y a 9 + 14 g de ma ha^{-1}, y del extracto natural, no resultan fitotóxicas, aunque el control de las malas hierbas no es aceptable en algunos casos.

Palabras clave: Control químico, dosis bajas, *Coronopus didymus*, herbicidas naturales

1. Introducción

En España, el cultivo de la cebolla (*Allium cepa* L.) ocupó en 2017 casi 24.797 ha, de las que un 97% se cultivan en regadío (MAPA, 2019). Es uno de los cultivos hortícolas más importantes en España siendo Valencia una de las provincias más productoras. La cebolla es poco competitiva frente a las malas hierbas debido a los siguientes factores: lenta implantación cuando se practica la siembra directa, crecimiento lento y escasa envergadura durante todo su ciclo, por lo que el control de las malas hierbas es fundamental. El control selectivo de las malas hierbas en cebolla se basa en una aplicación temprana con un herbicida en preemergencia o postemergencia temprana de

las malas hierbas con algunas de las siguientes materias activas: aclonifen, bromoxinil, clorprofam, isoxaben, pendimetalina y piridato, con la posibilidad de realizar un tratamiento en postemergencia tardía de las mismas ya avanzado el cultivo, pudiendo ser con algún herbicida inhibidor de la ACCasa en caso de malas hierbas gramíneas. El control químico en preemergencia cuando se realiza siembra directa es crítico, no solo por su importancia para dar ventaja a la cebolla frente a las malas hierbas sino por la alta selectividad que ha de tener. Con las herramientas químicas autorizadas hoy en día para la cebolla, se consiguen estos objetivos. Sin embargo, en los últimos años, hay una mala hierba que está proliferando en la zona hortícola de la provincia de Valencia, *Coronopus didymus* (L.) Sm. que tiene un ciclo similar al de la cebolla temprana que se cultiva en esta zona, de septiembre a febrero incluidos. *C. didymus* tolera los tratamientos herbicidas autorizados en cebolla, por lo que se ha convertido en un problema emergente. Una forma de control alternativa podría ser el uso de compuestos naturales como el aceite esencial de *Thymus capitatus* (L) Hoffmanns & Link, que ha mostrado efectos fitotóxicos sobre la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de diversas especies *in vitro* y en condiciones de invernadero (Dudai *et al*., 1999). El objetivo de esta experimentación es comprobar sobre la cebolla en siembra directa, el grado de fitotoxicidad de algunas materias activas herbicidas, de mezclas de éstas y de un producto natural, no autorizados en este cultivo a día de hoy y que pudieran controlar la mala hierba *C. didymus*.

2. Material y Métodos

Se realizaron dos experimentos, uno en invernadero y otro en campo, en las instalaciones de la Universidad Politécnica de Valencia. En ambas localizaciones, se hicieron aplicaciones herbicidas en pre- y postemergencia de cebolla, variedad *Spring Star*, con lo que hubo 4 ensayos diferentes. Para el ensayo en invernadero se emplearon macetas de 7x7x7 cm con suelo de textura arenosa (91,3%) y pH 8,4. Se sembraron 10 semillas por maceta en preemergencia mientras que para el de postemergencia se seleccionó una única plántula tras la emergencia de las sembradas. El diseño experimental para ambos ensayos en invernadero fue de bloques al azar completamente aleatorizados con cuatro repeticiones. Para el experimento en campo, se emplearon parcelas elementales de 2 m^2 (2x1m) donde se sembraron las cebollas a una dosis de 3 g/m^2, siendo el diseño experimental de bloques al azar con tres repeticiones. Los tratamientos herbicidas (Tabla 1) se realizaron el mismo día de la siembra en el caso del ensayo en preemergencia, mientras que en postemergencia se realizó entre los estados fenológicos BBCH 011 y 012 (Bleiholder *et al.* 1996) correspondientes con los estados de gancho y látigo (cotiledón verde con forma de gancho y látigo), que se alcanzaron a los 13 días desde la siembra en invernadero y a los 25 días en campo. Los tratamientos herbicidas se realizaron empleando un equipo que impulsa la solución herbicida con CO_2 a 3 bar de presión y a través de una boquilla de abanico Teejet 9504 EVS. En invernadero (preemergencia), se evaluó el número de cebollas emergidas 21 días después del tratamiento (DDT), y el peso de las plántulas 41 DDT. En el ensayo de postemergencia se evaluó el grado de fitotoxicidad ejercida sobre las plántulas,

empleando una escala visual subjetiva del 1 al 9 donde un 1 significa que no hay fitotoxicidad, 5 supone un 50% de la plántula seca y un 9 es un 100% de plántula muerta, y el peso seco 41 DDT. En campo, en el ensayo de preemergencia se evaluó el número de plántulas de cebolla emergidas 21 y 41 DDT, el peso seco de las plántulas 46 DDT y el nivel de infestación de malas hierbas 72 DDT usando una escala del 1 al 9 donde un 1 indica la existencia de una a diez plántulas, un 5 indica un 20-40% de superficie (2x1 m) ocupada por malas hierbas y un 9 un 100% de superficie ocupada por malas hierbas. En el ensayo en postemergencia se evaluó la mortalidad de plántulas de cebolla y el peso seco de las supervivientes 21 DDT y el grado de infestación de malas hierbas 60 DDT. Se realizaron los correspondientes análisis de varianza (ANOVA) al 95% de confianza para algunas de las variables estudiadas mediante el test de comparación de medias de menores diferencias significativas de Fisher con el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.

Tabla 1. Materias activas (ma) usadas y estrategia empleada (PRE: preemergencia; POST: postemergencia).

Herbicida	Dosis (g ma ha^{-1})	Estrategia
Etofumesato 50% p/v	500 1000 2000	PRE-
Extracto *T. capitatus* 35% p/v	4,6	PRE y POST-
Oxifluorfen 24% p/v + bromoxinil 38,5% p/v	1,5 + 9	POST-
Oxifluorfen 24% p/v + bromoxinil 38,5% p/v	2,2 + 14	
Bromoxinil 38,5% p/v	23	

3. Resultados y Discusión

Experimentos en invernadero. El efecto del herbicida etofumesato y el producto natural aplicados en preemergencia en invernadero sobre la emergencia de la cebolla se muestra en la Figura 1 (izquierda). Se puede comprobar como el etofumesato resulta fitotóxico, sobre todo a las 2 dosis superiores ensayadas mientras que el producto natural permite emerger a la cebolla al mismo nivel que en las macetas control. Este resultado se confirma unas 3 semanas después de la evaluación de la emergencia cuando se determina el peso de las plántulas por maceta (Figura 1, derecha), pudiéndose comprobar que hay una tendencia con la materia activa etofumesato a reducir el peso de las plántula a medida que la dosis herbicida aumentaba, siendo la de 2 $kg.ha^{-1}$ fitotóxica. Ahora bien, si en vez de comparar el peso total de las plántulas emergidas por maceta se compara el peso por plántula existente en la maceta (datos no mostrados), no se observa fitotoxicidad alguna lo que indica que las plántulas que escapan de la acción herbicida del etofumesato, crecen fuertes, quizás por la falta de competencia al haber menos ejemplares por maceta. El herbicida natural presenta una igualdad muy manifiesta con el control que se cree que pudiera ser debida a las pérdidas por evaporación del producto.

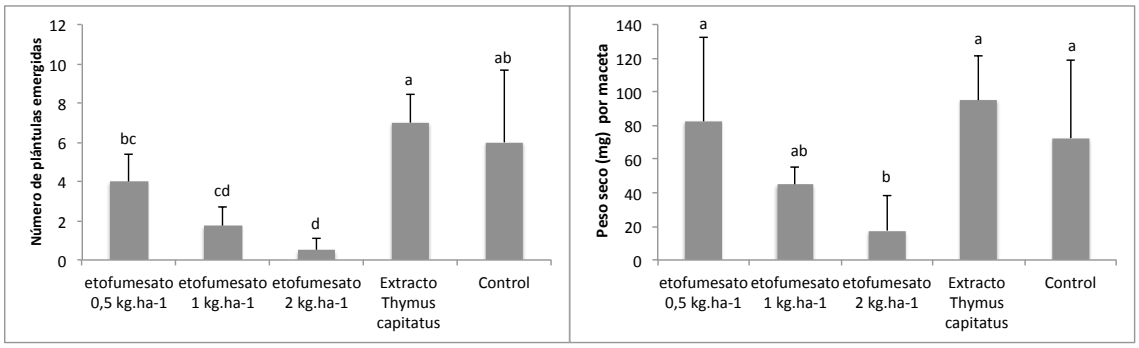


Figura 1. Número de plántulas de cebolla emergidas a los 21 DDT (izquierda) y peso seco de plántulas de cebolla por maceta a los 41 DDT (derecha) con herbicidas de preemergencia en invernadero. Letras distintas sobre barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

Tras realizar el tratamiento en postemergencia sobre plántulas de cebolla en invernadero, se observa que tanto las dos mezclas de oxifluorfen + bromoxinil como éste último aplicado solo, muestran una fitotoxicidad manifiesta y creciente en relación con la dosis de este herbicida (Figura 2). El extracto natural no muestra fitotoxicidad sobre la cebolla al igual que cuando se aplicaba en preemergencia. Sin embargo, este efecto fitotóxico producido por los herbicidas de síntesis 41 DDT tan solo se corrobora cuando se determina el peso de las plántulas con la dosis más elevada de bromoxinil. Los daños observados en la cebolla con las mezclas de oxifluorfen + bromoxinil puede que no sean determinantes y en todo caso, existe una tendencia de menor fitotoxicidad a menor dosis de bromoxinil.

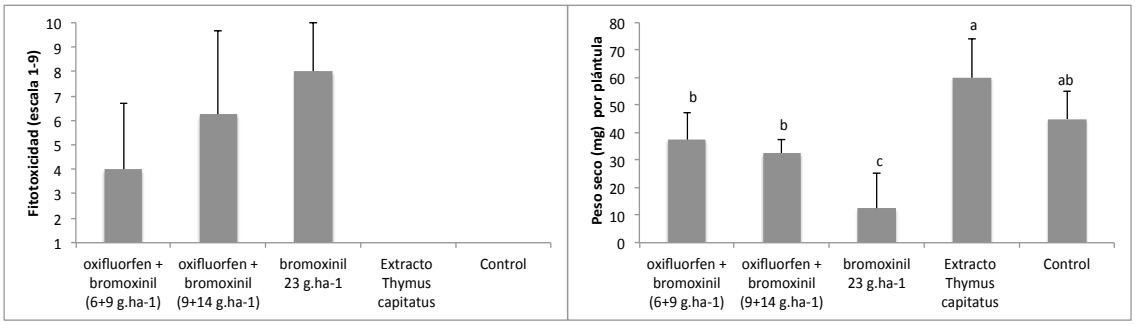


Figura 2. Fitotoxicidad en plántulas de cebolla (izquierda) y peso seco por plántula de cebolla (derecha) a los 41 DDT con herbicidas de postemergencia en invernadero. Letras distintas sobre barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

Experimentos en campo. En cuanto al ensayo de campo, el número de plántulas emergidas es el mismo tanto a los 21 como a los 41 DDT cuando los herbicidas se aplican en preemergencia. En esta última fecha, emergieron 235, 226, 202, 195 y 247 plántulas por parcela cuando se aplicaba etofumesato a 3 dosis crecientes, el extracto natural y sin herbicida respectivamente. Es decir, se observaba una ligera tendencia a impedir la nascencia de las plántulas de cebolla a dosis más elevadas de etofumesato y con el extracto natural, pero el análisis ANOVA (coeficiente f = 0,637 y p valor = 0,647) indicaba que no existían tales diferencias. Posteriormente, a los 46 DDT se recolectaron las plántulas emergidas y se pesaron, pudiéndose observar (Figura 3, izquierda) un efecto negativo frente al control cuando se usaba el etofumesato a la dosis

intermedia, resultado que no se observó con la dosis más elevada de este herbicida. De nuevo se analizó el peso por plántula emergida, y en este caso (Figura 3, derecha) sí que se observaba un ligero efecto negativo de las dos dosis superiores del herbicida etofumesato frente al control.

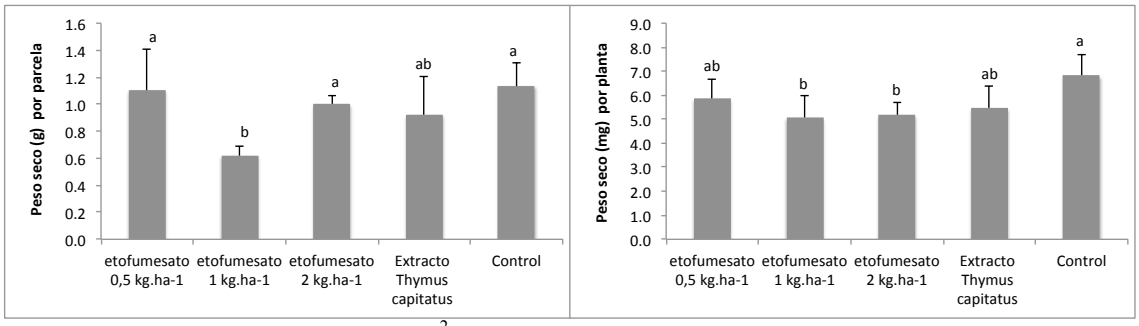
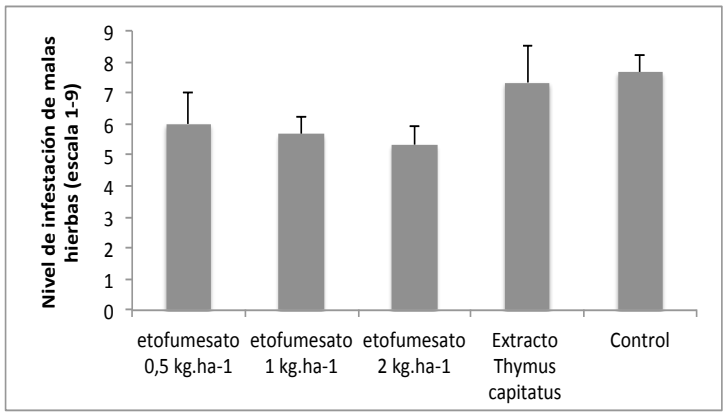


Figura 3. Peso seco por parcela de 2 m^2 (izquierda) y por plántula (derecha) a los 46 días después del tratamiento con herbicidas de preemergencia en campo. Letras distintas sobre barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).



Tras la recolección de las plántulas de cebolla, se realizó a los 72 DDT, una evaluación del nivel de infestación de malas hierbas en las parcelas. Se observó (Figura 4), que el herbicida etofumesato, aunque había ejercido cierta acción herbicida con incluso efecto dosis, ésta no era aceptable.

Figura 4. Nivel de infestación de malas hierbas a los 72 días después del tratamiento con herbicidas de preemergencia en campo.

Cuando se aplicaban en campo los herbicidas en postemergencia de la cebolla, se observó en primer lugar que el daño sobre las plántulas era prácticamente el mismo que se encontraba en las plantas no tratadas (Figura 5, izquierda). Se piensa que los daños observados eran debidos, en parte, a factores climáticos o de manejo del cultivo como a la posible escasez de agua por vientos fuertes y continuados en cierto periodo del cultivo de las cebollas. De hecho, el peso seco obtenido a los 21 DDT por plántula y por parcela (datos no mostrados) es el mismo en todos los tratamientos y el control tras analizar los resultados mediante ANOVA. En cuanto al control de las malas hierbas ejercido por el tratamiento (Figura 5, derecha), no ha habido un buen control a las dosis empleadas.

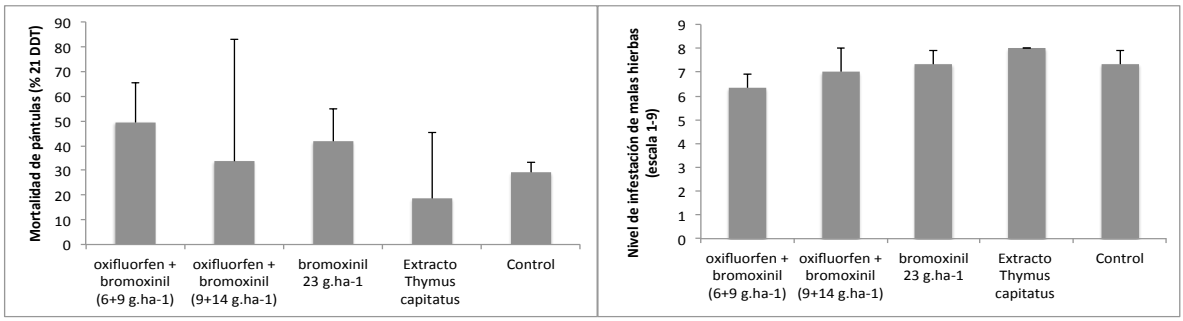


Figura 5: Mortalidad de plántulas a los 21 DDT (izquierda) y nivel de infestación de malas hierbas a los 60 DDT (derecha) con herbicidas de postemergencia en campo.

La aplicación de etofumesato en preemergencia de la cebolla a una dosis de 0,5 kg ma ha^{-1} y las aplicaciones en postemergencia temprana de la cebolla de la mezcla de oxifluorfen + bromoxinil a 6 + 9 y 9 + 14 g de ma ha^{-1}, y del extracto natural, no resultan fitotóxicas, aunque el control de las malas hierbas no es aceptable en campo.

Referencias

BLEIHOLDER, H., BUHR, L., FELLER, C., HACK, H., HESS, M., KLOSE, R., MEIER, U., STAUSS, R., VAN DEN BOOM, T. & WEBER, E. (1996). Compendio para la identificación de los estadios fenológicos de especies mono- y dicotiledóneas cultivadas. Escala BBCH extendida. Ed. BASF. Pp. 116.

DUDAI, N.; POLJAKOFF-MAYBER, A.; MAYER, A. M.; PUTIEVSKY, E.; LERNER, R. (1999). Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicidas, *Journal of Chemical Ecology*, **25**: 1079-1089.

MAPYA. (2019). Avance del Anuario de Estadística de 2018. Acceso 30 mayo 2019.

Study of the phytotoxicity effect of several herbicides on a direct sowing onion crop

Summary: Onion, cultivated under a direct sowing high input regime, is a non-competitive crop against weeds, due to different growing development in the first stages between weeds and crop. In Valencia (Spain) vegetable area, onion is one of its main crops and the weed *Coronopus didymus* (L.) Sm., is becoming a big problem as it is completely adapted to direct sowing and authorized herbicides have proven low efficacy against it. The objective of this research was to test at greenhouse and field level different herbicides on onion crop for phytotoxicity. The tested herbicides were ethofumesate at 3 doses, bromoxynil, bromoxynil + oxyfluorfen at 2 doses and a natural extract of *Thymus capitata* (L) Hoffmanns & Link, all of them applied at pre- and postemergence of onion seedlings. In conclusion, ethofumesate at 0.5 kg de ma ha^{-1} in preemergence and applications in early postemergence of oxyfluorfen + bromoxynil at 6+9 and 9+14 g de ma ha^{-1} and the natural extract were not phytotoxic, although weed control was not complete in field experiments.

Keywords: Chemical control, low doses, *Coronopus didymus*, natural herbicides

Acción fitotóxica de metabolitos secundarios de *Origanum vulgare* sobre *Arabidopsis thaliana*

CABEIRAS-FREIJANES L[12], REGUEIRA-MARCOS L[1], LAGO-DOPICO A[1], LÓPEZ-GONZÁLEZ D[12], REIGOSA MJ[12], VERDEGUER M[3], SÁNCHEZ-MOREIRAS AM[12]

[1]Departamento de Biología Vegetal y Ciencias del Suelo, Facultad de Biología, Universidade de Vigo, Campus Lagoas-Marcosende, E-36310, Vigo, ESPAÑA.
lcabeiras@uvigo.es, lagogal.al@gmail.com, davidlopez@uvigo.es
[2]CITACA, Clúster de Investigación y Transferencia Agroalimentaria, Campus da Auga, Universidade de Vigo, 32004-Ourense, ESPAÑA.
adela@uvigo.es, mreigosa@uvigo.es
[3] Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera 14, E-46022 Valencia, ESPAÑA.
merversa@doctor.upv.es

Resumen: En los últimos años, el metabolismo secundario vegetal se ha ido consagrando como alternativa sostenible para el control de malas hierbas en el sistema agrícola. Entre estos metabolitos, destacan los componentes de aceites esenciales por su mecanismo de acción y su *a priori* baja toxicidad. Las plantas aromáticas mediterráneas, como el *Origanum vulgare,* son ricas en dichos compuestos volátiles, pero poco se sabe sobre el modo de acción fitotóxico de los mismos. Nuestro estudio se centra en tres compuestos presentes en el aceite esencial de *O. vulgare*: carvacrol, timol y ϒ-terpineno. Hasta ahora, se han realizado ensayos a nivel estructural y fisiológico sobre plántulas de *Arabidopsis thaliana* en base a los valores IC_{50} e IC_{80} (concentraciones responsables del 50% y 80% inhibición de la longitud radicular, respectivamente) obtenidos en las curvas dosis-respuesta de carvacrol y timol, tales como: estudio morfológico de raíz y parte aérea mediante lupa, microscopio electrónico y confocal; cálculo del ratio PS/PF, niveles de fluorescencia de la clorofila *a*, detección de estrés oxidativo (tinción DAB), muerte celular (tinción Trypan Blue), metabolómica, etc. Estos resultados nos han valido para iniciar, también, ensayos de sinergia de los tres compuestos estudiados.

Palabras clave: fitotoxicidad, modo de acción, carvacrol, timol, ϒ-terpineno, orégano

1. Introducción

La rápida evolución de los mecanismos de resistencia de especies de malas hierbas, hace peligrar la sostenibilidad de los herbicidas sintéticos en el mantenimiento de la productividad de los cultivos (Powles & Yu, 2010), ya que muchos de estos herbicidas presentan un número reducido de sitios de acción a nivel celular y fisiológico en las plantas diana, teniendo que incrementar su uso con el consecuente coste medioambiental (Hazrati et al, 2017; Van Bruggen et al., 2018). Por ello, es necesario enfocar la investigación en la búsqueda de alternativas que permitan garantizar la creciente demanda mundial de alimentos con un menor impacto biológico y que se ajusten a la nueva legislación reguladora. El descubrimiento de compuestos naturales con potencial herbicida, derivados del metabolismo secundario de las plantas, ha supuesto un gran avance en esta línea (Dayan & Duke, 2014). Sin embargo, se conocen muy pocos estudios detallados, hasta el momento, sobre el modo de acción de estos compuestos (Graña et al.,

2017; Araniti et al, 2018; Díaz-Tielas et al., 2019). Algunos compuestos naturales, como los aceites esenciales (AE), han captado el interés debido a su actividad antibacteriana, antioxidante, antifúngica y herbicida (Batish et al., 2007; Mutlu et al., 2010). Estos AE poseen numerosas ventajas frente a los herbicidas sintéticos, tales como poseer múltiples modos de acción, ser más amigables con el medio ambiente, favorecer la polinización, etc. (Hazrati et al., 2017). El orégano (*Origanum vulgare*) es una especie nativa de la región mediterránea, que presenta como componentes principales el carvacrol, el timol y el γ-terpineno, entre otros, los cuales le otorgan una fuerte actividad antiséptica y antimicrobiana (Faleiro et al., 2005). Además, el aceite y sus constituyentes fenólicos, carvacrol y timol, presentan un potente efecto herbicida en la germinación y crecimiento de plántulas de diversas malezas (Kordali et al., 2008; Royuela et al., 2017). Dado que el carvacrol, el timol y el γ-terpineno son componentes del aceite esencial del *O. vulgare*, y que los tres participan en la actividad fitotóxica de dicho aceite, se llevaron a cabo experimentos para comprobar su capacidad fitotóxica de forma aislada y los efectos que estos compuestos ejercen en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, así como para comprobar la posible presencia de sinergismo o efecto aditivo cuando estos se combinan.

2. Material y métodos

2.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

Semillas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Col-0) fueron esterilizadas con EtOH (50%) y NaOCl (0.5%), lavadas y embebidas en agar (0,1%) a 4 °C durante 72 h. Posteriormente, se pusieron a germinar en placas Petri cuadradas (100 x 15 mm) con medio agar (0,8% p/v) enriquecido con micro y macronutrientes (0,44% Murashige-Skoog, Sigma-Aldrich, USA) y suplementado con 1% de sacarosa (Díaz- Tielas et al., 2012). Tras las 72 h, se sembraron 24 semillas por placa en condiciones estériles, y las placas se mantuvieron, en posición vertical, en cámaras de crecimiento durante 14 d a 22 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 8 h luz y 16 h oscuridad, y una humedad relativa del 55%.

2.2 Curvas dosis-respuesta

Con el objetivo de determinar las IC_{20}, IC_{50} e IC_{80} (concentraciones responsables del 20%, 50% y 80% de inhibición, respectivamente), de nuestros compuestos de estudio, se realizaron las curvas dosis-respuesta a partir de los bioensayos de germinación y crecimiento de *A. thaliana*. Las soluciones de agar se prepararon, inicialmente, con un amplio abanico de concentraciones (0, 50, 100, 200, 400, 800 y 1200 µM) de carvacrol, timol y γ-terpineno (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) preparadas en 0,1% EtOH (v: v). Para timol y carvacrol se acotaron los rangos de concentraciones (0, 80, 150, 220, 290, 360, 430, 500 µM; y 0, 100, 150, 200, 250, 300, 350 µM; respectivamente), con el fin de estimar con mayor precisión los valores de IC_{20}, IC_{50} e IC_{80}. Se utilizaron 5 réplicas por tratamiento y concentración, y se hicieron crecer en cámaras de crecimiento. Tras 14 días, se contó el número de semillas germinadas y se midió la longitud radicular. A los 7 y 14 DAS (Days After Sowing) se observó mediante lupa (Nikon SMZ 1500) la morfología de las radículas de *Arabidopsis* sometidas a distintas concentraciones de las curvas dosis-respuesta. Se observaron la estructura y grosor radicular, presencia de raíces laterales, dirección del crecimiento y estado de los pelos radiculares, además de otras alteraciones que podrían estar relacionadas con el modo de acción del compuesto ensayado.

2.3 Ensayos de sinergia

A partir de las curvas dosis-respuesta se calcularon las IC_{20}, IC_{50} e IC_{80} de carvacrol, timol y γ-terpineno. Con estos valores se establecieron las combinaciones sinérgicas para el ensayo, haciendo combinaciones dos a dos de los valores IC_{20}, IC_{50} e IC_{80} de carvacrol

y timol. Las concentraciones más efectivas se usaron para hacer las combinaciones con los distintos valores IC del γ-terpineno, siendo las combinaciones con mejores resultados, las usadas para crear la formulación final. Las soluciones de agar se prepararon, según las combinaciones establecidas, con las concentraciones correspondientes de carvacrol, timol y γ-terpineno (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) preparadas en 0,1% EtOH (v: v). Las placas se pusieron en cámaras de crecimiento, tal y como se mencionó en el primer apartado, usando 5 réplicas por tratamiento y concentración. A los 14 DAS, se realizó el recuento de semillas germinadas y la medida de la longitud radicular.

2.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en las curvas dosis-respuesta fueron analizados mediante SPSS v.15.0. Primero se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar si los datos seguían una distribución normal. Los datos normales fueron sometidos al test de Levene, para comprobar su homocedasticidad. Los datos homocedásticos se analizaron con un ANOVA con DMS y los heterocedásticos con la T^2 de Tamhane. Los datos que no seguían una distribución normal se sometieron al test de Kruskal-Wallis, para detectar diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Se establecieron tres grados de significación respecto al control, representados con asteriscos. Un asterisco indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$), dos muy significativas ($p \leq 0,01$) y tres altamente significativas ($p \leq 0,001$). Para las curvas dosis-respuesta, los datos fueron representados en gráficas de dispersión, cuya curva de regresión se ajustó en base al coeficiente de correlación (R^2). Posteriormente, se utilizó la ecuación de la recta obtenida para determinar los valores IC_{20}, IC_{50} e IC_{80}.

3. Resultados y discusión

Tanto el timol como el carvacrol mostraron una fuerte capacidad inhibitoria y un efecto altamente significativo sobre el desarrollo y crecimiento radicular de plántulas de *A. thaliana* (Fig.1). El timol produjo una inhibición con respecto al control del 68% para la concentración 150 µM, y del 96% para la concentración más alta, 500 µM (Fig.1A). La concentración más baja de carvacrol (150 µM) mostró una inhibición cercana al 30%, efecto que se vio incrementado en concentraciones posteriores, llegando al 84% para 350 µM (Fig.1B). Con estos resultados, se establecieron los valores correspondientes a las IC_{20}, IC_{50} e IC_{80} para ambos compuestos, necesarios para los ensayos de sinergia. Para timol estos valores se corresponden con 56, 123 y 254 µM, respectivamente; mientras que para carvacrol fueron 92, 202 y 315 µM. Por otro lado, el γ-terpineno no mostró una inhibición aparente sobre plántulas de *A. thaliana.* Sin embargo, se vieron efectos estimulatorios significativos para las concentraciones de 50, 200 y 400 µM (Fig.1C). Estos resultados muestran el potencial fitotóxico que el timol y el carvacrol tienen sobre el crecimiento radicular de *A. thaliana*, potencial que ya había sido estudiado previamente por Kordali et al. (2008) sobre el crecimiento y la germinación de *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album* y *Rumex crispus.*

Además de la inhibición en el crecimiento, las raíces de *A. thaliana* tratadas con timol mostraron efectos de torsión y alteraciones en la cofia, así como la aparición de pelos radiculares ectópicos, próximos al meristemo apical para concentraciones superiores a 80 µM (Fig.2B). En las concentraciones de 150 y 220 µM se repiten estos efectos y el grosor de la radícula pierde uniformidad (Fig. 2C y 2D). La producción de pelos radiculares y raíces laterales está estrechamente relacionada con el equilibrio hormonal en el interior radicular. De hecho, la presencia de pelos ectópicos a partir de filas celulares no destinadas para ello, como los encontrados tras el tratamiento con timol, se ha relacionado con niveles elevados de etileno (Shibata y Sugimoto, 2019).

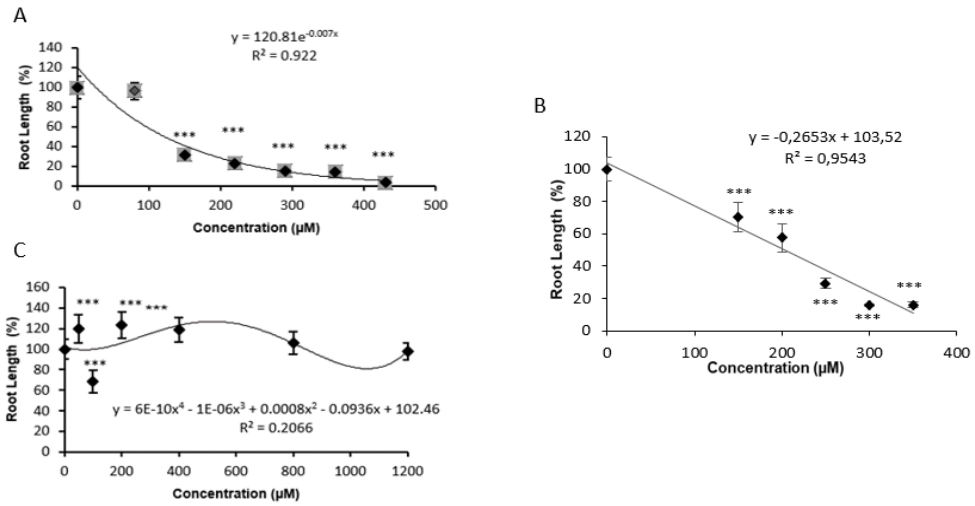


Fig. 1. Curvas dosis-respuesta para los valores de longitud radicular en porcentaje con respecto al control en plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con diferentes concentraciones de los compuestos. A) Concentraciones del timol entre 0 y 500 µM (R^2= 0,922), B) Concentraciones del carvacrol entre 0 y 350 µM (R^2= 0,9564), C) Concentraciones del ϒ-terpineno entre 0 y 1200 µM (R^2= 0,206) Los asteriscos indican la significancia estadística con respecto al control: *** diferencias altamente significativas ($p \leq 0'001$).

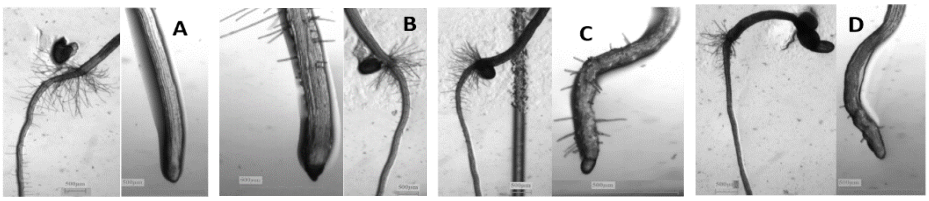


Fig. 2. Raíces de plántulas de *Arabidopsis thaliana* de 14 días de crecimiento no tratadas (**A**) y tratadas con diferentes concentraciones de timol: **B)** 80 µM, **C)** 150 µM y **D)** 220 µM.

Estos efectos inhibitorios sobre la raíz y los pelos radiculares han sido encontrados en plantas expuestas a otros aleloquímicos, y se han relacionado con elevados niveles endógenos de auxina y etileno, como es el caso de las raíces tratadas con el también terpenoide farnesina (Araniti et al., 2016). Por su parte, los efectos de torsión están relacionados con una alteración en la percepción del gravitropismo, que se suele asociar con alteraciones en la organización de los microtúbulos (Araniti et al., 2016; Smyth, 2016), lo que a su vez lleva a una reducción del desarrollo radicular.

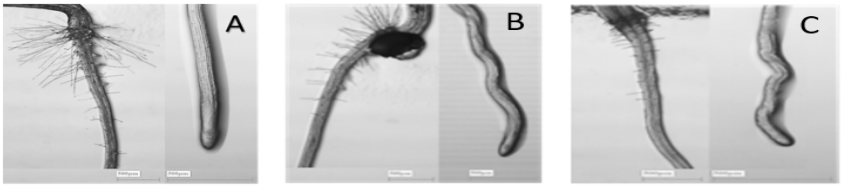


Fig. 3. Inicio y ápice radicular de plántulas de *Arabidopsis thaliana* de 14 días de crecimiento tratadas con diferentes concentraciones del compuesto carvacrol: **A**) 0 µM, **B**) 150 µM, **C)** 200.

En lo que se refiere a los bioensayos de sinergia, los resultados iniciales mostraron claros efectos de inhibición en la germinación y longitud radicular de la raíz en plántulas de *A. thaliana* tratadas con timol y carvacrol, observándose efectos sinérgicos cuando se combinaron las IC de ambos compuestos (Fig.4), tal y como se ha observado anteriormente para otros aleloquímicos (Araniti et al., 2013). En las plántulas tratadas con las concentraciones T_{20}-C_{20} no se observaron demasiadas diferencias en la longitud radicular respecto al control (Fig.4, 1B), pero sí se observó una desaparición de las raíces

laterales y de los pelos radiculares. Estos resultados se corresponden con los obtenidos en las IC_{20} (Fig. 1). Destacar también que el efecto sinérgico más importante en la combinación de las IC_{20} de los dos compuestos se observó sobre la parte aérea más que sobre la raíz, con una inhibición del desarrollo muy por encima de la ejercida por las concentraciones individuales.

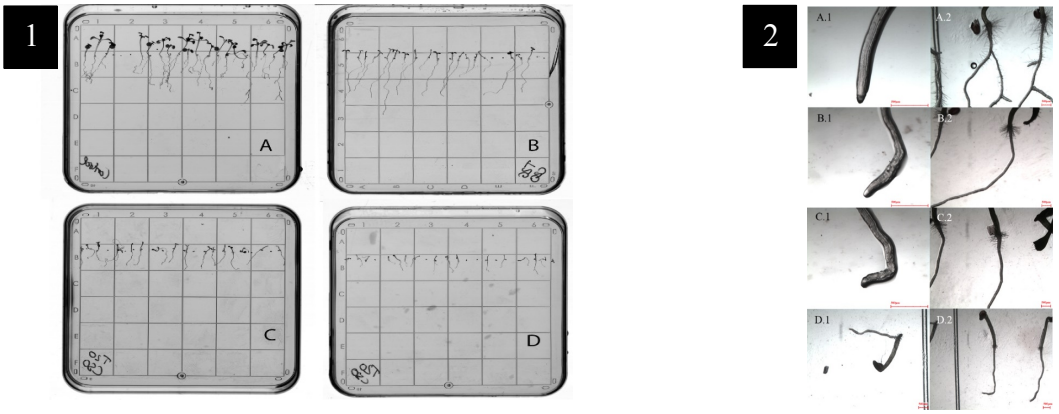


Figura 4. **1.** Sinergia de timol y carvacrol. Placas control (A). Placas de sinergia de T_{20}-C_{20} (B). Placas sinergia T_{20}-C_{50} (C). Placas de T_{20}-C_{80} (D). **2**. Placas a la lupa de sinergia de timol y carvacrol. Placas control (A.1-A.2). Placas de T_{20}-C_{20} (B.1-B.2). Placas de T_{20}-C_{50} (C.1-C.2). Placas de T_{20}-C_{80} (D.1-D.2).

En las concentraciones T_{20}-C_{50} se pudo observar una disminución de la parte aérea y de la longitud radicular (Fig.4, 1C), así como crecimiento en zig-zag de las radículas, producto de la torsión, posiblemente relacionado con una alteración de los microtúbulos (Araniti et al, 2016; Smyth, 2016) (Fig. 4, 2C). Por último, en las concentraciones T_{20}-C_{80}, las radículas incrementaron la torsión, y el efecto sobre la germinación y el desarrollo de la parte aérea fue prácticamente total. Estos resultados confirman los ya reportados en investigaciones anteriores, donde algunos monoterpenos presentaron efectos antagónicos y sinérgicos cuando se combinaban entre sí (Vokou et al., 2003).

Referencias

ARANITI F, GRAÑA E, KRASUSKA U, BOGATEK R, REIGOSA MJ, ABENAVOLI MR & SÁNCHEZ-MOREIRAS AM (2016). *Loss of gravitropism in farnesene-treated Arabidopsis is due to microtubule malformations related to hormonal and ROS unbalance*. PloS One 11, e0160568.

ARANITI F, GRAÑA E, REIGOSA MJ, SÁNCHEZ-MOREIRAS AM & ABENAVOLI MR (2013). *Individual and joint activity of terpenoids, isolated from Calamintha nepeta extract, on Arabidopsis thaliana.* Natural Product Research 27, 2297-2303.

BATISH DR, SINGH HP, SETIA N, KOHLI RK & YADAV SS (2007). *Alternative control of little seed canary grass using eucalypt oil*. Agronomy for Sustainable Development 27, 171–177.

DÍAZ-TIELAS C, GRAÑA E, SÁNCHEZ-MOREIRAS AM, REIGOSA MJ, VAUGHN JN, PAN Z et al. (2019). *Transcriptome responses to the natural phytotoxin t-chalcone in Arabidopsis thaliana L.* Pest Management Science. https://doi.org/10.1002/ps.5405

DÍAZ-TIELAS C, GRAÑA E, SOTELO T, REIGOSA MJ & SÁNCHEZ-MOREIRAS AM (2012). *The natural compound trans-chalcone induces programmed cell death in Arabidopsis thaliana roots*. Plant, Cell & Environment *35*(8), 1500-1517.

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, OWENS DK & DAYAN FE (2014). *The growing need for biochemical bioherbicides.* ACS symposium series 1172, 31-43.

FALEIRO L, MIGUEL G, GOMES S, COSTA L, VENÂNCIO F, TEIXEIRA A et al. (2005). *Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from Thymbra capitata L.(Cav.) and Origanum vulgare L.* Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(21), 8162-8168.

HAZRATI H, SAHARKHIZ MJ, NIAKOUSARI M & MOEIN M (2017). *Natural herbicide activity of Satureja hortensis L. essential oil nanoemulsion on the seed germination and morphophysiological features of two important weed species*. Ecotoxicology and Environmental Safety 142, 423-430.

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.

MORRISSEY JP (2009*). Biological activity of defence-related plant secondary metabolites*. En Osbourn, A.E., Lanzotti, V. (Eds.). Plant-derived natural products. Springer: US, 283-299.

MUTLU S, ATICI O & ESIM N (2010*). Bioherbicidal effects of the essential oils of Nepeta meyeri Benth. on weed spp*. Allelopathy Journal 26, 291–300.

POWLES SB & YU Q (2010). *Evolution in action: plants resistant to herbicides*. Annual Review of Plant Biology 61, 317-347.

SHIBATA M & SUGIMOTO KJ (2019). *A gene regulatory network for root hair development*. Journal of Plant Research 132, 301-309.

SMYTH DR (2016). *Helical growth in plant organs: mechanisms and significance*. Development 143, 3272-3282.

VAN BRUGGEN AHC, HE MM, SHIN K, MAI V, JEONG KC, FINCKH MR & MORRIS JR J G (2018). *Environmental and health effects of the herbicide glyphosate*. Science of the Total Environment 616, 255-268.

VOKOU D, DOUVLI P, BLIONIS GJ & HALLEY JM (2003). *Effects of monoterpenoids, acting alone or in pairs, on seed germination and subsequent seedling growth*. Journal of Chemical Ecology 29(10), 2281-2301.

Phytotoxic action of secondary metabolites of *Origanum vulgare* on *Arabidopsis thaliana*

Summary: In recent years, the secondary plant metabolism has became as a sustainable alternative for weeds control in agricultural systems. Among secondary metabolites, the components of essential oils are particularly interesting due to their biological activities and their *a priori* low toxicity. Mediterranean aromatic plants, such as *Origanum vulgare*, are rich in these volatile compounds, but little is known about their phytotoxic mode of action. Our study focuses on three compounds present in the essential oil of *O. vulgare*: carvacrol, thymol and Υ-terpinene. Until now, we have performed structural and physiological tests on *Arabidopsis thaliana* seedlings based on the IC_{50} and IC_{80} values (responsible for 50% and 80% inhibition of root length, respectively) in the dose-response curves of carvacrol and thymol , such as: morphological study of roots and shoots by magnifier, and light, electron and confocal microscopy; calculation of DW/FW ratio, fluorescence levels of chlorophyll *a*, detection of oxidative burst (H_2O_2 staining), cell death (Trypan Blue staining), metabolomics, etc. These results obtained were the basis for the synergistic tests of the three compounds studied.

Key words: phytotoxicity, mode of action, carvacrol, thymol, Υ-terpinene, oregano

Actividad herbicida de carvacrol sobre *Erigeron bonariensis, Erigeron canadensis* y *Portulaca oleracea*

MUÑOZ M[1], TORRES N[2], SALAMONE A[3], SÁNCHEZ-MOREIRAS A[4], VERDEGUER M[5]

[1,2,5] Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera, s/n, 46022, Valencia, SPAIN
marmuous@alumni.upv.es, *natorpa@etsiamn.upv.es*, *merversa@doctor.upv.es*
[3] Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria. Centro di ricerca Difesa e Certificazione, Sede di Palermo, Viale Regione Siciliana Sud Est, 8669, Palermo, ITALY
adele.salamone@crea.gov.it
[4] Departamento de Bioloxía vexetal e ciencias do solo, Universidad de Vigo, Campus Lagoas-Marcosende, 36310 Vigo, SPAIN
adela@uvigo.es

Resumen: Numerosos aceites esenciales con demostrada actividad herbicida, como los de *Thymbra capitata*, *Satureja montana*, *Plectranthus amboinicus* y diferentes especies de *Origanum*, entre otros, poseen entre sus compuestos mayoritarios el carvacrol, un fenol monoterpénico, isómero del timol.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la actividad herbicida del carvacrol, sobre tres especies arvenses de gran importancia en cultivos mediterráneos, *Erigeron bonariensis, Erigeron canadensis* y *Portulaca oleracea*, con el fin de determinar su potencial herbicida. Se realizaron ensayos *in vitro*, aplicando carvacrol sobre semillas de *E. canadensis y P. oleracea* y ensayos en invernadero, aplicando carvacrol formulado en post emergencia sobre plántulas de *E. bonariensis* y *P. oleracea*. El carvacrol mostró gran actividad en los ensayos *in vitro*, al impedir la germinación de *E. canadensis* y *P. oleracea* a todas las concentraciones aplicadas. En los ensayos *in vivo*, se observó que el carvacrol a todas las dosis probadas controló completamente las plantas de *E. bonariensis* a los 15 días tras la aplicación, mientras que en *P. oleracea* el control se produjo a los 7 días posteriores al tratamiento. Sin embargo, a los 15 días, en *P. oleracea* se produjo algún rebrote, en el 10-20% de las plantas tratadas, dependiendo de la dosis.

Palabras clave: carvacrol, actividad herbicida, germinación, herbicidas naturales, arvenses, post-emergencia

1. Introducción

La flora arvense es capaz de estar presente durante largos periodos de tiempo en los lugares donde aparece y compite con los cultivos por el agua y los recursos disponibles, debido a sus altas tasas de crecimiento, su elevado vigor y capacidad de rebrote, a pesar de las alteraciones que el hombre realiza en el medio. La forma y tamaño de la semilla, es en muchos casos similar a la de los cultivos, provocando una difícil separación de dichas semillas. Las plantas arvenses también poseen eficientes mecanismos de dispersión por medio del viento, la fauna o el agua, además de sincronizarse con el cultivo para aprovechar los recursos disponibles (García & Fernández-Quintanilla, 1991). Por todo ello, es necesario realizar una gestión de las malas hierbas adecuada en cada cultivo.

La Unión Europea en el año 2009 adoptó dos reglamentos: el Reglamento (CE) nº1107/2009, del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y la Directiva 2009/128/CE, del Parlamento europeo y del Consejo, por la que se establece el marco de actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas. La normativa con respecto a los productos fitosanitarios se volvió más restrictiva, con la finalidad de promover un uso más sostenible de los mismos, y proteger la salud humana y animal y el medio ambiente. Esta normativa se traspone a la legislación española mediante el Real Decreto 1311/2012 de 14 de septiembre, por el que se establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios. La nueva legislación promueve el uso de la gestión integrada de plagas, que implica el examen cuidadoso de todos los métodos de protección vegetal disponibles y la integración de medidas adecuadas para evitar el desarrollo de poblaciones de organismos nocivos, manteniendo el uso de productos fitosanitarios y otras formas de intervención en niveles que estén económica y ecológicamente justificados, que reduzcan o minimicen los riesgos para la salud humana y el medio ambiente.

En las estrategias de control de plantas arvenses, la alelopatía se ha propuesto como una alternativa de carácter multidisciplinar mediante el desarrollo de técnicas que impliquen su uso, como el uso de aleloquímicos naturales o modificados como herbicidas, la transferencia genética de propiedades alelopáticas a cultivares comerciales de cultivos, la utilización de cultivares alelopáticos como plantas acompañantes o como abono verde y el uso de "mulchings" fitotóxicos. Los productos naturales reducen la probabilidad de producir acumulaciones dañinas y residuos perjudiciales en aguas y suelo. Las fitotoxinas naturales suelen actuar en puntos distintos a los herbicidas convencionales, presentando numerosos y diversos modos de acción lo que evita la aparición de resistencias (Verdeguer, 2011).

El aceite esencial de *Thymbra capitata* (L.) Cav *y* su componente mayoritario el carvacrol (77,02%) han mostrado efectos fitotóxicos sobre la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de diversas especies (Verdeguer, 2011).

El mecanismo de acción del carvacrol es clastogénico, causando daño al ADN, pero no actúa sobre la formación del huso mitótico (De Assis *et al*, 2018).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la actividad herbicida del carvacrol, tanto *in vitro* como *in vivo*, en condiciones de invernadero, sobre tres especies arvenses de gran importancia en cultivos mediterráneos, *Erigeron bonariensis* L.*, Erigeron canadensis* L. y *Portulaca oleracea* L.

2. Material y Métodos

El carvacrol utilizado en los ensayos *in vitro* fue adquirido a Sigma-Aldrich y el carvacrol utilizado en los ensayos *in vivo* fue suministrado formulado por la empresa Seipasa. Las semillas utilizadas para los ensayos *in vitro* fueron recolectadas en campos de Valencia (*Portulaca oleracea* L.) y Palermo (*Erigeron canadensis* L.) en 2009. Para los ensayos *in vivo* se emplearon semillas de *P. oleracea* adquiridas a la empresa "Herbiseed", del año 2017. Las semillas de *E. bonariensis* fueron recolectadas en una parcela de caqui de producción ecológica del municipio de Carlet (Valencia) en el mes de julio de 2018.

Los ensayos *in vitro* se realizaron en cámara de cultivo WTB-Binder a una temperatura constante de 25.0±0.1ºC, con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se sembraron 20 semillas de cada especie arvense (*P. oleracea* y *E. canadensis*) en placas Petri de 9 cm de diámetro. El carvacrol fue añadido en concentraciones de 0,125, 0,25, 0,5 y 1µl/ml. Se realizaron 5 repeticiones (100 semillas) por cada tratamiento (control más las 4 dosis de carvacrol). Las placas se sellaron con Parafilm. Para evaluar la actividad herbicida se hicieron lecturas de las placas, a los 3 5, 7, 10 y 14 días de incubación.

Los ensayos *in vivo* se realizaron en invernadero, en macetas cuadradas de polipropileno de dimensiones 8 x 8 x 7 cm. Se realizó una única aplicación de los tratamientos (Tabla 1), mediante pulverizador de la marca Matabi (200 ml por tratamiento) en post-emergencia, cuando el 80% de las plantas habían alcanzado el desarrollo de 2-3 hojas verdaderas en *P. oleracea* y en estado de roseta en *E. bonariensis*. Se prepararon 10 repeticiones (macetas) de cada tratamiento.

Tabla 1. Tratamientos ensayados *in vivo*

	Tratamientos	***Abreviaturas***
T1	Control Agua	Control H20
T2	Carvacrol 8%	Cv8
T3	Carvacrol 16%	Cv16
T4	Carvacrol 32%	Cv32
T5	Referencia biológica: Beloukha 8%	REFBIO
T6	Referencia química Glifosato Roundup 36%	REFQUIM

Como sustrato para el crecimiento de las especies arvenses en los ensayos con *P. oleracea* se utilizó suelo agrícola procedente de una parcela de cítricos abandonada situada en Puzol (Valencia), en la que la presencia de malas hierbas era un indicativo de no estar tratada con herbicidas. En los ensayos con *E. bonariensis* se utilizó una mezcla de turba y perlita (en proporción 3/4 de turba y 1/4 de perlita) debido a las dificultades que presentaba esta especie para germinar en el suelo, por ser muy arcilloso y compacto. Además, para esta especie, las plántulas se trasplantaron a maceta de un semillero previamente sembrado. Para ambas arvenses se puso en la base de las macetas 2 cm de perlita para que hubiera un buen drenaje y posteriormente se añadieron 5 cm del sustrato correspondiente.

Se evaluaron las variables "mortalidad" y "nivel de daño". Para ello se registraron imágenes de las macetas 1,3,7,15 y 30 días tras la aplicación de los tratamientos, que posteriormente fueron procesadas con el programa Digimizer. Para valorar la "mortalidad" se consideró 0 si la planta estaba viva y 100 si la planta estaba muerta. Para valorar el nivel de daño, se elaboró una escala para cada especie comprendida entre 0 y 4: 0, planta sin daño; 1, daño leve; 2, daño grave; 3, planta muerta; 4, rebrote.

Resultados y Discusión

Ensayos de inhibición de la germinación *in vitro*

El carvacrol mostró una gran eficacia como inhibidor de la germinación de las semillas de *P. oleracea* y *E. canadensis* a todas las dosis ensayadas (Tabla 2).

Tabla 2. Germinación de semillas de *P. oleracea* y *E. canadensis* tratadas con carvacrol.

Concentración (µl/ml)	**Germinación (% ± e.s.)**	
	Portulaca oleracea	***Erigeron canadensis***
0 (control)	88.8 ± 5.5 a	95.0 ± 2.2 a
0.125	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b
0.250	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b
0.5	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b
1	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 b

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas $p \leq 0.05$

Ensayos de post emergencia

En la Figura 1 se puede observar que los tratamientos con las diferentes dosis de carvacrol controlaron completamente las plantas de *P. oleracea* a los 7 días tras la aplicación de los tratamientos, sin embargo, a los 15 días, se observaron rebrotes en las dosis más altas aplicadas, 10% en la dosis CV32 y 20% en CV 16. El glifosato tuvo una

acción más lenta que el carvacrol, consiguiendo controlar las plantas de esta especie a los 15 días tras su aplicación.

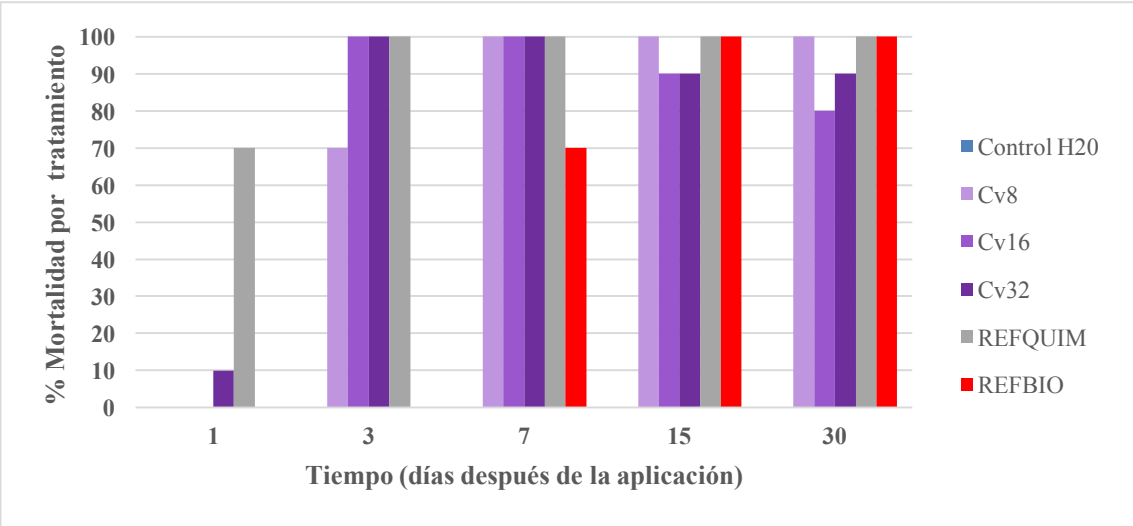


Figura 1 Evolución de la mortalidad causada por los distintos tratamientos en la especie *P. oleracea* durante 30 días tras la aplicación de los mismos.

En la especie *E. bonariensis* (Figura 2) todas las dosis de carvacrol ensayadas fueron efectivas en el control de todas las plantas a partir del día 15. El glifosato tuvo una acción más lenta, controlando las plantas a los 30 días tras la aplicación.

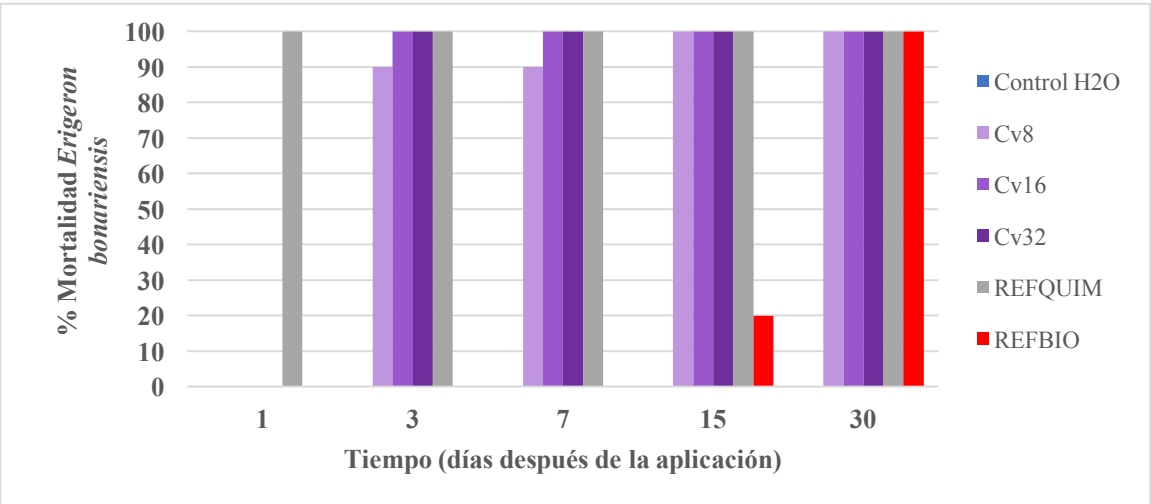


Figura 2 Evolución de la mortalidad causada por los distintos tratamientos en la especie *E. bonariensis* durante 30 días tras la aplicación de los mismos.

La potente actividad fitotóxica del carvacrol indica que podría ser utilizado como herbicida natural, como ya habían señalado otros autores (Vasilakoglou *et al*., 2013).

Referencias

DE ASSIS ALVES T, PINHEIRO PF, PRAÇA-FONTES MM, *et al*. (2018). Toxicity of thymol, carvacrol and their respective phenoxyacetic acids in *Lactuca sativa* and *Sorghum bicolor*. *Industrial crops and products* ***114***: 59-67.

GARCÍA TORRES L & FERNÁNDEZ-QUINTANILLA C (1991) Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Editorial Mundi-Prensa. Madrid.

VASILAKOGLOU I, DHIMA K, PASCHALIDIS K, RITZOULIS C (2013) Herbicidal potential on *Lolium rigidum* of nineteen major essential oil components and their synergy. *Journal of Essential Oil Research* **25**:1–10.

VERDEGUER, M. (2011) Fitotoxicidad de aceites esenciales y extractos acuosos de plantas mediterráneas para el control de arvenses. Tesis doctoral. Universitat Politècnica de València.

Herbicidal activity of carvacrol on *Erigeron bonariensis*, *Erigeron canadensis* and *Portulaca oleracea*

Summary: Numerous essential oils with proven herbicidal activity, such as those of *Thymbra capitata*, *Satureja montana*, *Plectranthus amboinicus* and different *Origanum* species, among others, have as one of their main compounds carvacrol, a monoterpene phenol, isomer of thymol.

The objective of this work was to study the herbicidal activity of carvacrol, on three weed species of great importance in Mediterranean crops, *Erigeron bonariensis*, *Erigeron canadensis* and *Portulaca oleracea*, to determine its herbicidal potential. *In vitro* tests were carried out, applying carvacrol on seeds of *E. canadensis* and *P. oleracea* and greenhouse tests were performed, applying carvacrol formulated in post-emergence on seedlings of *E. bonariensis* and *P. oleracea*. Carvacrol showed great activity in the *in vitro* tests, preventing the germination of *E. canadensis* and *P. oleracea* at all the concentrations applied. In the *in vivo* tests, it was observed that carvacrol at all doses tested completely controlled *E. bonariensis* plants at 15 days after application, while in *P. oleracea* the control occurred 7 days after treatment. However, after 15 days, in *P. oleracea* some regrowth occurred, in 10-20% of the treated plants, depending on the dose.

Keywords: carvacrol, herbicidal activity, germination, natural herbicides, weeds, post-emergence

Determinación de la actividad herbicida de *trans*-chalcona sobre la germinación de *Portulaca oleracea* L., *Amaranthus retroflexus* L., *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. y *Avena fatua* L.

TORRES N[1], VERDEGUER M[2], SÁNCHEZ-MOREIRAS A[3]

[1, 2] Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera, s/n, 46022, Valencia, SPAIN
natorpa@etsiamn.upv.es, merversa@doctor.upv.es
[3] Departamento de Bioloxía vexetal e ciencias do solo, Universidad de Vigo, Campus Lagoas-Marcosende, 36310 Vigo, Spain
adela@uvigo.es

Resumen: La chalcona (1,3-difenil-2-propen-1-ona) es una cetona aromática precursora de importantes moléculas en las plantas, como los flavonoides o las antocianinas. Su fitotoxicidad ha sido demostrada en varias especies de plantas, como *Arabidopsis thaliana*, en diferentes cultivos (cebada, maíz y tomate) y contra diferentes arvenses, como *Amaranthus retroflexus*, *Portulaca oleracea* y *Avena fatua*.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la actividad herbicida *in vivo* en condiciones de invernadero de la *trans*-chalcona sobre la germinación de las arvenses *P. oleracea*, *A. retroflexus*, *Echinochloa crus-galli* y *A. fatua*. Se realizaron ensayos de pre-emergencia, aplicando la *trans*-chalcona mediante riego y se estudió la respuesta de las diferentes arvenses a los tratamientos, evaluando su germinación para determinar la dosis óptima de aplicación de la *trans*-chalcona como herbicida natural. Únicamente la dosis más elevada de *trans*-chalcona ensayada mostró efectos inhibitorios significativos sobre la germinación de dos de las especies ensayadas, *A. fatua* y *A. retroflexus*.

Palabras clave: protección de cultivos, actividad herbicida, arvenses, herbicidas naturales, *trans*-chalcona, germinación

1. Introducción

La vegetación espontánea, debido al proceso de selección natural, está genéticamente mejor adaptada que la mayoría de los cultivos al estrés ambiental y para competir por los recursos del medio, lo que puede tener consecuencias directas como indirectas (Del Busto y Chueca, 2016).

El mejor sistema de manejo de las malas hierbas no se basará en una sola técnica (Zimdahl, 2018), sino que lo ideal es un asesoramiento personalizado para cada situación, en el que se pueden combinar las prácticas de prevención y manejo de arvenses más comunes, en las que se incluyen enfoques culturales, mecánicos y químicos (Del Busto y Chueca, 2016).

Paulatinamente en los últimos años se han ido reduciendo el número de materias activas disponibles en la agricultura y la legislación actual promueve el uso de la gestión integrada de plagas. Por lo tanto, la corriente de confiar casi exclusivamente en productos químicos para el control de plagas tendría que ser reconsiderada (Dayan *et al*., 2009).

La alelopatía alberga cualquier tipo de interacción entre un emisor y receptor de manera natural que provoque una inhibición de la germinación o interfiera de manera negativa en el desarrollo y dispersión del receptor en cualquier sistema agrícola y biológico. Se considera alelopatía cualquier proceso que involucre metabolitos secundarios producidos por las plantas, microorganismos, virus y hongos (Macías, 1995).

La *trans*-chalcona (1,3-difenil-2propen-1-ona) es una cetona alpha beta insaturada aromática, derivada de flavonoides o antocianinas. La fitotoxicidad de la *trans*-chalcona ha sido evaluada en diferentes especies de plantas, pero no se tiene constancia sobre los mecanismos de acción del metabolito secundario a nivel celular de la planta, aunque si se demostró su actividad fitotóxica en *Arabidopsis thaliana* (Díaz-Tielas *et al*, 2012). Los efectos de la *trans*-chalcona han sido probados en veinte especies anuales pertenecientes a diez familias diferentes, obteniéndose un retraso en el desarrollo de los brotes/raíz, pardeamientos y clorosis en las hojas sobre todo en los ápices foliares, además de un efecto inhibitorio de la germinación (Chen *et al,* 2004).

El objetivo principal de este trabajo fue el estudio de la actividad herbicida de la *trans*-chalcona sobre la germinación de cuatro especies consideradas arvenses importantes en cultivos mediterráneos, dos dicotiledóneas *Amaranthus retroflexus* L. y *Portulaca oleracea* L., y dos monocotiledóneas, *Avena fatua* L. y *Echinochloa crus-galli* (L.) P.Beauv.

2. Material y Métodos

Se realizaron ensayos *in vivo*, en pre-emergencia, en condiciones de invernadero. Para la realización de los ensayos se utilizaron macetas de área cuadrangular termo formadas

de polipropileno de dimensiones 8 x 8 x 7 cm. Se usó turba como sustrato, colocando en las macetas 2 cm de perlita en el fondo, para asegurar un buen drenaje, y 5 cm de turba.

Se realizaron tres tratamientos con diferentes dosis de *trans*-chalcona y dos controles, control agua y control agua más etanol, debido a que el producto es hidrófobo, por lo que, a partir de los estudios de Díaz-Tielas *et al*, 2012, se procedió a la utilización de etanol puro como disolvente, al 0,1%. Las dosis ensayadas de *trans*-chalcona se calcularon a partir de la IC_{80} en *Arabidopsis thaliana* (Tabla 1). Los tratamientos fueron aplicados cada 3 días durante un periodo de 21 días (final del ensayo).

Tabla 1. Dosis ensayadas de *trans*-chalcona.

	Incremento de las concentraciones a partir de IC_{80} Arabidopsis thaliana L.	***Dosis µM***	***Referencia***
***Trans*-chalcona**	x8	584	D1
	x12	876	D2
	x16	1168	D3

Se evaluó la capacidad inhibitoria de *la tras*-chalcona sobre la germinación de las cuatro especies. Se realizaron 10 repeticiones (macetas) por especie y tratamiento, colocando 5 semillas de cada especie en cada repetición.

Los datos se procesaron mediante el paquete estadístico Statgraphics® Centurion XVI. Se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA, Analysis of Variance) multifactorial y simple, a los resultados obtenidos, verificando previamente la homocedasticidad de los datos mediante los test de Cochran, Bartlett y Levene.

Los porcentajes de germinación fueron transformados antes de proceder a realizar el ANOVA mediante la fórmula $y=\arcsen\sqrt{x}$, donde x era el porcentaje de germinación en tanto por uno, para satisfacer los requerimientos de homocedasticidad.

El ANOVA se realizó utilizando el test de comparación múltiple de Fisher (intervalos LSD, Least Significant Difference) para la separación de medias, con un nivel de confianza del 95% ($P \leq 0.05$).

3. Resultados y Discusión

Al finalizar los 21 días de ensayo, se observó que solamente la D3 fue efectiva en el control de la germinación de *A. fatua*, reduciéndola un 48,2% con respecto al control agua, pero solamente un 7,4% con respecto al control etanol, ya que el etanol por si solo redujo la germinación de *A. fatua* (Tabla 2). No se observaron cambios en la eficacia de las dosis durante la evolución del ensayo. Debemos destacar que la *trans*-chalcona a la D3 costaba de disolver en etanol incluso utilizando un agitador automático, es por ello, que, aunque se deberían ensayar dosis más altas de *trans*-chalcona para poder obtener mayores efectos herbicidas, recomendaríamos también utilizar otros disolventes para

este compuesto, que no enmascaren su efecto y que permitan su mejor disolución, ya que esto también puede haber condicionado su actividad.

Los tratamientos con *trans*-chalcona en pre emergencia no mostraron ningún efecto significativo sobre la germinación de *E. crus-galli* (Tabla 2). Tampoco la aplicación de etanol afectó la germinación de esta arvense.

La *trans*-chalcona redujo significativamente la germinación de *A. retroflexus* a las dosis D1 y D3, un 43,3 y 63,3% respectivamente, en comparación con el control agua (Tabla 2). El etanol redujo la germinación de esta especie, al igual que la de *A. fatua*, aunque no de forma significativa, pero si comparamos los porcentajes de inhibición de la germinación de estas dosis con el control etanol, entonces solamente la D3 tiene efecto significativo, inhibiendo la germinación en un 30,0%.

En *P. oleracea* la aplicación de *trans*-chalcona redujo la germinación de las plantas tratadas con D1 y D3 en un 40 y 45,7 % respectivamente (Tabla 2). Es destacable que tanto en esta especie como en *A. retroflexus* las plantas tratadas con D2 no mostraron diferencias significativas con el control. Habría que estudiar más a fondo por qué sucede este efecto con esta dosis en estas especies realizando nuevos ensayos. Las plantas tratadas con etanol mostraron una germinación menor que las tratadas con agua, pero sin llegar a ser esta diferencia significativa. Sin embargo, si comparamos la germinación de las plantas tratadas con D1 y D3 con las plantas tratadas con etanol vemos también que, aunque su germinación es menor, esta diferencia no llega a ser estadísticamente significativa, con lo cual, nuevamente podemos concluir que el etanol podría estar enmascarando y condicionando los efectos observados en los tratamientos con *trans*-chalcona.

Tabla 2. Porcentajes de germinación de las diferentes arvenses tratadas con *trans*-chalcona

TRATAMIENTO	**GERMINACIÓN (%) ± ERROR ESTÁNDAR**			
	A. fatua	***E. crus-galli***	***A. retroflexus.***	***P. oleracea***
CONTROL AGUA	54,0 ± 7,5 a	72,0 ± 7,6 a	60,0 ± 6,3 a	70,0 ± 5,8 a
CONTROL ETANOL	32,0 ± 5,8 ab	74,0 ± 4,1 a	40,0 ± 4,0 ab	54,0 ± 5,7 ab
D1	46,0 ± 7,0 bc	68,0 ± 5,8 a	34,0 ± 6,4 bc	42,0 ± 7,2 b
D2	30,0 ± 7,6 ab	76,0 ± 7,4 a	50,0 ± 8,6 ab	68,0 ± 7,0 a
D3	28,0 ± 6,4 c	78,0 ± 3,4 a	22,0 ± 6,0 c	38,0 ± 4,4 b

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas $P \leq 0.05$

Se realizó un análisis multifactorial para determinar el efecto de los diferentes factores, tratamiento y especie y su interacción sobre la germinación de las arvenses. Se observó que el efecto de ambos factores fue estadísticamente significativo, pero no su interacción (Tabla 3).

Análisis de Varianza para % GERMINACIÓN - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
EFECTOS PRINCIPALES					
A:TRATAMIENTO	2,08194	4	0,520486	6,52	0,0001
B:ESPECIE	6,55922	3	2,18641	27,38	0,0000
INTERACCIONES					
AB	1,65611	12	0,138009	1,73	0,0641
RESIDUOS	14,3754	180	0,0798633		
TOTAL (CORREGIDO)	24,6727	199			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla 3. ANOVA multifactorial para los factores tratamiento y especie sobre la variable germinación.

Referencias

Dayan FE, Cantrell CL & Duke SO (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **17**: 4022-4034.

Del Busto A & Chueca P (2016). Control de la flora espontánea mediante métodos no químicos. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. http://www.ivia.gva.es/documents/161862582/163262603/Control+no+quimico+malas+hierbas.pdf/6bb913f8-cf5f-4192-8703-6b5a11594a99. Accedido 27 febrero del 2019.

Díaz- Tielas C, Graña E, Sotelo T, Reigosa MJ & Sánchez- Moreiras AM (2012). The natural compound *trans*- chalcone induces programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant, cell & environment* **35**(8):1500-1517.

Macías FA (1995). Allelopathy in the search for natural herbicide models. *ACS Symposium Series* **582**: 310-329.

Zimdahl RL (2018) *Fundamentals of weed science*. Academic Press, Elsevier

Determination of the herbicidal activity of *trans*-chalcone on *Portulaca oleracea* L., *Amaranthus retroflexus* L., *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. and *Avena fatua* L. germination

Summary: Chalcone (1,3-diphenyl-2-propen-1-one) is an aromatic ketone precursor of important molecules in plants, such as flavonoids or anthocyanins. Its phytotoxicity has been demonstrated in several plant species, such as *Arabidopsis thaliana*, in different crops (barley, corn and tomato) and against different weeds, such as *Amaranthus retroflexus*, *Portulaca oleracea* and *Avena fatua*.

The objective of this work was to study the herbicidal activity of *trans*-chalcone on the germination of the weeds *P. oleracea, A. retroflexus*, *Echinochloa crus-galli* and *A. fatua in vivo* in greenhouse conditions. Pre-emergence tests were performed, applying the *trans*-chalcone by irrigation and the response of the different weeds to the treatments was evaluated, registering their germination. Only the highest dose of *trans*-chalcone applied showed significant inhibitory effects on the germination of two of the tested species, *A. fatua* and *A. retroflexus*.

Keywords: crop protection, herbicidal activity, weeds, natural herbicides, *trans*-chalcone, germination

Manejo, dinámica espacio-temporal y detección aérea de rodales de *Cynodon dactylon* en viñedos con cubierta vegetal

RECASENS J[1], CABRERA C[1], VALENCIA-GREDILLA F[1], DE CASTRO AI[2], ROYO-ESNAL A[1], TORRES-SÁNCHEZ J[2], CIVIT J[3], JIMÉNEZ-BRENES FM[2], LÓPEZ-GRANADOS, F[2]

[1]Grupo de Malherbología y Ecología vegetal. Dpto HBJ. ETSEA. Agrotecnio. Universitat de Lleida. Avda. Rovira Roure 191. 25198 Lleida.
jrecasens@hbj.udl.cat; carlos.cabrera@udl.cat; francisco.valencia@hbj.udl.cat; aritz@hbj.udl.cat
[2]Grupo Imaping. Instituto de Agricultura Sostenible. CSIC. Córdoba.
anadecastro@ias.csic.es; jtorres@ias.csic.es; fmjimenez@ias.csic.es; flgranados@ias.csic.es
[3]Codorníu-Raventós. Raimat, Lleida.
j.civit@codorniu.es

Resumen: En viñedos con cubierta vegetal, la grama (*Cynodon dactylon*) puede devenir una de las malas hierbas más persistentes ante su dificultad de control dado su desarrollo mediante rizomas y estolones. La selección y manejo de una cubierta plurianual y competitiva puede influir en la evolución de esas infestaciones. A su vez, la cartografía de los rodales de grama a escala parcela mediante análisis de imágenes provenientes de un vehículo aéreo no tripulado (UAV) y la validación de estos análisis con los mapas obtenidos a partir de muestreos en diferentes puntos en el campo, puede permitir abordar una estrategia de control localizado dirigida únicamente a las zonas infestadas. En el presente trabajo se verifica la competencia efectiva tras la instalación y mantenimiento de una cubierta de *Festuca arundinacea* que, partiendo de un gradiente inicial de infestación de grama (5-19%; 20-34% y 35-55%), redujo, al cabo de cuatro años, la infestación hasta unos porcentajes de cobertura bajos (<10%). A su vez, en el cuarto año del estudio y en este escenario de baja cobertura de grama, se generaron mapas de infestación a través del análisis de imágenes-UAV con una alta precisión según los muestreos de campo (> 62%). Estos resultados ofrecen una herramienta robusta al viticultor para diseñar un programa de control localizado de *C. dactylon* presente en viñedos con la cubierta vegetal.

Palabras clave: control, grama, mala hierba, *Festuca arundinacea*, análisis de imagen, mapa de tratamiento localizado.

1. Introducción

El control de malas hierbas en viñedos suele realizarse mediante labores del suelo y/o el uso de herbicidas. Ambos métodos pueden llegar a ser eficaces, pero implican ciertos riesgos asociados como son la erosión del suelo o la selección de biotipos de malas hierbas resistentes a herbicidas, respectivamente. La implementación de una cubierta vegetal constituye una herramienta eficaz en el control de malas hierbas (Baumgartner et al., 2008) y permite limitar los fenómenos de erosión y escorrentía (Gómez et al., 2011) e incluso mejorar la calidad del mosto y del vino (Ibáñez, 2015). En función del tipo de malas hierbas más abundantes en el viñedo, la siembra de una cubierta específica puede ejercer una presión adecuada y evitar la expansión de la infestación. En un trabajo previo (Valencia et al., 2017) se verificó que las labores de preparación de una cubierta de *Festuca arundinacea* Schreb., permitían disminuir la presencia de la grama (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.). No obstante, la expansión y persistencia de los rodales de grama pueden verse influidas por la mayor o menor competencia que ejerza la cubierta vegetal establecida y por el manejo que de ésta se lleve a cabo. Por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar, al cabo de cuatro años, cómo evolucionan las infestaciones de grama en función de la magnitud inicial de la infestación y en función del sistema de manejo. Además, en este cuarto año se ha realizado un estudio con el fin de cartografiar los rodales de *C. dactylon* a escala parcela mediante análisis de imágenes provenientes de un vehículo aéreo no tripulado (UAV), validando los análisis con los mapas obtenidos a partir de muestreos de campo en diferentes puntos. Esta información puede permitir el establecimiento de un programa de tratamiento localizado de la mala hierba.

2. Material y métodos

Durante los últimos cuatro años (2015-2019) se ha llevado a cabo un ensayo en una parcela de viña cv. "Pinot Noir" en Raimat (Lleida), con el fin de evaluar el grado de expansión que muestra *C. dactylon* en función del porcentaje inicial de infestación y del efecto competitivo de la cubierta vegetal implementada.

2.1. Instalación y manejo de la cubierta. En septiembre de 2015 se establecieron distintos puntos de muestreo (microparcelas) de 10 × 3 m en las calles de viña, partiendo de diferente porcentaje inicial de cobertura de grama. Los rangos de cobertura fueron: 5-19%, 20-34% y 35-55%. En noviembre de 2015 se labró la parcela y se sembró una cubierta de *F. arundinacea*. El mantenimiento del suelo se ha venido realizando con herbicida bajo las cepas y pases de picadora sobre la cubierta. Durante los últimos cuatro años se han realizado muestreos periódicos de presencia y cobertura de grama en las microparcelas. Los distintos valores de cobertura de grama en cada fecha de muestreo y para cada rango de infestación inicial fueron analizados mediante ANOVA.

2.2. Adquisición y pre-procesado de las imágenes. En febrero de 2019 se tomaron imágenes mediante un UAV modelo quadrotor md4-1000 (microdrones GmbH, Fig. 1a) equipado con una cámara Olympus PEN E-PM1 (espectro Rojo-Verde-Azul, RGB) a una altitud de 30 m, con elevados solapamientos transversal y longitudinal. Las

imágenes individuales fueron procesadas con el programa Agisoft Photoscan Professional 1.4.4 para crear un Modelo Digital de Superficie y una imagen ortomosaicada de toda la parcela de viñedo con información espectral (RGB) y espacial (X, Y, Z) de cada punto de la misma.

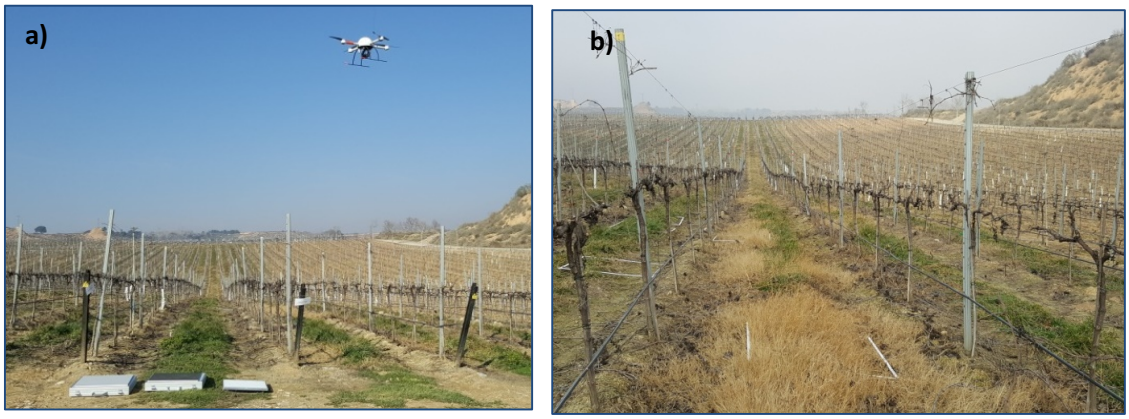


Figura 1. a) Drone modelo md4-1000 durante el vuelo; b) detalle de una de las calles del viñedo: cubierta de *Festuca arundinacea* (color verde) y rodales de *Cynodon dactylon* (amarillento).

2.3. Análisis de las imágenes. La hipótesis de trabajo consistió en la detección temprana de *C. dactylon* durante su parada vegetativa (color amarillento, Fig. 1b) y cuando *F. arundinacea* estaba en el inicio de su rebrote (color verde, Fig. 1a). El algoritmo automatizado de análisis de imagen está basado en *objetos* (OBIA, del inglés *Object-Based Image Analysis*). Su ventaja con respecto al análisis basado en *píxeles* radica en que aumenta la precisión de los mapas obtenidos ya que se incorporan datos espectrales e información contextual de la parcela, que en este caso son la posición y tamaño (altura) de *C. dactylon* con respecto a la hilera de cepas. El algoritmo OBIA se diseñó para generar mapas de los cuatro usos principales de suelo que conformaban la parcela: hilera de cepas, cubierta vegetal de *F. arundinacea*, suelo desnudo y grama. En la ortoimagen de la parcela se tomaron 150 muestras de cada una de estas clases para estudiar las variables con más poder discriminatorio en la posterior clasificación de la imagen de forma que las variables seleccionadas fueron implementadas en el algoritmo OBIA. En el análisis OBIA se utilizó *eCognition Developer* 9.1. Más información en De Castro et al. (2018) y Jiménez-Brenes et al. (2019).

2.4. Validación. La precisión del mapa de clasificación obtenido fue evaluada a partir de datos verdad-terreno de *presencia de grama* tomados el mismo día de la adquisición de la imagen en las microparcelas comentadas en el apartado 2.1. Dichas microparcelas estaban divididas en 120 celdillas, en base a las cuales se hizo la comparación de presencia utilizando la ecuación 1, en la que "*Celdillas correctamente clasificadas*" se refiere a la suma de celdillas en las que se detecta presencia de grama tanto en campo como a través del análisis de imagen, más las celdillas en las que no se detecta grama ni en el campo ni en el análisis de imagen.

$$Precisión = \frac{Celdillas\ correctamente\ clasificadas}{Celdillas\ totales} \qquad \text{[Ecuación 1]}$$

3. Resultados y discusión

En noviembre 2015, justo después de las labores de implantación de la cubierta, los porcentajes de cobertura de grama se redujeron en promedio un 58%. En esta fecha, estos porcentajes fueron, para los tres rangos de infestación considerados, inferiores a un 10% (Tabla 1). Tras cuatro años, en febrero 2019, los porcentajes de cobertura de grama se mantuvieron a unos niveles similares o inferiores a noviembre 2015 (con valores entre un 2,2% y un 13,1%), pero sin diferencias significativas entre fechas.

Tabla 1: Evolución del porcentaje de cobertura de *Cynodon dactylon* tras la instalación de una cubierta de *Festuca arundinacea* y en función del rango de infestación inicial. Entre paréntesis se indica el error estándar.

Septiembre 2015	Noviembre 2015	Febrero 2016	Febrero 2019
Rango inicial (%)	%	%	%
5-19	7 (± 3,4)	1,9 (± 0,47)	2,2 (± 1)
20-34	10 (± 1,39)	4,7 (± 0,81)	13,1 (± 4,61)
35-55	9,2 (± 1,29)	9,2 (± 1,29)	9,8 (± 2)

No se han observado diferencias significativas entre valores de cobertura para cada fecha de muestreo, ni entre fechas para un mismo gradiente de infestación inicial.

Las labores de implantación de la cubierta permitieron reducir el nivel de infestación inicial de *C. dactylon* ya que la cubierta de *F. arundinacea* ejerció durante los siguientes años una competencia efectiva limitando su expansión. Similares resultados han sido observados también en otras parcelas de viñedo (Valencia et al., 2017). Esta menor infestación coincide con un menor número rodales localizados mediante análisis de imágenes aéreas.

En febrero de 2019, la precisión obtenida de la presencia de grama mediante la clasificación automática de las imágenes-UAV fue elevada (Tabla 2), ya que llegó a alcanzar valores de coincidencia superiores al 80% en tres de las nueve microparcelas estudiadas, en otras dos estuvo entre el 70 y el 80%, y en el resto de microparcelas fue > 62 %. En la Figura 2 se presentan varios ejemplos de microparcelas en los que se puede apreciar la coincidencia entre la evaluación realizada en campo y la obtenida de manera automática mediante el algoritmo OBIA diseñado en las imágenes-UAV. Dicha coincidencia es patente incluso en la microparcela 9, en la que los resultados numéricos de precisión no están entre los mejores (precisión = 62,5%) (Tabla 2). Los menores valores de precisión obtenidos en varias microparcelas pueden estar relacionados con pequeñas discrepancias de localización entre el replanteo de la microparcela para realizar los muestreos de campo y su ubicación sobre la imagen ortomosaicada. Estas ligeras diferencias de colocación podrían provocar que, aunque se detecte la presencia de grama, su posición no coincida completamente con la registrada en campo, produciéndose pequeños desplazamientos en el mapa.

Aunque los valores de precisión obtenidos hasta el momento son satisfactorios, se trabajará en el futuro en optimizar el algoritmo OBIA para mejorarlos y comprobar que son extrapolables a otras parcelas de viñedo que presenten un conjunto similar de usos de suelo.

Tabla 2: Grado de coincidencia entre el muestreo de campo y el análisis de las imágenes-UAV respecto a la presencia o no de grama.

	Microparcelas								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Precisión (%)	80,8	91, 7	80,0	66,7	65,8	67,5	70,8	76,7	62,5

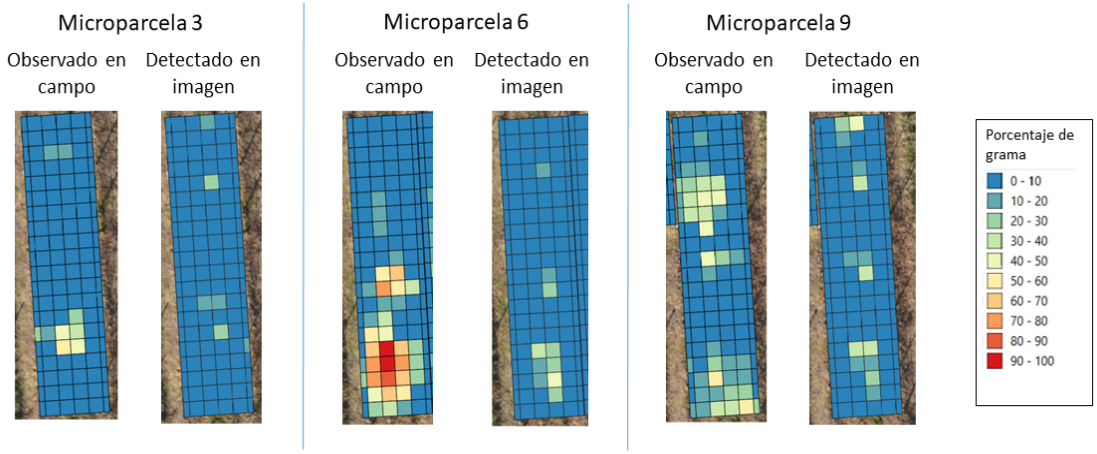


Figura 2. Comparativa en distintas microparcelas de viñedo entre la cobertura de grama observada en campo y la detectada mediante el algoritmo OBIA desarrollado sobre las imágenes-UAV.

4. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por sendos Proyectos del Plan Estatal - Retos de la Sociedad, refs: AGL2017-83325-C4-2-R y AGL2017-83325-C4-4-R (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Fondos EU-FEDER). C. cabrera y F. Valencia-Gredilla han contado con una beca predoctoral otorgada por la Universitat de Lleida.

Referencias

BAUMGATNER K, STEENWERTH KL, VEILLEUX L (2008). Cover-crop systems affect weed communities in California vineyards. Weed Science 56: 596-605.

DE CASTRO AI, JIMÉNEZ-BRENES FM, TORRES-SÁNCHEZ J, PEÑA JM, BORRA SERRANO I, LÓPEZ-GRANADOS F (2018) 3-D Characterization of vineyards using a novel UAV imagery-based OBIA procedure for precision viticulture applications. Remote Sensing 10, 584.

GÓMEZ JA, LLEWELLYN C, BASCH G, SUTTON PB, DSON JS, JONES CA (2011). The effects of cover crops and conventional tillage on soil and runoff loss in vineyards and olive groves in several Mediterranean countries. Soil Use and Management, 27(4), 502–514.

IBÁÑEZ S (2015). Mantenimiento del suelo en el viñedo mediante cubiertas vegetales. Ed. Gobierno de la Rioja. 167 p.

JIMÉNEZ-BRENES FM, LÓPEZ-GRANADOS F, TORRES-SÁNCHEZ J, PEÑA JM, RAMÍREZ P, CASTILLEJO-GONZÁLEZ IL, DE CASTRO AI (2019) Automatic UAV-based detection of *Cynodon dactylon* for site-specific vineyard management. PLoS One, 14(6): e0218132. doi.org/10.1371/journal.pone.0218132 (Open Access)..

VALENCIA F, MAS N, RECASENS J (2017) El uso de cubiertas vegetales y sus labores de implantación en el manejo de *Cynodon dactylon* en viñedo. Actas del XVI Congreso de la Sociedad Española de Malherbología: 147-151. Pamplona.

Management, spatio-temporal dynamics and aerial detection of *Cynodon dactylon* patches in vineyards with cover crops

Summary: The use of cover crops is a usual management practice for irrigated vineyards that allows reducing erosion, controlling weeds and improving vineyard vigor, yield, and crop quality. These advantages can be reduced when bermudagrass (*Cynodon dactylon*) infests cover crop areas. However, previous works have demonstrated that the use of *Festuca arundinacea* as cover crop decreases *C. dactylon* presence.

The objective of this research was to study the spatio-temporal effect of *F. arundinacea* on *C. dactylon* infestations over four years. Additionally, the early mapping of *C. dactylon* patches using an automatic object-based image analysis (OBIA) algorithm developed on orthomosaicked UAV-imagery was also generated the fourth year of study in order to provide an optimized site-specific weed management. The classified maps showed the four main classes in the vineyard (vine, cover crop, *C. dactylon* and bare soil) with overall accuracy > 62%. Furthermore, the spatial coincidence of *C. dactylon* presence from these maps with those obtained from on-ground sampling was also studied. This research allows developing new strategies for site-specific control of *C. dactylon* infestations and decreasing economic and environmental costs.

Key words: control, bermudagrass, weed, *Festuca arundinacea*, image analysis, site specific treatment.

Patrones de emergencia de 19 especies susceptibles de ser cubiertas vegetales en viñedos

CABRERA C[1], ROYO-ESNAL A[1]

[1]ETSEA. Agrotecnio. Universitat de Lleida. Avda. Rovira Roure 191. 25198 Lleida.
carlos.cabrera@udl.cat; aritz.royo@udl.cat

Resumen: El uso de cubiertas vegetales en viñedos es una práctica cada vez más habitual a la que se le atribuyen numerosas ventajas fisicoquímicas para el suelo. La elección de una u otra especie así como la mezcla de varias como cubierta está condicionada a los objetivos que se persiguen con su siembra. En el caso de Raimat (Lleida), las cubiertas tienen como objetivo competir con *Cynodon dactylon*, una mala hierba muy competitiva con la vid. Por ello, es interesante conocer los ritmos de germinación y de emergencia de diferentes especies. Con este objetivo, se estudiaron 19 especies de plantas que pueden ser utilizadas como cubiertas vegetales en viña (8 vivaces y 11 anuales). Se estableció, en otoño de 2018 y primavera de 2019, un ensayo en macetas colocadas en el exterior de los terrenos de la ETSEA (Universitat de Lleida). En cada maceta, de 19 cm de diámetro, se sembraron 100 semillas. Los resultados obtenidos en otoño mostraron que se pueden agrupar las distintas cubiertas en diferentes grupos según su ritmo de emergencia. En el primer grupo (1), las primeras emergencias aparecen a los pocos días y a un ritmo rápido; en el segundo grupo (2), las emergencias tardan más en aparecer pero el ritmo es similar al del primero; en el tercero (3), el momento inicial de emergencia es igual al del segundo, pero con un ritmo más lento. En la siembra de primavera, los ritmos de emergencia fueron más elevados y muy similares para todas las especies. Todos los ritmos de emergencia se ajustaron significativamente a una función sigmoidal (log-logistic). Estos resultados pueden ser útiles a la hora de elegir una cubierta vegetal, así como la combinación de ellas en función del objetivo perseguido con respecto a la cubierta deseada.

Palabras clave: Cubierta vegetal, emergencia, implantación, viña

1. Introducción

En el cultivo de la vid, el laboreo ha sido el manejo habitual en muchas zonas vitícolas ya que éste ha permitido reducir, entre otras aportaciones, la competencia que las malas hierbas pueden ocasionar a las cepas. Además, se ha observado que un laboreo intenso y continuo provoca la formación de una suela de labor, aumenta la erosión del terreno disminuyendo su calidad y dificultando el pase de maquinaria en periodos de lluvia (Gago *et al*., 2007). Por ello, cada vez más viticultores optan por la implantación de una cubierta vegetal que permita evitar estos problemas. En la zona vitícola de Raimat (Lleida), los principales motivos para establecer una cubierta vegetal son evitar la asfixia radicular debida a la compactación del terreno y limitar la expansión de malas hierbas muy competitivas (Baumgartner et al., 2008).

Cuando se opta por instalar una cubierta vegetal, es necesario tener en cuenta aspectos como la disponibilidad de agua, la temporalidad de la cubierta, el espacio que se quiere cubrir, la rapidez de implantación y la competencia que ésta puede tener sobre determinadas malas hierbas a combatir, como es *Cynodon dactylon* (L.) Pers. en el caso de Raimat (Valencia et al., 2018). Esta gramínea estival se multiplica principalmente de manera vegetativa a través de rizomas subterráneos y estolones superficiales. Es una especie vivaz altamente competitiva con la vid y de difícil control mediante herbicidas. Por ello resulta muy interesante el uso de especies vegetales que puedan competir con esta mala hierba limitando su propagación. El éxito en la implantación de estas especies de cubierta vegetal antes de la activación primaveral de los rizomas y estolones de *C. dactylon* deviene un factor primordial para su control.

El objetivo principal de este trabajo se centra en el conocimiento de los ritmos de emergencia y el porcentaje de germinación total de 19 especies susceptibles de ser utilizas como cubierta vegetal en viñedos donde, dependiendo del objetivo final de la cubierta, interesará más una u otra.

2. Material y Métodos

Se sembraron 100 semillas de 19 especies más 5 combinaciones de algunas de ellas (Tabla 1) en macetas individuales de 19 cm de diámetro y 17 cm de profundidad. El ensayo, que constaba de cuatro repeticiones, se llevó a cabo en los terrenos de la ETSEA de la Universitat de Lleida. Las macetas se rellenaron con la tierra del mismo terreno y se enterraron hasta la superficie. Los 2 cm más superficiales de cada maceta se rellenaron con tierra previamente esterilizada para evitar la germinación de otras semillas ya presentes en propio suelo. Una vez hecha la siembra, no se aportó ningún riego y se dejó que la única fuente de humedad fuese la lluvia para así simular las condiciones reales de un campo de viña. Las emergencias se muestrearon periódicamente cada 2-3 días.

El ensayo se realizó en otoño de 2018 y se volvió a repetir en primavera de 2019 para estudiar las dos posibles épocas favorables de siembra.

Los resultados de emergencia total se analizaron mediante un ANOVA con época de siembra (otoño/primavera) como factor principal. Así mismo, los datos de emergencia acumulada se analizaron con una función Log-Logística [1].

$$y = \frac{a}{1+(\frac{x}{x_0})^b} \quad [1]$$

Donde *y* es el porcentaje de emergencia, *a* es el porcentaje máximo de emergencia, x_0 es el tiempo en días en alcanzar el 50 % de emergencias y *b* es el ritmo de emergencias en x_0.

Tabla 1: Listado de especies sembradas en macetas individuales. En las mezclas se especifica el porcentaje de semillas de cada especie.

Monocotiledóneas	**Dicotiledóneas**	**Mezclas**
Agropyrum cristatum	*Camelina sativa*	*Avena strigosa (50%) + Vicia sativa (50%)*
Avena strigosa	*Fagopyrum esculentum*	*Festuca arundinacea (60%) + Lolium multiflorum (40%)*
Bromus catharthicus	*Onobrychis viciifolia*	*Festuca arundinacea (60%) + Lolium perenne (40%)*
Festuca arundinacea	*Phacelia tanacetifolia*	*Festuca ovina (40%) + Lolium perenne (60%)*
Festuca ovina	*Plantago coronopus*	*Festuca ovina (50%) + Vulpia myuros (50%)*
Hordeum vulgare	*Plantago lanceolata*	
Lolium multiflorum	*Sinapis alba*	
Lolium perenne	*Trifolium incarnatum*	
Triticum spelta	*Vicia sativa*	
Vulpia myuros		

3. Resultados y Discusión

Las especies estudiadas se pueden clasificar en diferentes grupos (Figura 1) según el momento en el que aparecen y el posterior ritmo de emergencias. Así, para las monocotiledóneas sembradas en otoño (Figura 1, A), se pueden observar 3 grupos. Un primero formado por *Lolium multiflorum, Triticum spelta, Avena strigosa* y *Hordeum vulgare* (anuales), de emergencias precoces y posterior ritmo elevado. Un segundo grupo lo formarían *Vulpia myuros, Festuca arundinacea* y *F. ovina* (anuales y plurianuales) donde las primeras emergencias son más tardías que en el primer grupo, pero con un ritmo igualmente elevado. El tercer grupo, formado por *L. perenne* y *Bromus catharthicus* (plurianuales), además de tener las primeras emergencias más tardías, el ritmo también es más lento que en los dos grupos anteriores. En el caso de las dicotiledóneas (Figura 1, B), podemos hacer una clasificación similar, pero se observaron diferencias menos marcadas. Un primer grupo formado por *Sinapis alba, Camelina sativa* y *Trifolium incarnatum* (anuales), en el cual se observan las emergencias más precoces y los ritmos más altos. Un segundo grupo con *Vicia sativa, Plantago coronopus* y *Phacelia tanacetifolia* (anuales y plurianuales), donde las emergencias empiezan unos días después de las del primer grupo, pero a un ritmo igualmente elevado. Finalmente, un tercer grupo formado por *Onobrychis viciifolia* y *P.*

lanceolata (anual y plurianual) donde varía el ritmo de emergencia respecto al segundo grupo.

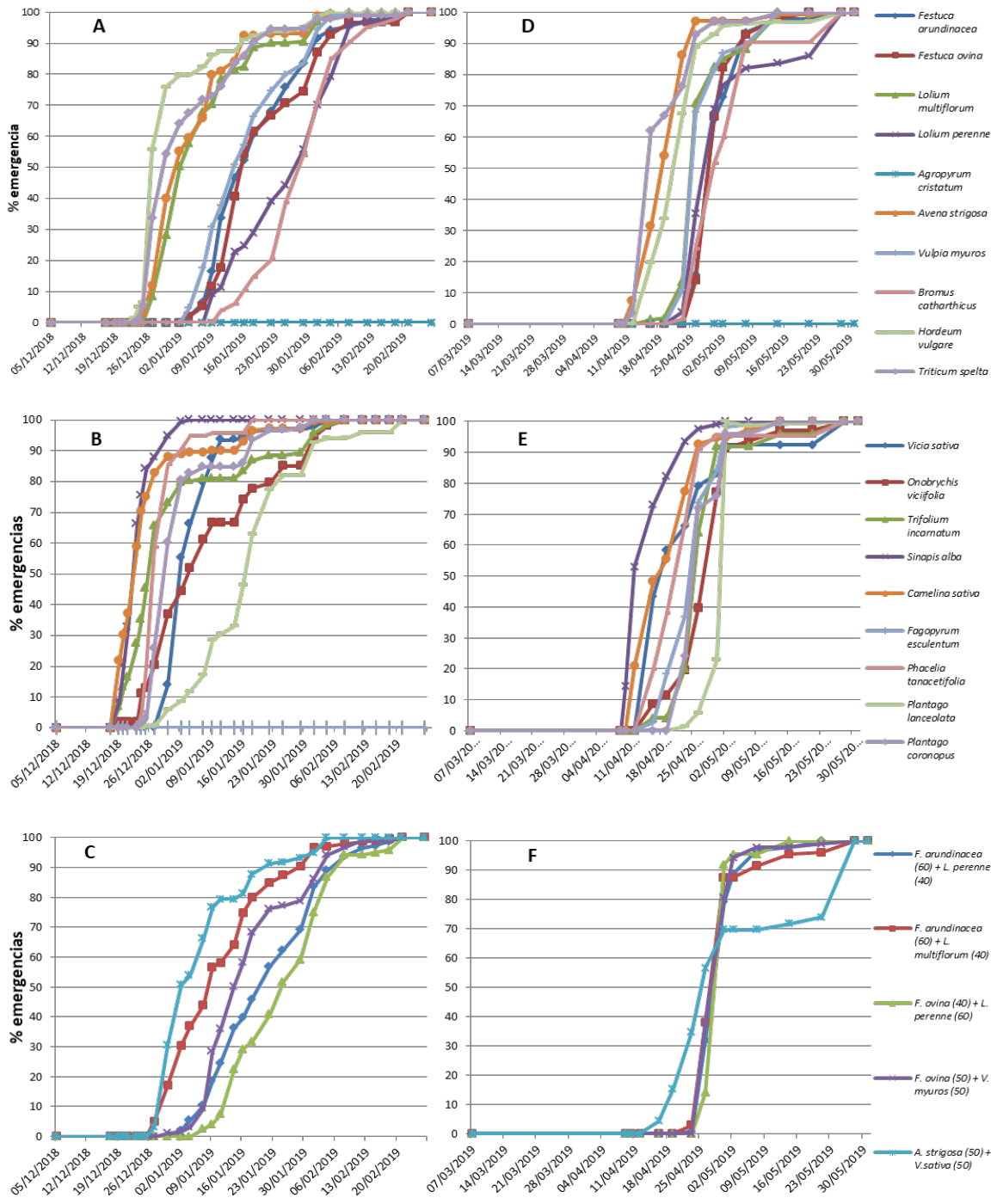


Figura 1: Emergencias acumuladas igualadas a 100 %. A, monocotiledóneas en otoño; B, dicotiledóneas en otoño; C, mezclas de especies en otoño; D, monocotiledóneas en primavera; E, dicotiledóneas en primavera; F, mezclas de especies en primavera. La primera fecha indica el momento de siembra.

El inicio de la emergencia y el ritmo posterior en las mezclas sembradas en otoño (Figura 1, C) se sitúan en un rango intermedio respecto a los anteriores casos, si bien, en la mezcla de *A. satrigosa + V. sativa* y *F. arundinacea + L. multiflorum* se observan las emergencias y ritmos más altos en comparación con las otras mezclas.

Las emergencias de las cubiertas sembradas en primavera (Figura 1, D, E, F), en general muestran una mayor similitud entre las diferentes especies, tanto en su inicio como en los ritmos posteriores. Esto puede ser debido a la mayor temperatura a la que se encuentran expuestas las semillas. Las primeras emergencias fueron más tardías que en otoño, esto es atribuible a la falta de humedad, ya que las primeras lluvias se dieron más tarde desde la fecha de siembra.

Tabla 2: Porcentajes de emergencia de las especies sembradas en otoño y en primavera; g.s.= nivel de significación; *=p<0.05; n.s.= no significativo.

Monocotiledóneas	Otoño (%)	Primavera (%)	g.s.
Agropyrum cristatum	0,0	0,0	n.s.
Avena strigosa	39,5	36,5	n.s.
Bromus catharthicus	46,5	15,5	*
Festuca arundinacea	39,3	35,0	n.s.
Festuca ovina	38,3	14,3	*
Hordeum vulgare	19,8	43,0	n.s.
Lolium multiflorum	68,3	64,5	n.s.
Lolium perenne	24,3	32,3	n.s.
Triticum spelta	23,0	42,3	n.s.
Vulpia myuros	48,5	38,3	n.s.

Dicotiledóneas	Otoño (%)	Primavera (%)	g.s.
Camelina sativa	65,3	32,0	*
Fagopyrum esculentum	0,0	28,5	*
Onobrychis viciifolia	13,5	34,8	*
Phacelia tanacetifolia	29,0	16,5	n.s.
Plantago coronopus	45,8	6,3	*
Plantago lanceolata	37,8	35,3	n.s.
Sinapis alba	82,5	51,0	*
Trifolium incarnatum	63,0	6,3	*
Vicia sativa	54,0	13,3	*

Mezclas	Otoño (%)	Primavera (%)	g.s.
A. strigosa + V.sativa	54,8	11,5	*
F. arundinacea+L. multiflorum	49,5	43,5	n.s.
F. arundinacea + L. perenne	36,5	44,0	n.s.
F. ovina + L. perenne	30,0	21,5	n.s.
F. ovina + V. myuros	47,3	21,8	*

El porcentaje total de emergencias ha sido más alto en la siembra de otoño que en la de primavera (Tabla 2), a excepción de *H. vulgare, T. spelta*, *L. perenne, F. sculentum, O. viciifolia* y la mezcla de *F. arundinacea + L. perenne.* Según estos resultados y, dependiendo cuál sea el fin de la cubierta, podría ser de mayor interés una u otra especie. En el caso de Raimat, donde se plantea un escenario en el que *C. dactylon* es la principal mala hierba a combatir, interesaría una especie de rápida implantación y con una buena cobertura que pudiera ser fuertemente competitiva en el momento en que esta mala hierba se active. Para cumplir estas condiciones, *S. alba, C. sativa* y *L. multiflorum* sembradas en otoño, son las especies que mejor se ajustan, aunque acaben su ciclo a finales de primavera. Por eso, a partir de ese momento no podrían competir más con *C.*

dactylon, lo que lleva a plantear la inclusión de otra especie de desarrollo más lento o plurianual. Las mezclas, como *F. arundinacea* y *L. multiflorum*, podrían aportar una solución intermedia, con una rápida implantación (*L. multiflorum*) y posterior expansión y competencia (*F. arundinacea*) sobre *C. dactylon*.

Referencias

BAUMGARTNER K, STEENWERTH KL, VEILLEUX L, (2008). Cover.crop systems affect weed communities in California Vineyard. *Weed Science* **56**: 596-605.

GAGO P, CABALEIRO C, GARCIA J, (2007). Preliminary study of the effect of soil management systems on the adventitious flora of a vineyard in northwestern Spain. *Crop Protection* **26** (2007) 584-591.

VALENCIA F, MAS N, RECASENS J (2018). El uso de cubiertas vegetales y sus labores de implantación en el manejo de *Cynodon dactylon* en viñedo. *Phytoma España* **297**: 62-66.

Emergence patterns of 19 species susceptible to be cover crops in vineyards

Summary: Cover crops are increasingly used in vineyards due to their recognised physicochemical advantages for the soil. The election of one species or the combination of more than one is subjected to the aim of its installation. In the particular case of Raimat (Lleida), the cover crop has the purpose to compete with *Cynodon dactylon*, a very competitive weed with vines. For that reason, it is interesting to know the emergence patterns of different species which could serve as cover crops and 19 species (8 perennial and 11 annual) were studied. A pot experiment was carried out in the field of the University of Lleida in autumn 2018 and spring 2019. In each pot of 19 cm of diameter, 100 seeds of each species were sowed. The results obtained in autumn showed that it is possible to classify the different species in groups according to its emergence pattern. In the first group (1), the first emergences appear few days after sowing and with high rhythm; in the second group (2), the first emergences appear later than group 1 but with similar rhythm; in the third group (3), the first emergences are observed at the same time as group 2, but with lower rhythm. The results obtained in the spring sowing showed higher emergences rhythms. Furthermore, the initial moments of the emergence were very similar between species. All emergence patterns were significantly adjusted to a sigmoidal (log-logistic) function. These results can be useful when cover crop species have to be selected, always depending on the final purpose of the cover crop.

Keywords: Cover crops, emergence, implantation, vineyard

Evaluación multi-criterio de tres estrategias de gestión de malas hierbas en sistemas cerealistas

FERNÁNDEZ-QUINTANILLA C, PEÑA JM, HERNAIZ P, DORADO J

Grupo tec4AGR0 (Tecnologías Geoespaciales y de Precisión para una Agricultura Sostenible), Instituto de Ciencias Agrarias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28006 Madrid, España.
cesar@ica.csic.es, jmpena@ica.csic.es, phernaiz@ica.csic.es, jose.dorado@csic.es

Resumen: Este estudio a largo plazo llevado a cabo en Arganda del Rey (Madrid), compara tres estrategias de gestión de malas hierbas considerando aspectos agronómicos, económicos y ambientales. Las estrategias son: agricultura de conservación (CON), ecológica (ECO) y producción integrada (INT), ésta última como alternativa a las dos anteriores, promoviendo un uso juicioso de todas las herramientas disponibles, incluso herbicidas, para alcanzar unos objetivos definidos. Los resultados relativos a malas hierbas mostraron un escaso control de la especie principal, *Lolium rigidum*, en ECO. El máximo consumo de herbicidas y fertilizantes se registró en CON, en tanto que el mayor consumo de gasoil se produjo en ECO. El sistema INT mostró un comportamiento intermedio en todos los consumos, resultando la estrategia de mayor rentabilidad económica. La evaluación de externalidades (emisiones de CO_2, CFCs y consumos de energía, N y P) proporcionó valores igualmente intermedios en la estrategia INT.

Palabras clave: gestión de malas hierbas, evaluación multi-criterio, sistemas de producción, agricultura de conservación, agricultura ecológica, manejo integrado

1. Introducción

En la agricultura extensiva actual se han planteado dos estrategias de producción opuestas: *agricultura de conservación* y *agricultura ecológica*. La primera se centra principalmente en minimizar las alteraciones del suelo y todos sus efectos secundarios (erosión del suelo, producción de CO_2, coste económico, uso de energía). En tanto que la agricultura ecológica está fundamentalmente enfocada en evitar el uso de insumos externos (plaguicidas y fertilizantes), apoyándose en el uso de prácticas alternativas que favorecen la biodiversidad. Ninguna de las dos estrategias es la solución para una gestión sostenible de las malas hierbas. En sistemas que incluyen no-laboreo, el control está basado en un uso profiláctico de herbicidas, cuya presión de selección ha llevado a problemas de resistencia a los herbicidas (Powles & Yu, 2010). En la agricultura ecológica, un manejo de malas hierbas apoyado fundamentalmente en el laboreo también es difícil, costoso y, en ocasiones, no es muy eficaz (Benaragama et al. 2016).

Existe un enfoque intermedio a estas dos estrategias denominado *manejo integrado*, que propone la integración de ambos sistemas de producción; es decir, sin prohibir el uso de herbicidas, descarta cualquier tratamiento químico programado, combinando todas las estrategias posibles (preventivas, culturales, químicas y mecánicas) de forma racional, precisando la vigilancia permanente de la comunidad arvense (Jordan y Davis, 2015).

El objetivo principal planteado en este estudio era comparar, mediante una evaluación multi-criterio en base a criterios agronómicos, económicos y ambientales, los tres sistemas de cultivo, conservación, ecológico e integrado, haciendo especial hincapié en los resultados derivados de la gestión de las malas hierbas según la estrategia utilizada.

2. Material y Métodos

Este experimento de larga duración llevado a cabo en la finca "La Poveda" (Arganda del Rey, Madrid), es continuación del ya presentado por Dorado et al. (2017), cuyo diseño experimental era de bloques al azar con 4 repeticiones y un tamaño de parcelas individuales de 50 m × 21 m. Incluye tres sistemas de producción: *i*) Conservación (CON), un monocultivo de cebada que utiliza fertilizantes y herbicidas siguiendo las prácticas convencionales; *ii*) Ecológico (ECO), una rotación de 3 años de barbecho, guisante y cebada manejada siguiendo prácticas orgánicas; y *iii*) Integrado (INT), una rotación de 2 años de guisante con laboreo y cebada en no-laboreo, y bajos insumos de fertilizantes y herbicidas. Cada estrategia de producción tenía tres (en ECO), dos (en INT) y una (en CON) parcelas por bloque, incluyendo así todos los cultivos de la rotación cada año, con objeto de evitar la influencia del año climático.

En el año 2015 (año cero), todas las parcelas estuvieron sembradas de cebada manejada de forma convencional, comenzando los diferentes tratamientos en 2016. Durante el período 2015-2018, se ha llevado a cabo una monitorización de la densidad de malas hierbas prevalentes en la estación invierno-primavera, justo en el momento anterior a los tratamientos de control (aprox. marzo). Para ello, se utilizaron quince marcos de 0,1 m^2 en cada parcela siguiendo una malla regular de 10 m × 5 m, registrando el número de plántulas de cada especie. Los datos de producción de grano (cebada, guisante) se tomaron a finales de junio. Con objeto de comparar las diferentes medidas en el conjunto de años, se realizó un Análisis de la Varianza para Medidas Repetidas con dos factores, el tiempo (años) como factor intra-sujetos y la estrategia de cultivo como factor inter-sujetos. El análisis del efecto de las estrategias de gestión en cada año individualmente, se llevó a cabo con un Modelo Lineal General univariante. El contraste de medias se realizó con el test de Tukey B (P<0,05). Además, se realizó un inventario detallado de todas las operaciones de campo y los insumos correspondientes a maquinaria, agroquímicos y combustible para cada sistema de producción. Estos datos fueron utilizados tanto en el análisis de rentabilidad como en el Análisis de Ciclo de Vida (ACV), una herramienta para la evaluación multi-criterio de todos los impactos asociados a cada sistema, contabilizando tanto el consumo de recursos como las emisiones (Brentrup 2004), con el software SimaPro 8.2.

3. Resultados y Discusión

3.1. *Malas hierbas*

La serie de datos registrada durante el período 2015-2018 ha mostrado una evolución diferente en las poblaciones de malas hierbas dominantes (*Lolium rigidum*, *Papaver rhoeas* y *Polygonum aviculare*) según la estrategia de gestión (Figura 1). En relación a *L. rigidum*, en 2016 las poblaciones de esta especie aumentaron drásticamente en cultivo de cebada en no-laboreo (CON e INT), siendo menor este crecimiento en cebada y guisantes con laboreo (ECO e INT). En cambio, en 2017 disminuyeron sustancialmente en los sistemas CON e INT, debido a la fuerte competencia del cultivo anterior de cebada, que tuvo un buen control tras el tratamiento diclofop-metil, y al bajo número de emergencias de *L. rigidum* en un otoño seco. Sin embargo, en ECO comenzó una evolución creciente de las poblaciones de *L. rigidum* que continuó en 2018, aparentemente debido a la escasa competencia del cultivo previo de guisantes y al pobre efecto de la grada de púas en cultivo de cebada, lo que favorece su crecimiento y producción de semillas el siguiente año.

En el caso de *P. rhoeas*, en 2016 sólo se observó un crecimiento de esta especie en parcelas de cebada en no-laboreo (CON e INT), coincidiendo con un otoño lluvioso. Del mismo modo, en 2017 las poblaciones de *P. rhoeas* aumentaron significativamente en cebada en no-laboreo después del guisante (INT), probablemente debido a que: el guisante no es muy competitivo, no se utilizó ningún herbicida específico para su control, y el no-laboreo puede favorecer a esta especie (Dorado y López-Fando, 2006). Esta tendencia se mantuvo en 2018, resultando la estrategia ECO la menos afectada en el conjunto de años estudiados.

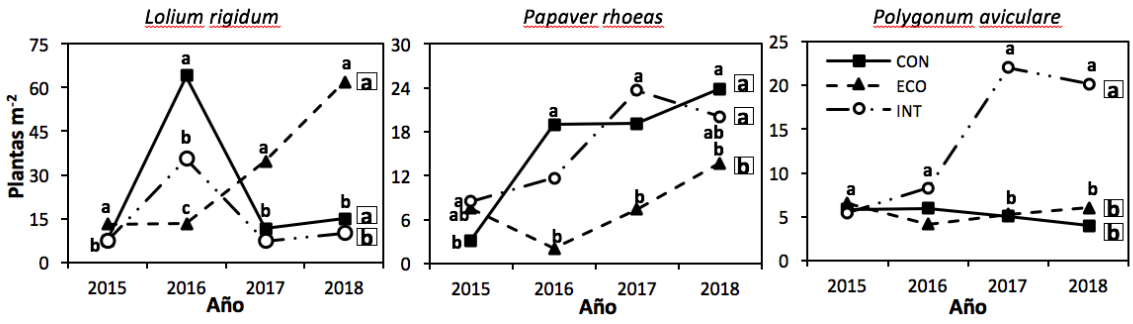


Fig. 1. Medias marginales estimadas de la densidad de plantas de *L. rigidum*, *P. rhoeas* y *P. aviculare* en los muestreos de invierno-primavera durante la serie temporal 2015-2018 para las estrategias CON (conservación), ECO (ecológica) e INT (integrada).

Las poblaciones de *P. convolvulus* permanecieron relativamente estables en 2016, incrementando significativamente su densidad a partir de 2017 en el sistema INT, fundamentalmente en parcelas de cebada en no-laboreo después de guisante. La baja competitividad del guisante, el no haber utilizado ningún herbicida específico, junto al

hecho de que el no-laboreo en cultivo de cebada puede favorecer el establecimiento de esta especie (Xans et al., 2011), explicarían este drástico incremento.

3.2. *Rendimiento de los cultivos y rentabilidad económica*

La productividad de los cultivos se vio afectada fundamentalmente por el régimen de lluvias registrado en cada estación. En invierno-primavera de 2016 se recogieron precipitaciones superiores a la media (344 mm enero-junio), resultando en rendimientos relativamente altos para la zona de estudio, sin diferencias significativas en ninguno de los sistemas (Figura 2). Por el contrario, 2017 fue un año muy seco (120 mm enero-junio), lo que provocó bajos rendimientos, especialmente en ECO, con valores significativamente inferiores que en los otros sistemas. En 2018 volvió a repetirse el patrón de 2016, con precipitaciones altas (294 mm de enero a junio), lo que ocasionó rendimientos también altos sin diferencias significativas entre los tres sistemas de cultivo.

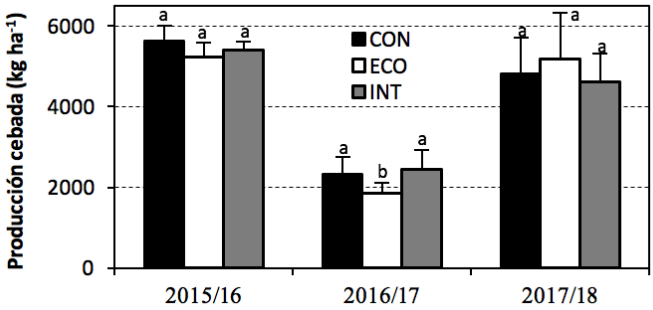


Fig. 2. Rendimiento del cultivo de cebada en las tres campañas estudiadas según las estrategias CON (conservación), ECO (ecológica) e INT (integrada).

En el análisis de la rentabilidad económica hubo tres factores que resultaron discriminantes en los resultados de las tres estrategias: laboreo, fertilizantes y herbicidas. Durante el periodo de estudio, el sistema CON registró solo dos operaciones de laboreo (36,4 L gasoil ha^{-1}), 6 operaciones en INT (84,4 L gasoil ha^{-1}), en tanto que ECO necesitó hasta 15 operaciones (158,6 L gasoil ha^{-1}). El número de aplicaciones fertilizantes realizadas en CON fueron 8 (326 kg N ha^{-1} y 240 kg P y K ha^{-1}), en ECO no se utilizó fertilización nitrogenada, pero sí 4 aplicaciones de una fuente orgánica de P (180 kg ha^{-1}) y K (120 kg ha^{-1}), mientras que en INT solo se fertilizó una vez en primavera la cebada (198 kg N ha^{-1}). Finalmente, se registraron 13 aplicaciones herbicidas en el sistema CON (15,6 L gasoil ha^{-1} + 158 L caldo ha^{-1}), 10 en INT (12 L ha^{-1} de combustible + 132 L ha^{-1} de caldo) y ninguna en ECO. Con estos datos, el cálculo del rendimiento neto obtenido en el conjunto de los tres años resultó favorable en INT respecto a las otras dos estrategias (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen del rendimiento neto, calculado como la diferencia entre beneficios brutos y costes de producción, obtenido cada año y en el conjunto de las tres campañas las estrategias CON (conservación), ECO (ecológica) e INT (integrada).

Estrategia	Rendimiento neto (€ ha^{-1})			
	2015/16	2016/17	2017/18	Suma tres campañas
CON	548	56	467	1071
ECO	361	-3	684	1042
INT	486	128	487	1101

3.3. *Análisis de Ciclo de Vida*

El análisis multi-criterio de las externalidades referidas tanto al consumo de recursos (energía, fertilizantes) como a las emisiones producidas (CO_2, CFCs) por hectárea, resultó claramente favorable a la estrategia ECO, con valores intermedios en INT (datos no mostrados). En cambio, cuando se refieren a tonelada de grano producida, las diferencias entre estrategias de gestión se atenuaron (Figura 3), destacando las mayores emisiones de CO_2 en CON, el mayor consumo de energía y mayores emisiones de CFC en ECO, y valores siempre intermedios en INT.

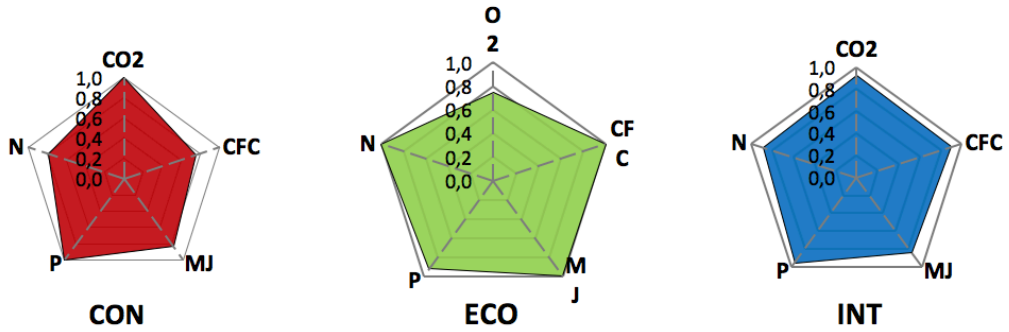


Fig. 3 Modelo de 12 años en un Análisis de Ciclo de Vida considerando los outputs (valores normalizados de: kg CO_2 eq., kg CFC^{-11} eq., MJ, kg P eq., y kg N eq.) por tonelada de grano, para las estrategias CON (conservación), ECO (ecológica) e INT (integrada).

En resumen, cada especie de mala hierba se comportó de manera diferente en respuesta a la estrategia de gestión. El control de *L. rigidum* fue particularmente difícil en ECO, resultando mejor en el sistema INT. En cambio, el mejor control de *P. rhoeas* se obtuvo en el sistema ECO, y el peor control *P. aviculare* en el sistema INT. Considerando que la especie más problemática presente en este estudio en particular era *L. rigidum* (tanto por su densidad como por su competitividad con el cultivo), podemos concluir que el sistema INT proporcionó los mejores resultados generales. Por otro lado, el rendimiento neto obtenido en el periodo de estudio resultó también favorable en INT, un sistema que incluye una rotación de cultivos de 2 años (guisantes-cebada) y un uso racional de herbicidas y fertilizantes. El análisis de externalidades referidas a tonelada de cultivo confirmó unas emisiones y unos consumos también intermedios en INT respecto a los otros dos sistemas.

4. Agradecimientos

Trabajo financiado por AEI / FEDER, UE (proyecto AGL2017-83325-C4-1-R).

Referencias

Benaragama D, Shirtliffe SJ, Gossenb BD et al. 2016. Long-term weed dynamics and crop yields under diverse crop rotations in organic and conventional cropping systems in the Canadian prairies. *Field Crops Research* 196: 357-367.

Brentrup F, Kusters J, Lammel J et al. 2004. Environmental impact assessment of agricultural production systems using the life cycle assessment methodology: 1. Theoretical concept of a LCA method tailored to crop production. *European Journal of Agronomy* 20: 247–264.

Dorado J, López-Fando C 2006. The effect of tillage system and use of a paraplow on weed flora in a semiarid soil from central Spain. *Weed Research* 46, 424–431.

Dorado J, Andújar D, San Martín C, Martín JM, Campos D, Fernández-Quintanilla C 2017. Evaluación de los efectos del sistema combinado de pastos-cultivo sobre las malas hierbas. En: XVI Congreso SEMh (M Royuela, A Zabalza, eds), pp. 159–164, Edita UPN, Pamplona.

Jordan NR, Davis AS 2015. Middle-way strategies for sustainable intensification in agriculture. *BioScience* 65: 513–519.

Powles SB, Yu Q 2010. Evolution in action: Plant resistant to herbicides. *Annual Review of Plant Biology* 61: 317–347.

Xans FX, Berner A, Armengot L & Mäder P 2011. Tillage effects on weed communities in an organic Winter wheat-sunflower-spelt cropping sequence. *Weed Research* 51: 413–421.

Multi-criteria analysis of three weed management strategies in cereal crops

Summary: This long-term study carried out in Arganda del Rey (Madrid), compares three weed management strategies considering agronomic, economic and environmental aspects. The strategies are: conservation agriculture (CON), ecological agriculture (ECO) and integrated production (INT), the latter as an alternative to the previous two, promoting a judicious use of all available tools, including herbicides, to achieve defined objectives. The results for weeds showed little control of the main species, *Lolium rigidum*, in ECO. The maximum consumption of herbicides, fertilizers, seeds and energy was recorded in CON, while the highest consumption of diesel was in ECO. The INT system showed an intermediate behavior in all the consumptions, resulting in the strategy of greater economic profitability. The evaluation of externalities (emissions of CO_2 and CFC, and consumption of energy, N and P) provided also intermediate values in the INT strategy.

Keywords: weed management, multi-criteria assessment, production systems, conservation agriculture, ecological agriculture, integrated management.

Supervivencia de rizomas y estolones de *Cynodon dactylon* en función de su estado vegetativo, tamaño y profundidad de enterramiento

VALENCIA-GREDILLA F[1], RECASENS J[1], ROYO-ESNAL A[1]

[1]Grupo de Malherbología y Ecología Vegetal. Dpto. Hortofruticultura, Botánica y Jardinería. Agrotecnio-ETSEA. Universitat de Lleida. Av. Alcalde Rovira Roure 191, 25198, Lleida.
francisco.valencia@hbj.udl.cat, jrecasens@hbj.udl.cat, aritz@hbj.udl.cat

Resumen: La grama (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) es una de las malas hierbas más difíciles de controlar en viña. Su habilidad para expandirse mediante rizomas y estolones se acentúa cuando estos son fragmentados y dispersados a través del laboreo. Para saber en qué medida influye esta fragmentación y la situación de estos fragmentos en el suelo en la supervivencia de los mismos, se llevó a cabo un estudio durante las campañas 2016/17 y 2017/18 en Lleida, Cataluña. Se recolectaron fragmentos tanto de rizomas como de estolones y se clasificaron en tres tamaños diferentes: con uno, tres y seis nudos por fragmento. Estos se enterraron el día posterior a su recolección a 1, 5 y 10 cm de profundidad. En cada campaña, el ensayo se implantó en otoño e invierno, simulando dos fechas de labor del suelo, y se finalizó en septiembre de 2017 y septiembre de 2018, respectivamente. Los resultados muestran que la fecha de labor es uno de los factores que más afecta a la supervivencia de la mala hierba, mostrando una mayor mortalidad cuando es fragmentada en otoño. Los fragmentos más pequeños (1 nudo) sobrevivieron en menor proporción, siendo además los más afectados cuando eran enterrados a profundidades mayores (10 cm).

Palabras clave: Grama, fragmentación, órganos subterráneos, viabilidad, manejo integrado

1. Introducción

La estrategia de manejo de una determinada mala hierba puede ser muy distinta dependiendo del cultivo en el que esté presente, del sistema de producción del mismo (convencional, integrada…) y del manejo del suelo que se lleve a cabo. La grama (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) es una especie de difícil manejo, muy competitiva y con facilidad de expansión hecho que ha llevado a considerarla una de las especies más nocivas a nivel mundial (Holm et al., 1997). Se propaga principalmente de forma vegetativa a través de rizomas y estolones (Håkansson, 1982), por lo que en cultivos donde se realiza labor, se puede dispersar, y por ende, favorecer su expansión. El MAGRAMA (2014) sugiere como medida alternativa al control químico un

levantamiento del terrero para destruir los rizomas y agotar las reservas de la planta, así como triturar y picar los rizomas y estolones en trozos lo más pequeños posible. Este manejo se perfila como un arma de dos filos: por un lado, reduce el nivel de infestación al exponer a la superficie y triturar los fragmentos de rizomas y estolones que componen la planta (Valencia *et al.,* 2018), pero por otro lado, puede dispersar los mismos por la parcela (Fernández, 2003, Valencia *et al.,* 2018). Por ello, resulta de especial interés saber en qué época del año la grama es más susceptible a la labor (en actividad o en parada vegetativa) y cómo la fragmentación de estolones y rizomas y, la profundidad a la que queden situados, pueden influir en su supervivencia.

2. Material y Métodos

Se estableció un ensayo en el campus de la ETSEA de la Universitat de Lleida, durante las campañas 2016/17 y 2017/18. Cada campaña se repitió el ensayo en dos fechas, en función del estado vegetativo de la mala hierba: en noviembre 2016 y noviembre 2017 cuando se la grama encontraba aun en estado activo, y en marzo 2017 y febrero 2018, cuando la especie se encontraba en reposo vegetativo. Cada fecha pretendía simular el estado en la que se encontrarían los órganos vegetativos tras la realización de una labor en invierno o en otoño. El día anterior de la implantación de los ensayos se recolectó, en una parcela de viña de Raimat (Lleida), fragmentos vegetativos de rizomas y estolones. Estos se clasificaron en tres tamaños distintos: 1, 3 y 6 nudos, y fueron ubicados en macetas de 3L en suelo a tres profundidades distintas: 1, 5 y 10 cm. Las macetas se dispusieron enterradas a nivel del suelo.

Los ensayos siguieron un diseño en bloques completamente aleatorizado con cinco repeticiones. Cada repetición consistió en una maceta de 3L enterrada en el suelo, en la que se ubicó un fragmento de rizoma o estolón en el que se combinaba tipo de órgano vegetativo, tamaño y profundidad, sumando un total de 90 muestras por fecha de ensayo. Los ensayos finalizaron en octubre de 2017 y 2018, respectivamente. La supervivencia se expresó como porcentaje de macetas con presencia de grama viva. Se llevó a cabo una regresión lineal múltiple ajustando tamaño (número de nudos), profundidad, estado vegetativo, tipo de órgano vegetativo y campaña como variables independientes, y supervivencia como variable dependiente a través del programa SigmaPlot 11.0 (Systat Software, San Jose, CA).

3. Resultados y Discusión

Los resultados de la regresión lineal mostraron que los valores de supervivencia de la grama eran significativamente diferentes ($P<0,05$) en función del estado vegetativo (de la posible fecha de labor), tamaño (número de nudos) y profundidad de enterramiento de los fragmentos. Por el contrario, no se observaron diferencias entre los valores de supervivencia de rizomas (47,2%) y estolones (48,9%) (Tabla 1). Los resultados

demuestran, en conjunto, una menor supervivencia de los órganos vegetativos cuando estos están finalizando su ciclo vegetativo (otoño) que cuando están en reposo o parada vegetativa (invierno) (Tabla 1). A su vez, la supervivencia de los fragmentos fue, en ambas campañas, prácticamente nula o muy baja, cuanto menor era su tamaño, especialmente la de aquellos fragmentos con un nudo enterrados en otoño. Estos resultados concuerdan con las directrices que marca la guía de gestión integrada de plagas de uva de transformación del MAGRAMA (2014), la cual aconseja realizar labores que permitan fragmentar los rizomas y estolones al menor tamaño posible. La profundidad de enterramiento afectó también en mayor medida a los fragmentos de menor tamaño (con un nudo), siendo la supervivencia mayor conforme más cerca de la superficie se encontraban ubicados. Similar tendencia en función de la profundidad se observó también en la supervivencia de los fragmentos de tres nudos, si bien con valores mayores que en el caso anterior. Por el contrario los fragmentos de seis nudos, apenas se vieron afectados por la profundidad (Tabla 1).

Tabla 1. Supervivencia de *C. dactylon* (%) en función de su estado vegetativo, tamaño y profundidad de enterramiento.

			Supervivencia (%)			
			2016/2017		**2017/2018**	
	nudos	**prof**	**Otoño**	**Invierno**	**Otoño**	**Invierno**
Rizoma	1	1	0	60	20	60
	1	5	0	40	0	0
	1	10	0	0	0	0
	3	1	100	80	40	80
	3	5	60	60	60	100
	3	10	40	80	0	20
	6	1	60	100	80	100
	6	5	100	100	80	100
	6	10	40	100	80	100
Estolon	1	1	0	60	0	60
	1	5	0	20	20	0
	1	10	0	0	0	0
	3	1	40	100	40	100
	3	5	60	100	60	60
	3	10	0	100	20	20
	6	1	100	100	20	100
	6	5	60	100	80	100
	6	10	80	100	60	100

La fecha de enterramiento, así como el tamaño de los fragmentos y la profundidad a la que quedan enterrados, afectan significativamente a la supervivencia de los rizomas y estolones de *C. dactylon*, siendo más significativa esta pérdida de viabilidad en un

escenario donde se lleve a cabo una labor profunda en otoño con un apero que fragmente los estolones y rizomas al menor tamaño posible.

4. Agradecimientos

Este trabajo se enmarca dentro de los Proyectos del Plan Estatal - Retos de la Sociedad, Ref: AGL2017-83325-C4-2-R y AGL2014-52465-C4-2-R, financiados por el Ministerio de Industria y Competitividad. El primer autor ha contado con una beca predoctoral otorgada por la Universitat de Lleida.

Referencias

FERNANDEZ O N (2003) Establishment of *Cynodon dactylon* from stolon and rhizome fragments. Weed Research, 43: 130-138. doi:10.1046/j.1365-3180.2003.00324.x

HÅKANSSON S (1982) Multiplication, growth and persistence of perennial weeds. In: Biology and Ecology of Weeds (eds WHolzner & N Numata), 123–135. Dr. W. Junk Publishers, The Hague, The Netherlands.

HOLM LG, PLUCKNETT DL, PANCHO JV & HERBERGER JP (1977) The World's Worst Weeds. Distribution and Biology. University of Hawaii Press, Honolulu, USA.

MAGRAMA (2014) GUIA DE GESTION INTEGRADA DE PLAGAS. UVA DE TRANSFORMACION. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Secretaría General Técnica, Centro de Publicaciones, Madrid. 201 pp.

VALENCIA F, MAS N, RECASENS J (2018) El uso de cubiertas vegetales y sus labores de implantación en el manejo de *Cynodon dactylon* en viñedo. Phytoma, 297, 62-66.

Survival of rhizomes and stolons of *Cynodon dactylon* according with its vegetative stage, size and burial depth

Summary: Bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) is one weed from vineyards most difficult to control. The ability of this weed to spread through rhizomes and stolons is accentuated when it is fragmented and disseminated through tillage. In order to study the effect of fragmentation and the distribution of the organs in the soil profile on the weed survival, an experiment was carried out during 2016/17 and 2017/18 seasons in Lleida, Catalonia. Fragments of both, rhizomes and stolons, were collected and classified into three different sizes: one, three and six nodes. These fragments were buried the day after collection at 1, 5 and 10 cm depth. In each season, the trial was implemented in autumn and winter, simulating two tillage dates, and the experiment

ended in September 2017 and 2018, respectively. The results showed that date of burial (simulating date of tillage) is the factor that most affect the survival, showing higher mortality when they were fragmented and buried in autumn. The smallest fragments (with one node) survived in lower proportion, being most affected when buried deeper (10 cm).

Keywords: Bermudagrass, vegetative organs, fragmentation, viability

Is volunteer wheat a serious weed in annual winter wheat production?

BARROSO J[1], WUEST SB[2]

[1]Columbia Basin Agricultural Research Center (CBARC), Department of Crop and Soil Science, Oregon State University, Adams OR, USA.
judit.barroso@oregonstate.edu
[2]USDA-Agricultural Research Service, Soil and Water Conservation Research Unit, Adams OR, USA. :
stewart.wuest@ars.usda.gov

Summary: Annual winter grasses are the most competitive weeds in annual winter wheat production because their life cycle, root system, and morphology are more similar to the crop than the broadleaf weeds. Volunteer wheat growing in a crop of a different species has been identified as a weed. However, the effect of volunteer crops when they can add to the yield of the subsequent crop is more uncertain. The objective of this research was to evaluate the effect of volunteer wheat in wheat monoculture. Two different experiments were conducted in 2015 and 2016 in three fields of the inland Pacific Northwest (PNW) region (USA). Results showed average volunteer wheat densities between 13% and 28% in the wheat fields, although 61% was found in chaff rows. Volunteer wheat produced between 8% and 19% of the total yield. Despite the volunteer and seeded wheat both being high yielding varieties, the productivity per head of seeded wheat was higher than volunteer wheat for all the fields. The volunteer wheat behaved as a weed because the yield from the seeded wheat decreased when volunteer head density increased for all fields. When total wheat yield was considered (seeded plus volunteer), the estimated yield loss at 120 volunteer wheat heads m^{-2} (approx. 30 plants m^{-2}) was 10%. In addition to the demonstrated yield loss, there are other problems that volunteer can cause such as dockage if the wheat varieties come from different market classes, passing on herbicide resistance traits, or increasing pests or diseases in the seeded wheat. Considering all these concerns, several practices should be considered in order to minimize the density of volunteer wheat in a winter wheat field.

Keywords: *Triticum aestivum*, yield loss, annual cropping, chaff row.

1. Introduction

In general, weeds use nutrients and water without contributing to yield. This is not true in the case of wheat (*Triticum aestivum*) plants from seed left in the field after harvest when they are growing in a subsequent wheat crop. The so-called volunteer wheat is likely to produce marketable grain. The effect of volunteer wheat on the overall yield of a wheat crop has not been studied extensively because volunteer wheat is easily controlled

when crops are rotated or when moisture and temperatures are adequate to germinate the wheat seed between harvest and planting of the next crop.

Volunteer wheat is difficult to control in wheat monocultures, particularly when it germinates at the same time as the seeded wheat, unless it is a susceptible cultivar and the seeded wheat is tolerant to a grass herbicide such as, imazamox (Clearfield® Wheat) or quizalofop P-Ethyl (CoAXium™ Wheat). Unlike the Great Plains where volunteer can germinate throughout the year (Anderson and Nielsen, 1996), the Mediterranean conditions of the inland Pacific Northwest (PNW) are generally too dry following wheat harvest to stimulate germination of grain left on the field. When autumn rains arrive, the seed ejected from the combine harvester germinates around the same time as the seeded crop.

The objective of this work was to measure the effect of volunteer wheat plants on total wheat yield and estimate the need for practices to control volunteer wheat if reducing its presence benefit production.

2. Materials and Methods

Early in the spring of 2015, six areas were marked in a 0.2 ha winter wheat research field (Field 1) located in Adams, OR (USA), where chaff rows had produced a thick stand of volunteer wheat plants, and paired each with a nearby area where the crop appeared to be nearly volunteer-free. Field 1 had been in continuous annual winter wheat under no-till practices for 18 years. At harvest time, two quadrats (1 x 0.5 m) from each of the six locations were cut near ground level and the entire aboveground plants put into bags. Since the seeded wheat was an awnless variety (var. 'Bobtail') and the previous year an awned cultivar had been grown (var. ORCF102), individual heads could be separated into seeded and volunteer. The heads were counted and threshed.

At harvest time in 2016, four transects were cut through three fields (Field 1, 2 and 3) perpendicular to the crop rows. The transects were 30 cm wide and between 12 and 16 m long and consisted of 20 segments of between 60 to 81-cm length each, depending on crop row spacing (Table 1). The seeded rows were parallel to the chaff rows and each segment contained two crop rows and two inter-rows. Field 2 was a research field (2.2 ha) that was in its second year of annual winter wheat after many years of a two-year, wheat—fallow rotation. The previous crop had been awnless (var. 'Bobtail') wheat and the current crop had awns (var. 'Ovation'). This field was located 1 km North of Field 1. Field 3 was a commercial field (35 ha) with more than 20 years of annual wheat production located in Dayton, WA (USA). Spring wheat (var. 'Kelso') from 2015 had sprouted and overwintered in the seeded winter wheat crop (var. 'Jebb'). Both volunteer spring wheat and seeded winter wheat were awned, so wheat in the rows was considered as seeded, and wheat growing between rows was considered volunteer and harvested separately for each segment.

Table 1. Details of the transects studied in the different fields and proportion of volunteer yield to total yield.

	Seeded row spacing (m)	Combine cut width (m)	Transect length (m)	Transect cut width (m)	Seg-ment length (m)	Segments per combine width	Volun-teer cultivar	Volunteer yield/total yield
				2015				
Field 1	0.30	2					awned	
Chaff row								0.61
Chaff free								0.13
				2016				
Field 1	0.30	2	12.0	0.30	0.60	3.3	awnless	0.15
Field 2	0.30	7	13.8	0.30	0.60	11.7	awnless	0.19
Field 3	0.20	7.3	16.2	0.30	0.81	9.0	na	0.08

Linear regressions were used to study the effect of volunteer wheat on seeded wheat. A particular linear model was used to determine if the volunteer wheat distribution was driven by field productivity. Low yielding areas in a field were considered those segments (sampling points) where the total (seeded and volunteer) yield was below the mean yield of the field and high yielding areas those with yield above the mean. The dependent variable of the linear model was total head density per m^2 and the two independent variables were volunteer head density per m^2 and low versus high yielding areas. A linear model forced to the origin was used to determine the yield loss caused by volunteer wheat. Fields were divided into non-infested with <10% volunteer heads and infested with >10% volunteer heads. The dependent variable was total wheat yield (kg ha^{-1}) and the independent variables were total head density per square meter and infested versus non-infested areas. Analyses of covariance were conducted to contrast the multiple regressions and analyses of variance to determine the significance of the described models compared to a linear model without considering the two different yielding or infested areas.

3. Results and Discussion

The regression analysis between yield from seeded wheat versus volunteer wheat head density showed significant negative responses (Figure 1a). The yield from the seeded wheat decreased when volunteer head density increased for all fields, in particular for Field 3, where the identified volunteer wheat came only from the inter-row spaces and was undercounted. The negative effects of volunteer wheat on seeded wheat indicate a competition effect similar to a typical weed. The difference between a regular weed and volunteer crop is that the volunteer wheat grain can add to the seeded wheat grain yield at harvest. However, total wheat yield (seeded + volunteer) did not increase significantly with volunteer yield except in Field 2, where the volunteer infestation was very high in general (28% of wheat heads on average were volunteer) and more uniformly distributed (results are not shown). The response of total wheat yield to the relative volunteer wheat infestation showed a decrease in total yield when the infestation increased in Fields 1 and 3 but not for Field 2 where the volunteer wheat does not seem to be as competitive as in the two other fields (Figure 1b).

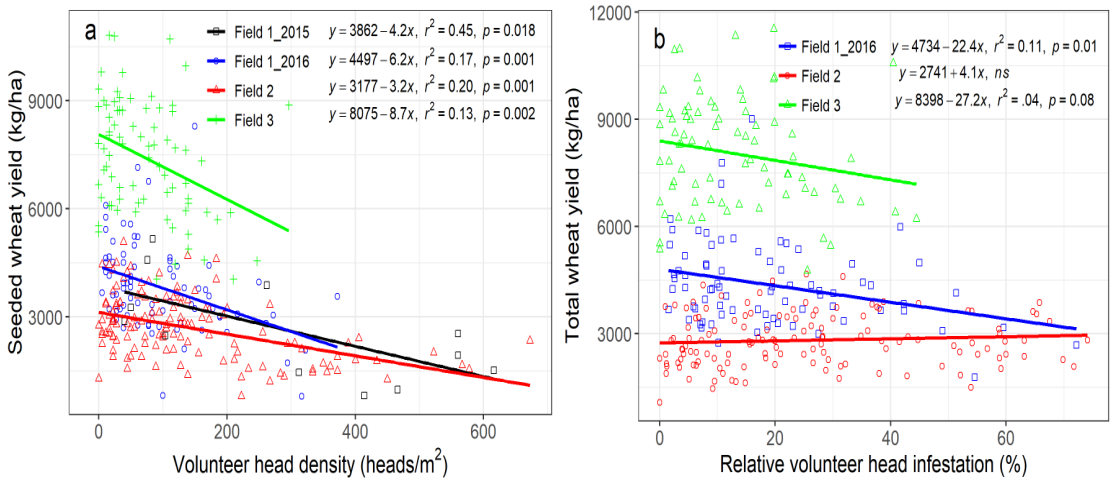


Figure 1. Relationship between: a) seeded wheat yield and volunteer head density and b) total wheat yield (seeded + volunteer) and relative volunteer head density in 2016.

The average grain weight (g) per head for seeded and volunteer wheat was 0.67 and 0.48 for Field 1 in 2015, 0.92 and 0.59 for Field 1 in 2016, 0.76 and 0.47 for Field 2, and 1.56 and 0.84 for Field 3. The analyses indicated that the volunteer wheat distribution in relation to the total wheat did not differ depending on field productivity. The linear models that examine the relationship between total (seeded + volunteer) wheat yield and total head density showed lower residual standards errors ($p < 0.002$) for Fields 1 and 3 when considering infested and non-infested areas. For Field 2 the difference was not significant. The yield loss (calculated from the slope of the linear models) between infested and non-infested areas was 14% for Field 1, 0% for Field 2, and 15% for Field 3.

The center of densely infested chaff rows (quadrats from Field 1, 2015) produced an average yield loss of 8% compared to nearby non-chaff-rows that were low in volunteer wheat. It is possible that high intra-species competition in heavily infested chaff rows causes less yield loss per volunteer plant compared with the same number of volunteer plants distributed more uniformly throughout the field. In 2016, when intermediate infestation areas were sampled in addition to low and high infestation areas in the same field, the yield loss was 14% on average. This would mean that the intermediate areas between highly infested chaff rows and nearly volunteer-free areas suffered greater proportional yield losses than the chaff rows, assuming that the differences were not due to differences in crop response between years.

The higher volunteer competitiveness found in Field 3, followed by Field 1 and Field 2 could be related to a different relationship between the seeded and volunteer wheat based on field productivity, such that volunteer wheat was more competitive under higher yielding fields (higher soil fertility and/or precipitation) than under lower yielding fields. In 2016, the yield of Fields 1, 2 and 3 was 4170, 3630 and 7960 kg ha^{-1}. The average annual rain is 610 mm for Field 3 compared to 405 mm for Fields 1 and 2. In this study, when the yield supplied by the volunteer wheat was not considered, an average volunteer

density of 120 heads m^{-2} (30 plants m^{-2} assuming four heads $plant^{-1}$) reduced the yield of seeded wheat 13.7% on average among the four fields according to the linear models (Figure 1a). However, when total wheat yield was considered (seeded + volunteer), the estimated yield loss at 120 volunteer heads m^{-2} was 10.4%.

In addition to yield loss, there are several considerations relevant to volunteer wheat as a weed in the following wheat crop. The proportion of total grain yield from volunteer plants measured in this study was substantial (14% on average), and clearly make a case to consider dockage when choosing to change market classes of wheat from one year to the next. It is also evident that herbicide resistance traits that a cultivar might possess will be passed on in future years through volunteer plants and the seed left by volunteer plants. This may increase control problems as has been reported in the literature (e.g. Knispel et al., 2008; Rainbolt et al., 2004). Volunteer can also increase the rate of diseases or other pests in the seeded crop (e.g. Lyon et al., 2002; Singh et al., 2018). Considering all these concerns, several practices could be considered in order to minimize the density of volunteer wheat in a winter wheat field, such as tillage to stimulate weed and volunteer seed germination before seeding, delayed seeding date, control emerged volunteer before seeding, optimize combine harvester calibration, reduce harvesting speed, or use some of the harvest weed seed control practices described by Walsh et al. (2018).

4. Acknowledgements

The authors thanks Steve Umbarger for field operations, Jack De Witt as a grower collaborator, and Jennifer Gourlie, Tami Johlke, and Becka Hippe for data collection and sample processing.

References

ANDERSON RL, NIELSEN DC (1996) Emergence pattern of five weeds in the central Great Plains. *Weed Technology* **10**, 744-749.

KNISPEL AL, MCLACHLAN SM, VAN ACKER RC, FRIESEN LF (2008) Gene flow and multiple herbicide resistance in escaped canola populations. *Weed Science* **56**, 72-80.

LYON DJ, BUSSAN AJ, EVANS JO, MALLORY-SMITH CA, PEEPER TF (2002) Pest management implications of glyphosate-resistant wheat (*Triticum aestivum*) in the western United States. *Weed Technology* **16**, 680-690.

RAINBOLT CR, THILL DC, YOUNG FL (2004) Control of volunteer herbicide-resistant wheat and canola. *Weed Technology* **18**, 711-718.

SINGH K, WEGULO SN, SKORACKA A, KUNDU JK (2018) Wheat streak mosaic virus: a century old virus with rising importance worldwide. *Molecular Plant Pathology* **19**, 2193-2206.

WALSH MJ, BROSTER JC, SCHWARTZ-LAZARO LM, et al. (2018) Opportunities and challenges for harvest weed seed control in global cropping systems. *Pest Management Science.* **74**, 2235-2245.

Es el ricio de trigo una mala hierba importante en monocultivo de trigo?

Resumen: Las gramíneas anuales de invierno son las malas hierbas más competitivas en la producción de trigo de invierno debido a que su ciclo de vida, sistema radicular y morfología son más similares al cultivo que las malas hierbas de hoja ancha. El ricio de trigo creciendo en un cultivo de diferente especie se ha identificado como una mala hierba. Sin embargo, el efecto del ricio cuando puede aportar al rendimiento del cultivo siguiente es más incierto. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del ricio de trigo en el monocultivo de trigo. Dos experimentos diferentes fueron realizados en 2015 y 2016 en tres campos de la región interior del noroeste del Pacífico (EE.UU.). Los resultados mostraron una densidad promedio de ricio en los campos de trigo de entre el 13% y el 28%, aunque 61% se encontró en las hileras del residuo de paja. El ricio produjo entre el 8% y el 19% del rendimiento total. A pesar de que tanto el ricio de trigo como el trigo sembrado provenían de variedades de alto rendimiento, la productividad por espiga del trigo sembrado fue mayor que la de la espiga de ricio en todos los campos. El ricio se comportó como una mala hierba porque el rendimiento del trigo sembrado disminuyó cuando la densidad de espigas de ricio aumentó en todos los campos. Cuando se consideró el rendimiento total de trigo (trigo sembrado más ricio), la pérdida de rendimiento estimada con 120 espigas de ricio por metro cuadrado (aproximadamente 30 plantas/m^2) fue del 10%. Además de la pérdida de rendimiento demostrada, existen otros problemas que el ricio puede causar, como la penalización por impurezas si las variedades de trigo provienen de diferentes clases de mercados, la transmisión de resistencia a herbicidas, o el aumento de plagas y/o enfermedades en el trigo sembrado. Teniendo en cuenta todos estos problemas, es necesario considerar varias prácticas para minimizar la densidad de ricio en el monocultivo de trigo de invierno.

Palabras clave: *Triticum aestivum*, pérdida de rendimiento, cultivo anual, hilera de paja.

Residuos de raíces de *Vicia faba* L. para el control de malas hierbas

ÁLVAREZ-IGLESIAS L[1,3], SANTIAGO R[2,3], REVILLA P[1,3], PEDROL N[2,3]

[1] Grupo de Genética y Mejora de Maíz, Misión Biológica de Galicia (CSIC), Pontevedra, ESPAÑA.
lalvarez@mbg.csic.es, previlla@mbg.csic.es
[2] Departamento de Bioloxía Vexetal e Ciencia do Solo, Universidade de Vigo, Vigo, ESPAÑA.
rsantiago@uvigo.es, pedrol@uvigo.es
[3] Unidad Asociada "Agrobiología Ambiental, Calidad de Suelos y Plantas"

Resumen: Estudios previos han demostrado el efecto negativo de la biomasa aérea de la leguminosa *Vicia faba* sobre las malas hierbas. Pero si esta biomasa es cosechada, solo las raíces permanecerán en el suelo, donde se descompondrán pudiendo liberar compuestos con efectos fitotóxicos sobre las malas hierbas. Para investigar esta posibilidad se llevaron a cabo ensayos en dos localidades de campo y en condiciones de invernadero. En los ensayos de campo, los residuos de raíces de *V. faba* provocaron reducciones en la densidad y la biomasa total de malas hierbas, afectando tanto a las monocotiledóneas como a las dicotiledóneas. En los ensayos de invernadero se evaluó el efecto a corto plazo de los residuos de raíces de *V. faba* sobre maíz y algunas de sus malas hierbas más relevantes. Los restos radiculares de *V. faba* afectaron negativamente a la germinación y el crecimiento temprano de las malas hierbas sin afectar al maíz. Los resultados de ambos ensayos ponen de manifiesto, por primera vez, la contribución de los residuos de raíces de *V. faba* al control de malas hierbas asociadas al cultivo de maíz.

Palabras clave: *Vicia faba* L., raíces, fitotoxicidad, manejo de malas hierbas.

1. Introducción

La leguminosa *Vicia faba* L. (haba de mayo, haboncillo), un cultivo de invierno tradicional en zonas templadas, resulta idóneo para ser incorporado al suelo como abono verde en un programa de rotaciones gracias a su elevado aporte de N y a su rápida tasa de descomposición. Sumado a estas ventajas, nuestros estudios previos realizados en laboratorio, invernadero y campo demostraron que la biomasa aérea en floración de *V. faba*, utilizada como abono verde, posee efectos inhibitorios sobre las malas hierbas más problemáticas asociadas al cultivo de maíz en climas templados (Álvarez-Iglesias *et al*., 2014, 2015, 2018). Pero si la biomasa aérea de *V. faba* se cosecha para otros fines solamente las raíces permanecerán en el suelo. Las raíces también pueden constituir una fuente de compuestos fitotóxicos que se liberen durante su descomposición, pudiendo

participar en el control de malas hierbas (Bertin *et al*., 2003). Este estudio tiene como objetivo explorar, por primera vez, los efectos de los residuos de raíces de *V. faba* sobre malas hierbas asociadas al cultivo de maíz mediante ensayos en campo e invernadero.

2. Material y Métodos

Para valorar el posible efecto herbicida de las raíces de *V. faba*, se llevó a cabo un experimento en campo seguido de otro en condiciones de invernadero.

El ensayo de campo se llevó a cabo en dos localidades del noroeste de España. La localidad 1 (Pontevedra), costera, se caracteriza por un clima típico templado-húmedo, mientras que la localidad 2 (Ermille), de interior, presenta un clima cálido y subhúmedo. Ambas presentaban un elevado nivel de infestación de malas hierbas, con densidades medias de 2259 y 1506 plántulas m^{-2} en las localidades 1 y 2, respectivamente. En cada una de ellas se estableció una parcela de 200 m^2 que se dividió en ocho subparcelas de 3.5 m x 7.0 m. En cuatro de las subparcelas se cultivó *V. faba* cv. Prothabat 69 durante el otoño y la otra mitad se dejó en barbecho. En primavera la biomasa aérea en floración fue cosechada, permaneciendo las raíces en el suelo, y todas las subparcelas se laborearon con grada de discos. Se realizaron dos muestreos para evaluar el efecto de los residuos de raíces sobre las malas hierbas presentes en las parcelas. El primer muestreo se llevó a cabo en la segunda mitad de mayo y el segundo en la primera mitad de julio, coincidiendo, según las prácticas agronómicas típicas para el cultivo de maíz en esta zona, con el momento inmediatamente posterior a la siembra (emergencia) y con la época de establecimiento del cultivo, respectivamente. Para los muestreos se utilizaron cuatro marcos de 25 cm x 25 cm en cada subparcela distribuidos de forma aleatoria. Las plántulas de malas hierbas incluidas en cada marco de muestreo se cortaron, se clasificaron por especies, y se obtuvo la biomasa de cada una de las especies. En el primer muestreo, además, se contó el número de plántulas de cada especie. Con estos datos se determinó la contribución de especies monocotiledóneas/dicotiledóneas a la biomasa total de malas hierbas y, para el primer muestreo, la densidad de malas hierbas (número de plántulas por unidad de área).

El objetivo del ensayo de invernadero fue evaluar la duración y magnitud de los posibles efectos fitotóxicos de los residuos de raíces de *V. faba* sobre la germinación y el crecimiento temprano de maíz (*Zea mays* L.) y algunas de sus malas hierbas más problemáticas: la dicotiledónea *Amaranthus retroflexus* L. (amaranto) y las monocotiledóneas *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. (cola de caballo) y *Digitaria sanguinalis* L. (digitaria). El material vegetal para este ensayo se obtuvo de plantas de *V. faba* cv. Prothabat 69 cultivadas en invernadero. Cuando las plantas florecieron, se recuperaron las raíces del sustrato, se dejaron secar en oscuridad a temperatura ambiente, y se cortaron en fragmentos de 2 cm simulando el efecto de un laboreo de conservación. Para el ensayo se utilizaron macetas con sustrato suplementado según la dosis recomendada para cultivo de maíz. No se añadió nada más a las macetas control. En las macetas con raíces, éstas se incorporaron a una dosis de 1415 kg ha^{-1}, calculada

en base a estimaciones de biomasa radicular producida por plantas de *V. faba* a la densidad de siembra más frecuente en la zona. El efecto de los residuos de raíces se evaluó siguiendo una progresión temporal geométrica: todas las macetas utilizadas en el ensayo se prepararon al mismo tiempo, pero a los 0, 2, 4, 8, 16 y 32 días se sembraron tres macetas con 15 semillas de maíz, 25 de *A. retroflexus*, y 12 de *E. crus-galli* y de *D. sanguinalis*. Para cada tiempo de siembra, tras 10 días se obtuvo el número de plántulas y la biomasa total de cada especie.

En ambos ensayos se utilizó un diseño completamente aleatorizado. En el ensayo de invernadero, los datos de cada parámetro y tiempo de siembra se expresaron en porcentaje con respecto a su respectivo control. Todos los ensayos se analizaron empleando la prueba *t* de Student para muestras independientes.

3. Resultados y Discusión

Los resultados de los ensayos de campo, para ambas localidades y muestreos, se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Efecto de los residuos de raíces de *V. faba* sobre la densidad (plantas m^{-2}) y biomasa (kg ha^{-1}) de malas hierbas en dos localidades y dos fechas de muestreo.

Localidad 1	Emergencia				Establecimiento			
	Control	Raíces	Dif. (%)		Control	Raíces	Dif. (%)	
Densidad total	2258.7	1645.3	- 27.2					
Biomasa total	643.6	345.4	- 46.3	***	7046.0	5193.6	- 26.3	
Biomasa monocotiledóneas	608.8	311.3	- 48.9	**	6819.2	5061.2	- 25.8	
Biomasa dicotiledóneas	34.8	34.1	- 1.8		226.8	132.4	- 41.6	**
Localidad 2	Emergencia				Establecimiento			
	Control	Raíces	Dif. (%)		Control	Raíces	Dif. (%)	
Densidad total	1505.8	564.0	- 54.2					
Biomasa total	253.0	39.7	- 79.8	**	10856.6	5560.1	- 48.8	**
Biomasa monocotiledóneas	58.4	13.8	- 76.4	*	2614.0	1760.3	- 32.7	
Biomasa dicotiledóneas	194.5	25.9	- 86.7	**	8242.6	3799.7	- 53.9	**

A pesar del elevado nivel de infestación inicial, en las parcelas con presencia de raíces de *V. faba* se observaron reducciones en todos los parámetros evaluados. La magnitud de estas reducciones fue mayor para el primer muestreo (periodo de emergencia de malas hierbas). Esto indicaría que los efectos negativos sobre las malas hierbas son más importantes a corto plazo, aunque se mantienen en el segundo muestreo.

La figura 1 muestra los efectos de residuos de raíces de *V. faba* sobre las malas hierbas en invernadero, a distintos tiempos tras la incorporación de las raíces.

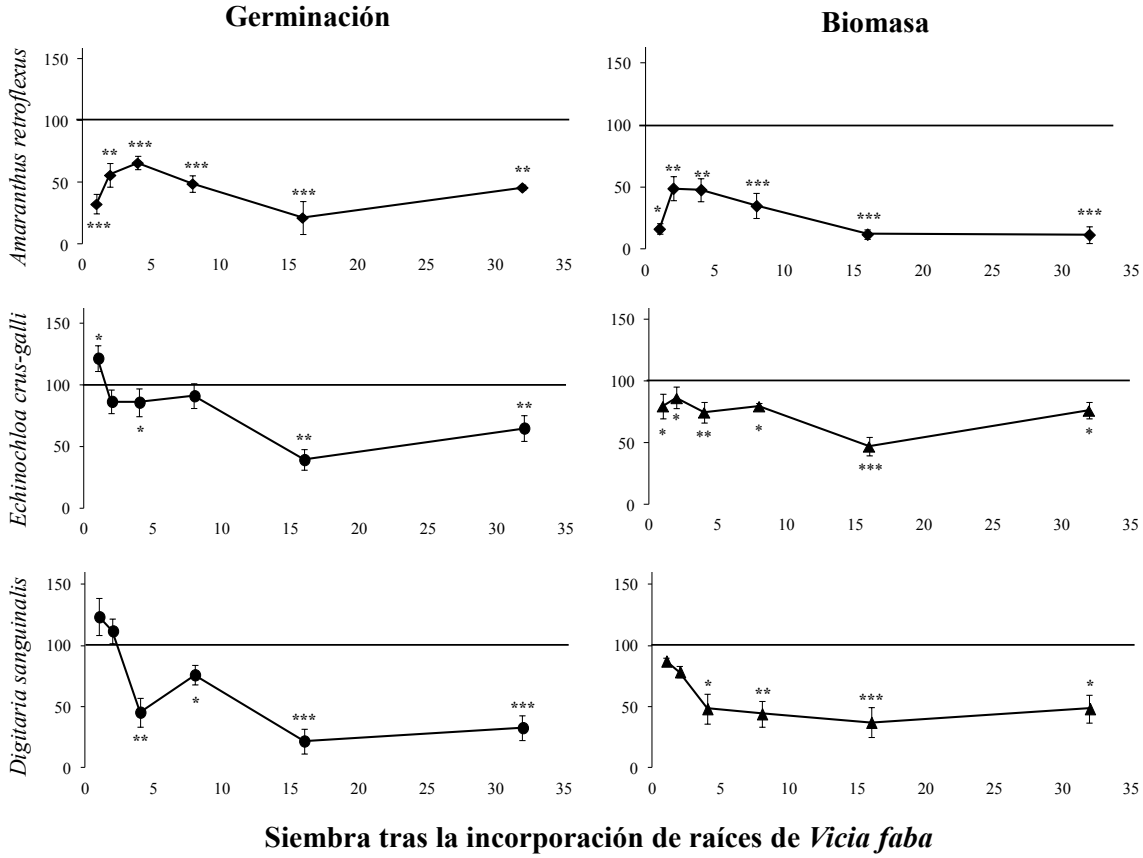


Figura 1. Efecto temporal de residuos de raíces de *V. faba* sobre la germinación y el crecimiento temprano (biomasa aérea) de tres especies de malas hierbas a los 10 días tras su siembra en invernadero. Datos en porcentaje con respecto al control (línea horizontal). Para cada parámetro y tiempo, los asteriscos representan diferencias con respecto al control: *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$.

Se observó una reducción en la biomasa de todas las especies a lo largo de todo el experimento, que para las monocotiledóneas fue mayor hacia los tiempos finales. El efecto inhibitorio sobre la germinación también fue sostenido, salvo para los momentos inmediatamente posteriores a la incorporación de las raíces en las monocotiledóneas. Los efectos negativos fueron de mayor magnitud en el caso de *A. retroflexus*. No se observó ningún efecto significativo sobre maíz, lo que descarta efectos fitotóxicos no deseables de los compuestos liberados sobre el cultivo (datos no mostrados).

En el ensayo de campo, al estudiar las relaciones monocotiledóneas / dicotiledóneas, en la localidad 1 las monocotiledóneas se vieron favorecidas en las parcelas con raíces de *V. faba*, mientras que no se observaron cambios en la localidad 2. No obstante, la localidad 1 ya mostraba una mayor abundancia de monocotiledóneas al inicio del

experimento debido a un elevado nivel de infestación por *Cyperus rotundus*. Esta aparente tendencia hacia un aumento de las monocotiledóneas es consistente con los mayores efectos negativos observados sobre *A. retroflexus* en invernadero, lo que sugiere una mayor sensibilidad de las dicotiledóneas a los efectos de los residuos de raíces de *V. faba* aunque a corto plazo no se observaran cambios evidentes en la composición de las comunidades de malas hierbas. Aun así, sería importante determinar si la presencia de residuos de raíces de *V. faba* puede causar cambios significativos mediante ensayos a largo plazo, ya que mantener la diversidad de la comunidad de malas hierbas tiene una gran importancia para el diseño y aplicación de estrategias de manejo sostenible (Bàrberi, 2002).

En nuestros ensayos previos la biomasa aérea de *V. faba* estimulaba la producción de biomasa en maíz pero también en las malas hierbas cuya emergencia no era controlada, lo que fue atribuido a su elevado contenido en N. Sin embargo en estos ensayos no se observan efectos estimulatorios, lo que sugiere que las raíces no aportaron N a los cultivos o malas hierbas subsiguientes en cantidades significativas. Los efectos negativos sobre las malas hierbas podrían atribuirse a fenómenos alelopáticos mediados por compuestos liberados por las raíces en descomposición. Demostrar esta hipótesis requiere identificar los compuestos implicados, así como su movimiento desde las raíces hasta las malas hierbas. En una primera aproximación hemos estudiado tres compuestos con actividad biológica presentes en raíces de *V. faba*: los glucósidos vicina y convicina, y el aminoácido $_{L}$-DOPA. Su concentración fue analizada por HPLC en raíces recuperadas de las macetas del ensayo de invernadero. La presencia de estos compuestos solo pudo ser parcialmente relacionada con los efectos temporales sobre las malas hierbas; sin embargo, el análisis cromatográfico reveló la presencia de varios compuestos, posiblemente derivados de los anteriores, cuya concentración guarda mayor relación con los efectos fitotóxicos. Esta es por tanto una línea que podría explorarse en busca de los compuestos responsables de los efectos observados.

4. Conclusiones

En los experimentos de invernadero y campo realizados, la presencia de raíces en descomposición de *V. faba* fue capaz de reducir la densidad y la biomasa total de malas hierbas, afectando tanto a las monocotiledóneas como a las dicotiledóneas. Los efectos negativos son más intensos poco después del inicio de la descomposición de las raíces de *V. faba*, lo que coincide con el llamado "período crítico para el control de malas hierbas" durante el cual éstas deben ser controladas de forma efectiva para evitar pérdidas significativas en el rendimiento de los cultivos. Estos resultados, junto con los obtenidos previamente para la biomasa aérea, avalarían la inclusión de *V. faba* en rotaciones con maíz como cultivo subsiguiente como parte de un programa de manejo de malas hierbas.

5. Agradecimientos

Nuestro más sincero agradecimiento al personal técnico y de finca de la MBG, cuya ayuda fue imprescindible en el mantenimiento y los muestreos de los ensayos de campo.

Referencias

ÁLVAREZ-IGLESIAS L, PUIG CG, GARABATOS A, REIGOSA MJ & PEDROL N (2014) *Vicia faba* aqueous extracts can suppress weeds and enhance crops. *Allelopathy Journal* **34**, 299-314.

ÁLVAREZ-IGLESIAS L (2015) *Vicia faba* L. for weed control: from biochemical evidences to field application. PhD thesis, Universidad de Vigo, Vigo, España.

ÁLVAREZ-IGLESIAS L, PUIG CG, REVILLA P, REIGOSA MJ & PEDROL N (2018) Faba bean as green manure for field weed control in maize. *Weed Research* **58**, 437-449.

BÀRBERI P (2002) Weed management in organic agriculture: are we addressing the right issues? *Weed Research* **42**, 177-193.

BERTIN C, YANG X & WESTON LA (2003) The role of root exudates and allelochemicals in the rizosphere. *Plant and Soil* **256**, 67-83.

Effects of *Vicia faba* L. root residues on weed control

Summary: Previous studies have shown the negative effect of the legume *Vicia faba* aerial biomass on weeds. But if this aerial biomass is harvested, only root residues will remain into the soil where, during decomposition, may release compounds with phytotoxic effects on surrounding weeds. With the aim to study this possibility, field experiments on two locations, as well as a greenhouse experiment, were conducted. Under field conditions, *V. faba* root residues reduced weed density and total biomass, affecting both monocotyledon and dicotyledon weeds. The greenhouse experiment evaluated the short-term effects of *V. faba* root residues on maize and some accompanying weeds. Root residues reduced both germination and early growth of all weeds, without negative effects on maize. Greenhouse and field experiments revealed negative effects of *V. faba* root residues on some maize-associated weeds, this being the first study to examine these effects.

Keywords: *Vicia faba* L., roots, phytotoxicity, weed management.

Efecto de dos hidroacolchados en la emergencia de propágulos de cuatro especies arvenses y ruderales

MORALES I, MAS MT, VERDÚ AMC

Departament d'Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia, Escola Superior d'Agricultura de Barcelona, Universitat Politècnica de Catalunya. Av. Esteve Terradas 8, 08860 Castelldefels, Barcelona, ESPAÑA.
maite.mas@upc.edu, amc.verdu@upc.edu

Resumen: El objeto inicial de este estudio ha sido conocer el efecto causado por dos hidroacolchados, compuestos ambos por pasta de papel mezclada con yeso, y o con paja o cascarilla de arroz, en la inhibición de la germinación de las semillas o el impedimento de la emergencia de las plántulas de cuatro especies consideradas como malas hierbas: *Amaranthus retroflexus* L., *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop., *Lactuca serriola* L. y *Sonchus oleraceus* L.. Se realizó un ensayo en condiciones controladas para comparar el efecto de los hidroacolchados respecto a un control, así como comparar el comportamiento de los hidroacolchados que diferían por estar compuestos a base de paja o de cascarilla de arroz, considerando dos grosores distintos. Para ello se cuantificó la proporción de semillas cuya germinación o emergencia fue inhibida, discriminando dos posibilidades: la inducción a un estado de latencia de la semilla o un fracaso en la emergencia de la plántula debido a que no haya sido capaz de atravesar la barrera física impuesta por el hidroacolchado. Se constató una notable reducción en la emergencia de plántulas, puesto que el porcentaje de plántulas emergidas en hidroacolchado fue de un 15,2 % en *A. retroflexus*, 11,4% en *D. sanguinalis*, 12,4% en *L. serriola* y 11,6% en *S. oleraceus*. A partir de las pruebas de viabilidad realizadas al final del ensayo fue posible deducir que, de forma general, el efecto causado por el hidroacolchado fue la inducción de las semillas a un estado latente. El hidroacolchado compuesto de paja fue significativamente más eficaz en términos de inhibición de emergencia que el compuesto de cascarilla de arroz.

Palabras clave: Acolchado líquido, germinación, viabilidad, dormición

1. Introducción

Para el control de malas hierbas, el método más utilizado actualmente son los herbicidas. Su uso excesivo ha resultado problemático, por ejemplo, por la contaminación de superficies (Spalding *et al.*, 2003) así como por suponer riesgos para la salud humana (EPA, 2007). Los hidroacolchados, mezclas pastosas con un alto contenido en agua y diferentes materiales biodegradables, como pasta de papel, algodón, paja, cascarilla de arroz, etc., se están estudiando desde hace una década como una posibilidad más de controlar malas hierbas en algunos cultivos y circunstancias (Warnick *et al.*, 2006). En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue cuantificar el efecto causado por dos hidroacolchados distintos, aplicados en dos grosores, en la emergencia de plántulas de cuatro especies de malas hierbas: *Amaranthus retroflexus* L., *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop., *Lactuca serriola* L. y *Sonchus oleraceus* L.

2. Material y Métodos

Los propágulos de las cuatro especies, a los que nos referiremos de ahora en adelante como semillas, se recolectaron por lo menos un año antes de los ensayos en campos de cultivo de Caldes de Montbui y de Castelldefels (Barcelona) y se almacenaron en seco en condiciones de laboratorio. Se trata de núculas de *A. retroflexus*, espiguillas de *D.sanguinalis*, aquenios de *L. serriola*, y aquenios de *S.oleraceus.* Previo a empezar cada ensayo, las semillas se sumergieron en NaClO al 5% durante 10 minutos y se lavaron con agua destilada.

Se realizó un primer ensayo de germinación en placas de Petri humedecidas con agua destilada que supuso el control con el que se compararían los resultados obtenidos con los hidroacolchados, ya que las condiciones ambientales fueron las mismas. Se trabajó con 5 placas de Petri con 50 semillas cada una para cada especie. El régimen térmico y lumínico fue de 25ºC constantes y 12h luz/12h oscuridad. Pasados 30 días se obtuvo el número de semillas germinadas. El test del tetrazolio (ISTA, 1985) sirvió para conocer qué proporción de las semillas no germinadas eran viables.

Los hidroacolchados difirieron solamente en un componente, el lignocelulósico, que fue paja de cereal en un caso y cascarilla de arroz en el otro. Todos se prepararon con pasta de papel reciclado proporcionado por la empresa Saica y yeso en idénticas proporciones. En el laboratorio se mezclaron los componentes con un agitador mecánico. Cada mezcla se colocó en un molde de 30 x 30 cm conectado a una bomba de vacío para extraer parte del agua, de forma que quedó una pasta moldeable que se subdividió en unidades de 5 cm x 5 cm. Posteriormente cada unidad se colocó en alveolos de 5 cm de altura y 5 x 5 cm de boca que contenían: 4 cm de grosor de vermiculita humedecida, papel de filtro finamente agujereado, y 50 semillas cada uno. Se prepararon hidroacolchados de un grosor aproximado de 1cm y, reduciendo las cantidades a la mitad, hidroacolchados de 0,5 cm de grosor.

Se usaron 6 replicas de cada situación experimental, 24 alveolos y 1200 semillas por especie, dispuestos siguiendo un diseño experimental completamente aleatorizado. Los alveolos se situaron en una cámara de germinación en las mismas condiciones de temperatura e iluminación que las usadas en el ensayo en placas de Petri, y se humedecieron también cuando fue necesario. Durante 30 días se hicieron recuentos periódicos de las plántulas emergidas, que se fueron extrayendo. Posteriormente se recuperaron las semillas bajo el hidroacolchado, se hicieron recuentos de las germinadas no emergidas. La fracción de semillas no germinada de cada alveolo se trasladó a una placa de Petri y durante una semana se observaron y contaron las semillas germinadas, y finalmente el test del tetrazolio sirvió para conocer qué proporción de las semillas no germinadas eran viables.

Las distintas proporciones obtenidas se transformaron mediante la función arcoseno y se sometieron a análisis de la varianza y comparaciones de medias (Tukey al 95% de confianza) mediante con el procedimiento GLM de SAS® Basic Edition versión 3.6 (2017). Para cada especie, pero también para todas en conjunto, las fuentes de variación tenidas en cuenta fueron el tipo de hidroacolchado y el grosor, ambos con dos niveles, y la interacción entre ambos.

3. Resultados y Discusión

En el ensayo en placas de Petri los porcentajes promedio de semillas germinadas respecto a semillas viables fueron del 98% en *A. retroflexus*, del 96,5% en *D. sanguinalis*, del 97,2% en *L. serriola* y del 99,5% en *S. oleraceus*.

Considerando las cuatro especies, el factor de variación hidrocolchado y el factor grosor fueron muy significativos en la proporción de plántulas emergidas (Tabla 1). El hidroacolchado compuesto por paja obtuvo los mejores resultados en la supresión de la emergencia (Tabla 2). Este hecho puede ser debido a la diferencia de densidades entre los dos tipos de hidroacolchados, siendo el de paja el más compacto. Para la variable más interesante desde el punto de vista del control, la proporción de semillas germinadas no emergidas, el factor tipo de acolchado no fue significativo y las medias de los dos niveles, paja o cascarilla de arroz, fueron muy similares. En cuanto al grosor, como era de esperar, el grueso fue más efectivo que el fino en la reducción de la emergencia.

Tabla 1. Significación de los factores principales y de la interacción en el análisis de la variancia del arcoseno del tanto por uno de las plántulas emergidas (E) durante el experimento, semillas germinadas no emergidas (GNE) y semillas viables no germinadas (V). GNE y V se obtuvieron al finalizar el experimento una vez retirado el hidroacolchado.

Factor	E	GNE	V
Hidroacolchado	0,0009	0,7334	0,0635
Grosor	<,0001	0,8972	0,1843
Hidroacolchado x Grosor	0,0021	0,4293	0,2255

Tabla 2. Valores medios del porcentaje de plántulas emergidas (E) durante el ensayo, semillas germinadas no emergidas (GNE), y semillas viables no germinadas (V) en los distintos niveles de los factores tipo de hidroacolchado y grosor. GNE y V se obtuvieron al finalizar el experimento una vez retirado el hidroacolchado.

Factor	E	GNE	V
Componente cascarilla de arroz	18,5	31,8	49,7
Componente paja de cereal	8,2	32,0	59,8
Hidroacolchado grueso	6,6	33,1	60,3
Hidroacolchado fino	19,5	30,8	49,7

Comparando los resultados obtenidos en los dos ensayos y tomando como definición de latencia secundaria aquella inducida a las semillas no latentes por condiciones desfavorables para la germinación (Benech-Arnold *et al.*, 2000) podemos deducir que el efecto provocado por el hidroacolchado a las semillas de *A. retroflexus*, *D. sanguinalis* y *S. oleraceus* fue el de una inducción de una latencia secundaria (Tabla 2). En el caso de *L. serriola*, la proporción más alta fue la de plántulas germinadas no emergidas.

Tabla 3. Valores medios y errores estándar (entre paréntesis) de los porcentajes de plántulas emergidas (E) de cada especie durante el ensayo, semillas germinadas no emergidas (GNE), semillas viables (V) y semillas viables no latentes (VNL). GNE, V y VNL se obtuvieron al finalizar el experimento una vez retirado el hidroacolchado. N indica el número de muestras.

Especie	N	E	GNE	V	VNL
Amaranthus retroflexus	23	15,2 (3,18)	29,8 (4,32)	55,0 (3,40)	19,7 (3,72)
Digitaria sanguinalis	24	11,4 (2,26)	23,1 (1,86)	65,6 (2,29)	0,4 (0,25)
Lactuca serriola	23	12,4 (4,11)	52,7 (5,21)	34,9 (6,35)	17,2 (3,41)
Sonchus oleraceus	23	11,6 (3,75)	30,7 (4,46)	57,8 (5,66)	53,3 (5,26)

A partir de la proporción de semillas viables no latentes es posible dilucidar cuál fue el factor relevante en la inducción e interrupción de la latencia en cada caso. Para *A. retroflexus*, se conoce que el requerimiento de luz es necesario (Baskin & Baskin, 1977) y por lo tanto se puede atribuir la inducción de un estado de latencia a la falta de luz bajo el hidroacolchado. *L. serriola* presentó resultados similares a *A. retroflexus*, y se pudo comprobar su alta sensibilidad a la luz a la hora de germinar. Para *S. oleraceus,* sin embargo, un 93,2 % del total de semillas viables fueron no latentes, por tanto, puede deducirse que el hidroacolchado no indujo a un estado de latencia secundaria a las semillas de esta especie, sino que no germinaron porque no les llegó suficiente estímulo lumínico, en concordancia con los resultados obtenidos por Chauhan *et al* (2006). En *D. sanguinalis*, en cambio, sólo un 0,4% de semillas viables totales germinaron con la exposición a la luz, pero más de un 65% eran viables, lo que denota una clara inducción a una latencia secundaria.

4. Conclusiones

El hidroacolchado que ha presentado mejores resultados globales en la reducción de la emergencia fue el compuesto por paja con un valor que supera el 90% de reducción respecto al control sin acolchado. Esta reducción se debió de forma más notable a la inducción a un estado de latencia que a la barrera física que supone el hidroacolchado para las plántulas provenientes de semillas no latentes. En general, la proporción de semillas no germinadas bajo acolchado puede atribuirse a que éste reduce en cierta proporción el paso de la luz, que es un estímulo necesario para la germinación de semillas de varias especies de malas hierbas.

5. Referencias

BASKIN CC & BASKIN JM (1977) Role of temperature in the germination ecology of three summer annual weeds. Oecologia **30**: 377-382.

BENECH-ARNOLD RL, SANCHEZ RA, FORCELLA F, KRUK BC, GHERSA CM (2000) Enviromental control of dormancy in weed seed banks in soill depth. Field Crops Research **37**: 105-122.

CHAUHAN BS, GILL G, PETERSON C (2006) Factors affecting seed germination of annual sowthistle (*Sonchus oleraceus*) in southern Australia. Weed Science **54**: 854 – 860.

EPA (Environmental Protection Agency) (2007) Environmental Topics. Office of Research and Development, Washington DC, USA. [Fecha consulta: 10 junio 2018]. Disponible en: httpps://www.epa.gov/environmental-topics.

ISTA (International Seed Testing Association) (1985) International rules for seed testing. Rules and annexes. Seed Science Technology **13**: 299-515.

SPALDING RF, WATTS DG, SNOW DD, CASSADA DA, EXNER ME, SCHEPERS JS (2003) Herbicide loading to shallow ground water beneath Nabraska's management system evaluation area. Journal of Environmental Quality **32**: 84-91.

WARNICK JP, CHASE CA, ROSSKOPF EN, SIMONNE EH, SCHOLBERG JM, KOENIG RL, ROE NE (2006) Weed suppression with hydramulch, a biodegradable liquid paper mulch in development. Renewable Agriculture and Food Systems **21**: 216 – 223.

Hydromulch effect on the emergence of four common weeds

Summary: The aim of the present study was to know the effect of hydromulches, composed by paper pulp, plaster and either straw or rice husk, on the germination inhibition or emergence impediment of four common weeds: *Amaranthus retroflexus* L., *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop., *Lactuca serriola* L. and *Sonchus oleraceus* L. An experiment under controlled conditions was carried out in order to recognise the effect of the presence of hydromulch layer, as well as comparing the behaviour of the two different hydromulchs that differed in one of the components (straw or rice husk), and considering also two different thicknesses. In addition, the study quantified the amount of seeds that their germination or emergence was inhibited, distinguishing two possibilities: either dormant state induction or an emergence failure. There was a conspicuous reduction in the emergence of seedlings. Mean percentages of seedlings emerged under hydromulch were 15.2 % in *A. retroflexus*, 11.4% in *D. sanguinalis*, 12.4% in *L. serriola* y 11.6% in *S. oleraceus*. Respect to seeds remaining under the hydromulch layer and after performing a tetrazolium test, it was possible to deduce that hydromulch caused the induction of dormancy in many seeds. Hydromulch composed by straw was significantly more efficient acting as an obstacle to seedling emergence.

Keywords: liquid mulch, germination, viability, dormancy

Diversidad y composición de la flora arvense según su manejo en campos de cítricos en la comarca de Camp de Túria (Valencia)

VERDEGUER M[1], MARTÍNEZ P[2], FERRIOL M[3].

[1, 2, 3] Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universitat Politécnica de València, Camino de Vera, s/n, 46020, Valencia, SPAIN.
merversa@doctor.upv.es, pabmarb3@etsia.upv.es, mafermo@upvnet.upv.es

Resumen: En la comarca de Camp de Turia (Valencia), los cítricos son el principal cultivo en regadío. En estos campos, se emplean distintos métodos para el manejo y control de la flora arvense, incluyendo el tratamiento con herbicidas químicos, la siega, a veces combinada con el uso de herbicidas, el laboreo, o la ausencia de actuaciones. El objetivo del presente trabajo es caracterizar la flora arvense presente en estos campos en función de los métodos empleados para su gestión. Para ello, se realizaron inventarios florísticos en campos situados en distintos términos municipales de la comarca. Posteriormente, se comparó la riqueza en especies y la composición de la flora arvense desde el punto de vista botánico, biotípico y biogeográfico en función del manejo de los campos. En la totalidad de las parcelas, se identificaron 127 especies pertenecientes a 34 familias botánicas, predominando Poaceae y Asteraceae. Atendiendo al tipo de hábitat, más del 80% de las especies eran indicadoras de herbazales y pastizales nitrófilos y subnitrófilos. Respecto a las áreas de distribución de los taxones, el origen biogeográfico mediterráneo fue el predominante en todos los sistemas de manejo, seguido por los orígenes cosmopolita y subcosmopolita y por último el exótico.

Palabras clave: biodiversidad, cítricos, gestión de arvenses, inventario florístico, malherbología.

1. Introducción

La flora arvense de los cultivos de cítricos ha recibido una cierta atención (Boira y Carretero, 1992) por varias razones: desde el punto de vista productivo, la abundancia de estas especies puede provocar fenómenos indeseables de competencia, sobre todo cuando los árboles son jóvenes, y en árboles adultos en los momentos de mayor demanda energética (floración y fructificación). Por otra parte, algunas especies arvenses pueden ser huéspedes de organismos parásitos de los cítricos y convertirse en focos potenciales de plagas y enfermedades (Mas y Verdú, 2005). Sin embargo, las plantas arvenses también pueden atraer u hospedar insectos beneficiosos como enemigos naturales de plagas, reciclar elementos nutritivos, impedir la erosión edáfica,

aumentar la actividad microbiológica en el suelo y ayudar a mantener el contenido en materia orgánica del mismo. Por tanto, el manejo de las especies arvenses es objeto de controversia en la agricultura. Se pueden emplear diferentes sistemas de manejo de las plantas arvenses en los cítricos. Los más utilizados son: gestión integrada (promovida por la Unión Europea, ha sustituido desde 2014 al antiguo manejo convencional), producción integrada (tratamiento químico permitido, combinado o no con siegas), o manejo en ecológico (consiste fundamentalmente en realizar siegas).

Según el Real Decreto 1311/2012, de 14 de septiembre, por el que se establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios, la gestión integrada consiste en el examen cuidadoso de todos los métodos de protección vegetal disponibles y la posterior integración de medidas adecuadas para evitar el desarrollo de poblaciones de organismos nocivos con el objeto de mantener el uso de productos fitosanitarios y otras formas de intervención en niveles que estén económica y ecológicamente justificados y que reduzcan o minimicen los riesgos para la salud humana y el medio ambiente. Pone énfasis en conseguir el desarrollo de cultivos sanos con la mínima alteración posible de los agroecosistemas y en la promoción de los mecanismos naturales de control de plagas.

La producción integrada nace como un sistema agrícola que utiliza al máximo los recursos y los mecanismos de regulación naturales y asegura a largo plazo una agricultura sostenible con el medio ambiente. Los métodos biológicos, químicos y otras técnicas de gestión son cuidadosamente elegidos teniendo en cuenta la protección ambiental, la rentabilidad económica y las exigencias sociales. En el ámbito nacional, la producción integrada de productos agrícolas está regulada por el Real Decreto 1201/2002, de 20 de noviembre. El control de las arvenses en producción integrada se debe de realizar con medios mecánicos siempre que sea posible. Solo se utilizan herbicidas de forma localizada, en los casos en los que no se puedan controlar con maquinaria agrícola, y las materias activas a utilizar se deben consultar en el Reglamento de Producción Integrada.

La agricultura ecológica se encuentra regulada legalmente en España desde 1989, en que se aprobó el Reglamento de la Denominación Genérica "Agricultura Ecológica", que fue de aplicación hasta la entrada en vigor del Reglamento (CEE) 2092/91 sobre la producción agrícola ecológica. Actualmente, desde el 1 de enero de 2009, la producción ecológica se encuentra regulada por el Reglamento (CE) 834/2007 del Consejo, de 28 de junio de 2007, sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos. En la actualidad la citricultura ecológica representa el 2,1% de la producción total de cítricos a nivel nacional (MAGRAMA, 2014).

El objetivo del presente trabajo fue determinar las posibles diferencias en la composición específica de la flora arvense en el cultivo de cítricos en la comarca del Camp de Turia, en función de los diferentes manejos de la misma: gestión integrada, producción integrada (con siegas y herbicidas o únicamente con siegas), agricultura

ecológica y en proceso de abandono, atendiendo a la riqueza específica, a los hábitats, al origen biogeográfico y al tipo biológico.

2. Material y Métodos

Se realizaron inventarios de flora arvense en los municipios de Bétera, Líria y San Antonio de Benagéber, pertenecientes a la comarca de El Camp de Túria (Figura 1). Esta comarca está situada al norte de la provincia de Valencia, constituyendo sus límites naturales la Sierra de la Calderona al norte, las últimas alineaciones ibéricas de la Sierra de Javalambre al oeste y el río Túria al sur.

Los campos de cítricos muestreados se seleccionaron en función de los diferentes manejos que se llevaban a cabo sobre la flora arvense: 1) parcelas de cítricos en ecológico (siegas de arvenses), 2) parcelas en producción integrada en las que se realizaba siega de arvenses en mitad de la calle y se aplicaba herbicida en la meseta, 3) parcelas con gestión integrada (hasta hace 2 años manejo con herbicidas de síntesis), 4) parcelas en proceso de abandono, aunque se continuaban regando para el autoconsumo de cítricos. Para la búsqueda de las parcelas se confeccionó un cuestionario que se proporcionó a diversas cooperativas, explotaciones y agricultores de la zona. Finalmente, se seleccionaron 11 parcelas en ecológico (Bétera), 9 parcelas en producción integrada con siegas y herbicida en meseta, 12 parcelas en gestión integrada (antes manejo con herbicidas) y 5 parcelas en proceso de abandono.

La identificación de las especies vegetales encontradas en los inventarios levantados en la zona de estudio se llevó a cabo utilizando diversos manuales de determinación de flora (Mateo y Crespo, 2009; Bolós y Vigo, 2001). Todos los taxones encontrados se ordenaron alfabéticamente por familias y géneros. Para cada uno de ellos se indicaron los siguientes parámetros (Mateo y Crespo, 2009; Bolós y Vigo, 2001; Universitat de les Illes Balears, 2016): Ecología, Corología y Tipo biológico (Raunkiaer, 1934).

3. Resultados y Discusión

En la totalidad de las parcelas, se identificaron 127 especies pertenecientes a 34 familias botánicas. Las dos predominantes fueron Poaceae y Asteraceae, que en conjunto englobaron un 35% de las especies. Estos valores son muy similares a los obtenidos en la caracterización de la flora arvense de parcelas de mandarino en el delta del Ebro (Mas y Verdú, 2005). Se encontró un mayor número de especies en las parcelas con manejo ecológico de arvenses (74 especies), seguido por las parcelas abandonadas (58), las de producción integrada (PI) con siegas y herbicidas (44), y por último las de gestión integrada (GI) con empleo de herbicidas (29). Estos resultados están de acuerdo con los numerosos estudios que demuestran que la agricultura ecológica favorece la biodiversidad de las plantas asociadas a los cultivos (Gibson *et al*., 2007).

Atendiendo al tipo de hábitat, más del 80% de las especies fueron indicadoras de herbazales y pastizales nitrófilos y subnitrófilos (Figura 1 A). El manejo ecológico fue el que mayor diversidad de hábitats presentó, de acuerdo con estudios previos (Pfiffner

y Balmer, 2011). Le siguieron los campos de cítricos abandonados, en los que se observó un porcentaje notable de especies indicadoras de terrenos baldíos, propias de los primeros estadios de la sucesión secundaria. En GI se obtuvo un incremento de especies propias de bosques debido a la presencia de especies fanerófitas lianoides.

Respecto a las áreas de distribución de los taxones, el origen biogeográfico mediterráneo fue el predominante en todos los sistemas de manejo, seguido por los orígenes cosmopolita y subcosmopolita y por último el exótico (Figura 1 B). El hecho de que muchas plantas arvenses tengan en común su origen cosmopolita o exótico es debido a que en las comunidades nitrófilas muy alteradas por el hombre se refugian especies alóctonas que encuentran una menor competencia por parte de las plantas autóctonas (Conesa, 1997). En los campos de cítricos abandonados y en los ecológicos se observó un mayor porcentaje de taxones mediterráneos respecto al resto, debido a una mayor presencia de especies de hábitats naturales por el desarrollo de una sucesión secundaria en el primer caso y a la presencia de un mayor número de tipos de hábitats en el segundo. En los sistemas de manejo en los que se aplican herbicidas (GI), la aplicación de las distintas materias activas provoca una reducción de taxones mediterráneos y un aumento de cosmopolitas-subcosmopolitas y exóticos, propios de las arvenses más resistentes.

Atendiendo a la forma vital, en todos los sistemas de manejo las especies terófitas representaron un porcentaje superior al 50% (Figura 1 C). Este resultado está de acuerdo con estudios previos que muestran que la mayoría de las especies arvenses son fundamentalmente terófitas y en un menor grado hemicriptófitas y geófitas. Estos tres biotipos son capaces de sobrevivir a las lesiones mecánicas y continuas perturbaciones del suelo, propios de la actividad agrícola (Sans, 2005). Sin embargo, se observaron ligeras diferencias entre los diferentes sistemas de manejo. Los caméfitos, como es lógico, se observaron fundamentalmente en aquellos manejos donde no se segaba, mientras que los fanerófitos fueron relativamente más abundantes en los campos abandonados y en GI con tratamientos herbicidas. No obstante, mientras en los campos abandonados se observaron fanerófitos mediterráneos arbustivos, como el lentisco, propios de una sucesión secundaria, en los tratados con herbicidas los fanerófitos presentes eran lianoides o escandentes, como *Rubia peregrina* y *Araujia sericifera*, considerada alóctona invasora (Elorza *et al*., 2004**)**. Por otra parte, en los sistemas de manejo ecológico en los que se realizaban siegas, los hemicriptófitos y geófitos en su conjunto fueron más abundantes relativamente que en los que no se segaba. Esto es debido a que ambos tipos biológicos mantienen sus órganos perdurantes al nivel del suelo o por debajo de éste, no llegando a eliminarlos con la siega. Estos resultados son similares a los obtenidos en el Delta del Ebro (Mas y Verdú, 2005), donde las especies terófitas presentaron un porcentaje superior al 50% de las especies totales, seguidas por las especies hemicriptófitas, con un porcentaje superior al 15%, y, por último, las especies geófitas, fanerófitas y caméfitas, que mostraron unos porcentajes similares más reducidos.

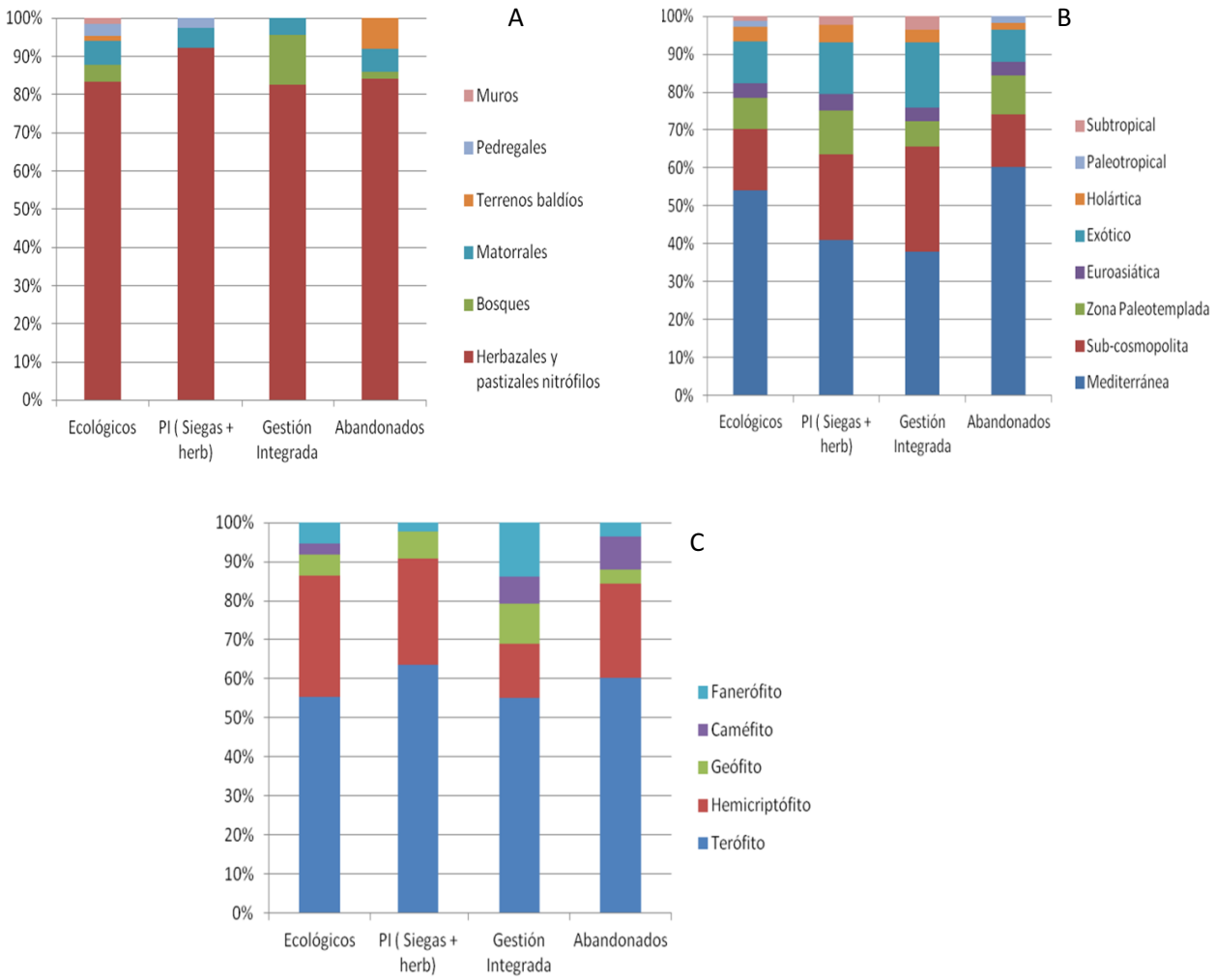


Figura 1. Porcentaje de especies (en el eje de ordenadas) para cada sistema de manejo de arvenses respecto a: A. Tipo de hábitat, B. Origen biogeográfico y C. Tipo biológico.

Referencias

BOIRA H & CARRETERO JL (1992) Aspectos ecológicos de la vegetación arvense de los cítricos. En: Actas 1992 *Congreso de la Sociedad Española de Malherbología*.

BOLÓS O & VIGO J (2001) *Flora dels Paisos Catalans*. Ed. Barcino.

CONESA JA (1997) *Tipología de la vegetació: anàlisi i caractertització*. Universitat de Lleida.

ELORZA M, DANA ED, SOBRINO E (2004) *Atlas de las plantas alóctonas invasoras de España*. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid.

GIBSON RH, PEARCE S, MORRIS RJ, SYMONDSON WOC & MEMMOT J (2007) Pland diversity and land use cover under organic and conventional agriculture: a whole form approach. *Journal of applied ecology* **44**: 792-803.

MAGRAMA (2014) *Agricultura ecológica, estadísticas 2013*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medioambiente.

MAS MT & VERDÚ AMC (2005) Biodiversidad de la flora arvense en cultivos de mandarino según el manejo del suelo en las interfilas. *Boletín de sanidad vegetal. Plagas* **31** Nº 2: 231-242

MATEO G & CRESPO MB (2009) *Manual para la determinación de la flora valenciana*. Edición 4. Ediciones Librería Compás. Alicante.

PFIFFNER L & BALMER O (2011) *Factsheet organic agriculture and biodiversity*. www.shop.fibl.org.

RAUNKIAER C (1934) *The life forms of plants and statistical plant geography*. Oxford University Press.

SANS FX (2005) Biología, ecología y control de malas hierbas. Apuntes Módulo VIII. Máster de Agricultura Ecológica. Universitat de Barcelona.

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS (2016). Herbari Virtual del Mediterrani Occidental, http://herbarivirtual.uib.es/, accedido mayo 2016.

Diversity and composition of the weed populations in citrus orchards according to its management in the Camp de Túria region (Valencia)

Summary: In the region of Camp de Turia (Valencia), citrus fruits are the main irrigated crop. In these fields, different methods are carried out for the management and control of weeds, including treatment with chemical herbicides, mowing, sometimes combined with the use of herbicides, tillage, or the absence of actions. The objective of the present work is to characterize the weeds present in these fields according to the methods used for their management. For this, floristic inventories were carried out in fields located in different municipal areas of the region. Subsequently, the species were compared from the botanical, biotypical and biogeographic point of view depending on the management of the fields. In all the plots, including the different management studies, 127 species belonging to 34 botanical families were identified. The two predominant families were Poaceae and Asteraceae. Considering the type of habitat, more than 80% of the species were indicators of grasslands and nitrophilous and subnitrophilous pastures. Regarding the distribution areas of taxa, the Mediterranean biogeographical origin was the predominant in all management systems, followed by the cosmopolitan and sub cosmopolitan origins and finally the exotic.

Keywords: biodiversity, citrus, weed management, floristic inventory, weed science

Efecto de la aplicación de una enmienda orgánica sobre la eficacia de herbicidas y la producción en el cultivo del arroz

SANTÍN-MONTANYÁ MI[1], CONTRERAS JM[2], JIMÉNEZ-RUIZ J[3], PATIÑO-ROPERO MJ[3], SEVILLA-MORÁN B[3], SANDÍN-ESPAÑA P[3]

[1] Dpto de Medio Ambiente y Agronomía, INIA, Madrid, España.
isantin@inia.es
[2] Agricultural Research Station Utrera, BASF ESPAÑOLA S.L., Utrera, España.
juan-manuel.contreras@basf.com
[3] Unidad de Productos Fitosanitarios, INIA, Madrid, España.
jruiz.jesus@inia.es, mjose.patino@inia.es, bsmoran@inia.es, sandin@inia.es

Resumen: En este trabajo se ha estudiado el efecto de la aplicación de una enmienda orgánica comercial (compost de alperujo) en la eficacia de dos herbicidas empleados en el cultivo del arroz, y en la calidad final del grano en condiciones de campo. Para realizar este estudio comparativo se instaló un ensayo de campo en Utrera, Sevilla y se seleccionaron dos herbicidas de pre- y post-emergencia, pendimetalina y profoxidim, en presencia y ausencia de la enmienda. Las determinaciones fueron la cuantificación de los tallos y la determinación del peso fresco y seco de las malas hierbas presentes y del cultivo. Al final del ensayo, se tomó humedad y rendimiento de cosecha. En determinados momentos del ciclo del cultivo, los resultados obtenidos mostraron que las parcelas abonadas con compost presentaron mayor control de malas hierbas que las parcelas con abonado convencional. Asimismo, el tratamiento combinado de herbicidas (pre- y post-emergencia) fue más eficaz que la aplicación por separado para controlar las malas hierbas del arroz. El efecto de la enmienda y los tratamientos herbicidas no mostraron diferencias significativas en los parámetros medidos durante la formación del fruto y al final de la cosecha.

Palabras clave: Compost de alperujo, control herbicida, *Echinochloa* spp., *Leptochloa* spp., rendimiento

1. Introducción

En España, la mayor superficie cultivada de arroz se encuentra en Andalucía, con aproximadamente 38.000 ha, en zonas cercanas a humedales naturales, en las cuales el manejo agronómico se realiza acorde a las normas de producción integrada. Actualmente, la intensificación agrícola realizada en el cultivo del arroz, demanda la utilización de métodos respetuosos con el medio que permitan, a su vez, obtener productos de calidad.

El empleo de enmiendas orgánicas se ha descrito como una opción interesante en agricultura para mejorar la fertilidad del suelo, entre otros beneficios potenciales como el secuestro de carbono o el aumento de la biodiversidad del suelo.
Algunos estudios indican que el uso de compost, como enmienda orgánica en un suelo agrícola, puede mejorar parámetros tanto de la planta como del suelo. Martínez-Blanco *et al.* (2013) reportaron una mayor producción con la inclusión del compost y Diacono y Montemurro (2010) mostraron que la adición de compost aumentó el contenido de materia orgánica, mejorando así la estructura del suelo.
Sin embargo, la biodisponibilidad y eficacia de los herbicidas puede verse reducida por la adición de enmiendas orgánicas al suelo (Sopeña *et al.*, 2012). En este contexto, la información respecto al efecto de la aplicación del compost en la supresión de malas hierbas es escasa, así como su efecto sobre la producción en este cultivo.
El propósito de este estudio fue estudiar, en condiciones de campo, el efecto de la aplicación de una enmienda orgánica, compost de alperujo, sobre la eficacia de herbicidas empleados en el arroz, así como en su rendimiento al final de la cosecha.

2. Material y Métodos

En un ensayo de campo en la finca El Coronil, perteneciente a la empresa BASF (Utrera, Sevilla), se llevó a cabo un estudio comparativo de la eficacia de dos herbicidas seleccionados en presencia y ausencia de una enmienda orgánica en cultivo de arroz, variedad Puntal sembrada a 120 Kg ha^{-1}. Se utilizaron las formulaciones comerciales de un herbicida de pre-emergencia Stomp Aqua (455 g pendimetalina l^{-1}), un herbicida de post-emergencia Aura (200 g profoxidim l^{-1}), aplicado siempre con Dash (0,75 l ha^{-1}), y la combinación de ambos herbicidas comparando con un testigo sin tratamiento herbicida (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos aplicados en el ensayo de campo.

Compost	Abono tradicional
1. Testigo (NO herbicida)	1. Testigo (NO herbicida)
2. Stomp Aqua (2,5 l ha^{-1})	2. Stomp Aqua (2,5 l ha^{-1})
3. Aura (0,75 l ha^{-1}) + Dash (0,75 l ha^{-1})	3. Aura (0,75 l ha^{-1}) + Dash (0,75 l ha^{-1})
4. Stomp Aqua + Aura + Dash (0,75 l ha^{-1})	4. Stomp Aqua + Aura + Dash (0,75 l ha^{-1})

La enmienda orgánica consistió en un compost comercial de alperujo que se distribuyó como abono de fondo (7000 kg ha-1). En las parcelas sin compost se realizó la fertilización tradicional de fondo con un abono mineral (14-10-16) (103 kg ha-1), y en cobertera a 185 kg ha-1. Tanto el bloque de abono tradicional como el de compost recibieron 185 kg ha-1 de fertilizante nitrogenado nítrico amoniacal soluble con un 34,5% de riqueza de nitrógeno.
El diseño experimental consistió en un diseño de bloques completamente al azar con cuatro repeticiones. La superficie total del ensayo de campo fue de 1925 m2, con un total de 32 parcelas (7,5 m x 6 m), 16 con compost y 16 sin compost.
La estimación de la eficacia de los tratamientos herbicidas se realizó mediante 5 evaluaciones visuales (V1-V5), en distintos momentos fenológicos del cultivo de arroz, desde su emergencia (BBCH 12-21) hasta la floración (BBCH 89), y se determinó el porcentaje de control de las malas hierbas objetivo en cada tratamiento empleado,

Echinochloa spp. y/o *Leptochloa* spp., respecto a la parcela control no tratada (Tabla 2). Cada evaluación visual se analizó mediante la transformación del porcentaje de control (*Asin (sqrt(Y/100))*.

Tabla 2. Estadios fenológicos del arroz según la escala extendida (BBCH) para la evaluación visual del control de las malas hierbas objetivo, *Echinochloa* spp. y/o *Leptochloa* spp.

Evaluación visual	Días desde la aplicación Pre-emergencia	Días desde la aplicación Post-emergencia	Control *Echinochloa spp.*	Control *Leptochloa spp.*
V1	19	0	BBCH 12-21	--
V2	28	9	BBCH 13-23	--
V3	48	29	BBCH 29-61	BBCH 30-65
V4	83	64	BBCH 71-85	BBCH 71-89
V5	139	120	BBCH 89	BBCH 89

En el momento de formación del fruto del arroz (BBCH 71, lechoso medio) se recogió la vegetación existente (cultivo y malas hierbas) en 2 muestras de 0,25 m^2 localizadas al azar en un rectángulo definido en cada parcela, tomando un total de 64 muestras. En ambas muestras se realizó la cuantificación de tallos del arroz y de malas hierbas, y la determinación del peso fresco del arroz y malas hierbas en cada unidad muestral. Finalmente, todas las muestras se secaron a 80 ºC durante 3 días para obtener el peso seco de cultivo y malas hierbas por unidad muestral. El análisis estadístico se realizó con un análisis de la varianza (PROC GLM) considerando el tipo de abono y el tratamiento efectos fijos. La comparación múltiple de medias se realizó con el test *post hoc* "Least Square Means Differences", con ajuste de Tukey. Para homogeneizar varianzas, los parámetros medidos en arroz y malas hierbas (Y), se transformaron con la variable (*LOG(Y+1)*). Los test estadísticos se realizaron con el paquete informático STATGRAPHICS®.

3. Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos mediante las evaluaciones visuales, realizadas a lo largo del ciclo del cultivo, mostraron que las parcelas donde se aplicó la enmienda de compost, tenían mejor control de *Echinochloa* que las abonadas de forma tradicional, aunque las diferencias no fueron significativas (Figura 1).

Los herbicidas empleados influyeron en el control de *Echinochloa*, tanto los tratamientos individuales de pre- y post-emergencia, Stomp Aqua y Aura, como el tratamiento combinado de Stomp Aqua+Aura, controlaron la especie a lo largo del ciclo del arroz. La reducción del control en las últimas evaluaciones, con el tratamiento de post-emergencia de Aura, se debió a emergencias tardías de la especie. La combinación de pre- y post-emergencia, en las parcelas con compost, consiguió los mejores resultados respecto al control de *Echinochloa*.

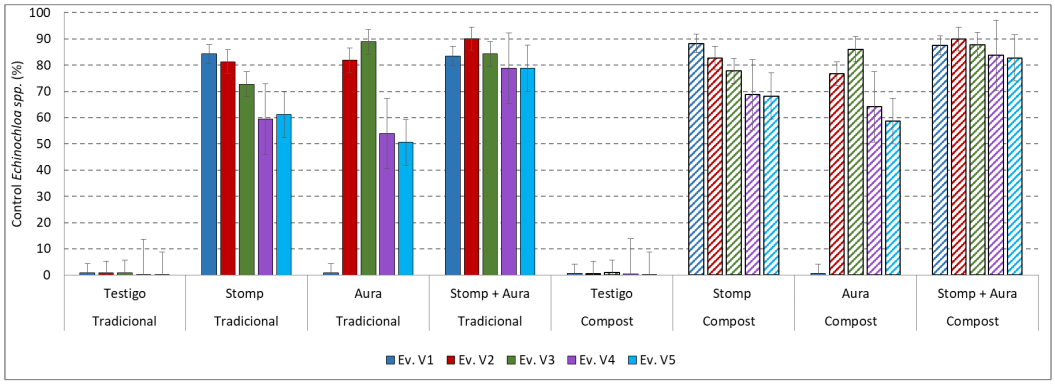


Figura 1. Control de *Echinochloa* spp., según el tipo de abonado y el tratamiento herbicida realizado, a lo largo del ciclo del cultivo (evaluaciones visuales (Ev. V1-5)).

La Figura 2 muestra los resultados del control de *Leptochloa*, en las evaluaciones visuales 3, 4 y 5, porque dicha especie emergió más tarde que la *Echinochloa*, tanto en las parcelas con abonado tradicional como en las del compost.

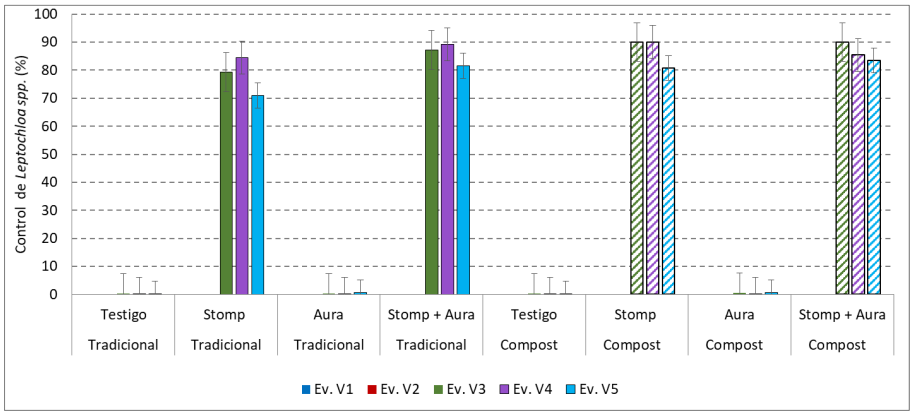


Figura 2. Control de *Leptochloa* spp., según el tipo de abonado y el tratamiento herbicida realizado, a lo largo del ciclo del cultivo (evaluaciones visuales (Ev. V1-5)).

El tratamiento en pre-emergencia, con Stomp Aqua, tuvo una elevada eficacia para controlar *Leptochloa*, tanto en parcelas con abonado tradicional como con compost. Al final del ciclo de cultivo, se observaron valores de control de la especie superiores en las parcelas con compost que con abonado tradicional. El tratamiento de post-emergencia, con Aura, no tuvo eficacia contra la *Leptochloa*, porque su germinación fue más tardía. La combinación Stomp Aqua+Aura obtuvo resultados similares en las parcelas con compost y abonado tradicional. La combinación de Aura con el herbicida de pre-emergencia, aumentó el control de la especie en las parcelas con abonado tradicional.

El análisis estadístico de los parámetros medidos en el muestreo del arroz y las malas hierbas, en el momento de formación de fruto (BBCH 71) se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Efecto del tipo de abonado y de los tratamientos herbicidas sobre el peso fresco, peso seco y nº de tallos del arroz y las malas hierbas.

	Arroz			Malas hierbas		
	Peso Fresco (g/m^2)	Peso Seco (g/m^2)	*Nº Tallos/m^2*	Peso Fresco (g/m^2)	Peso Seco (g/m^2)	*Nº Tallos/m^2*
Tipo de Abono (A)	*0,0036***	*0,0085***	*0,0001****	*0,0416**	*0,0296**	*0,0395**
Tradicional	4,665 a	3,820 a	3,086 a	5,005 b	3,875 b	3,121 b
Compost	4,892 b	4,021 b	3,381 b	4,188 a	3,201 a	2,655 a
Ttos. Herb. (T)	*0,0001****	*0,0001****	*0,0001****	*0,0001****	*0,0001****	*0,0438**
Testigo	0,000 a	0,000 a	0,000 a	7,200 d	5,766 d	4,395 c
Stomp	6,351 c	5,240 c	4,305 bc	4,281 b	3,145 b	2,433 b
Aura	6,031 b	4,876 b	4,113 b	5,706 c	4,354 c	4,134 c
Stomp+Aura	6,732 d	5,565 d	4,517 c	1,199 a	0,887 a	0,589 a
A x T	*0,0321**	*0,0771*	*0,0364**	*0,3987*	*0,4654*	*0,2370*

En cada factor, medias seguidas de diferentes letras indican diferencias significativas a 0,05, 0,001** y 0,0001**** (p-valor) según Test de Tukey.*

El efecto del tipo de abonado y los tratamientos herbicidas fueron significativos en todos los parámetros medidos. Además, el peso fresco y el número de tallos del arroz mostraron diferencias significativas en la interacción del abono con el tratamiento herbicida.

La aplicación de compost incrementó significativamente el peso fresco y seco y el número de tallos del cultivo respecto al abonado tradicional. Los tratamientos herbicidas de pre- y post-emergencia aplicados individualmente y la combinación de ambos incrementaron significativamente los parámetros medidos. El cultivo en las parcelas con compost, y tratadas con los herbicidas Stomp Aqua y Aura individualmente, presentaban mayor peso fresco y mayor número de tallos que en las parcelas abonadas de forma tradicional.

Con respecto a las malas hierbas, el tipo de abonado y los tratamientos herbicidas influyeron significativamente en los parámetros medidos. La aplicación del compost en las parcelas redujo significativamente los parámetros medidos en las malas hierbas con respecto al abonado tradicional. También se observó que el peso fresco, peso seco y nº de tallos de malas hierbas disminuyeron con todos los tratamientos herbicidas empleados, con respecto al testigo. El tratamiento combinado de Stomp Aqua + Aura fue el más eficaz para controlar el desarrollo de las malas hierbas, seguido por Stomp Aqua y Aura.

Por último, en el momento de la cosecha, se tomaron los datos de rendimiento del cultivo y sus componentes (nº panículas/m^2, nº granos/panícula y rendimiento de grano). Los efectos del tipo de enmienda y los tratamientos herbicidas aplicados no fueron significativos en ningún caso para los parámetros medidos al final de la cosecha.

Los resultados muestran que las parcelas abonadas con compost tenían mejor control de malas hierbas que las parcelas con abonado tradicional. Asimismo, el tratamiento combinado de Stomp Aqua+Aura fue más eficaz que la aplicación por separado para controlar las malas hierbas del arroz. Aunque dichos efectos del tipo de abonado y tratamientos herbicidas no influyeron en el rendimiento del cultivo. El arroz es uno de los cultivos con mayor escasez de materias activas disponibles. En la producción

integrada de arroz, se plantea como reto proporcionar sostenibilidad al agro-ecosistema que soporta al cultivo y mejorar su calidad, lo cual, permitiría a los agricultores mejorar la competitividad de sus producciones. En este contexto, son necesarios estudios que combinen la aplicación de herbicidas con prácticas agronómicas que faciliten un control adecuado de las malas hierbas. Aunque los resultados de este estudio no fueron concluyentes con la enmienda de compost de alperujo, el uso de enmiendas orgánicas en combinación con herbicidas puede constituir una herramienta valiosa para facilitar el control de malas hierbas.

4. **Agradecimientos**

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA2017-00043-00-00.Agradecemos al personal técnico y de campo de BASF de Utrera su ayuda en los trabajos de campo.

Referencias

DIACONO M & MONTEMURRO F (2010) Long-term effects of organic amendments on soil fertility: a review. *Agronomy for Sustainable Development* **30**,401-422.

MARTÍNEZ-BLANCO J, LAZCANO C, BOLDRIN A et al. (2013) Assessing the environmental benefits of compost use-on-land through an LCA perspective: a review. In: *Sustainable Agriculture Reviews* (ed. E LICHTFOUSE), vol. 12, 255-318. Springer, London, United Kingdom.

SOPEÑA F, SEMPLE K, SOHI S, BENDING GD (2012) Assessing the chemical and biological accessibility of the herbicide isoproturon in soil amended with biochar. *Chemosphere* **88**, 77-83.

Effect of the application of an organic amendment on the effectiveness of herbicides and production in rice crop

Summary: The effect of the application of one organic amendment on the effectiveness of two herbicides used in rice crop, and on the final grain quality has been studied under field conditions. A field trial was installed in Utrera, Seville, and two pre- and post-emergence herbicides, pendimethalin and profoxydim, were applied in the presence and absence of the organic amendment. Fresh weight, dry weight and stems number were determined. At the end of the trial, moisture and harvest yield were taken. Results showed that the plots fertilized with compost had greater weed control than the plots with traditional fertilizer. Also, the combined treatment of herbicides (pre- and post-emergence) was more effective than their individual application. The effect of the amendment and the herbicide treatments did not show significant differences in the parameters measured during the formation of the grain and at the end of the harvest.

Keywords: Alperujo compost, herbicide control, *Echinochloa* spp., *Leptochloa* spp., yield.

Proyecto IWMPRAISE: manejo integrado de malas hierbas, implementación práctica y soluciones para Europa

PEDRAZA V[1*], GONZÁLEZ-ANDÚJAR JL[1], LEZÁUN JA[2], GARNICA I[2]

[1]Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Córdoba, ESPAÑA.
vpedraza@ias.csic.es, andujar@ias.csic.es
[2]Instituto Navarro de Tecnologías e Infraestructuras Agroalimentarias (INTIA), Villava, Navarra, ESPAÑA.
jlezaun@intiasa.es, igarnica@intiasa.es

Resumen: El proyecto IWMPRAISE, incluido dentro del programa europeo Horizonte 2020, se enmarca dentro de la gestión integrada de malas hierbas y lo integran 38 socios en ocho países europeos. Este proyecto pretende apoyar la adopción de técnicas de manejo integrado de malas hierbas y demostrar que su uso puede mejorar la sostenibilidad agrícola, económica y medioambiental de la agricultura europea, creando sistemas de cultivo adaptados a un clima cambiante sin poner en peligro la rentabilidad agrícola o la producción de alimentos, piensos o biocombustibles. Estas estrategias se probarán y evaluarán mediante experimentación adaptativa en los sistemas de cultivo más representativos de Europa, entre los que se encuentran los cultivos leñosos perennes y, más concretamente, el olivar en España. El proyecto cuenta con 10 *work packages*, en cuatro de los cuales participan IAS-CSIC e INTIA a nivel nacional. Los ensayos de campo se llevarán a cabo durante 3 años (2018-2021) en el sur (Cañete de las Torres, Córdoba) y el norte de España (Larraga, Navarra). Las estrategias estudiadas representan los sistemas de manejo integrado comúnmente utilizados en los olivares de cada zona, evaluando su efecto sobre la instalación y desarrollo de malas hierbas, el suelo y los rendimientos y calidad del cultivo. Se organizarán jornadas de campo y otras actividades de divulgación de resultados y se elaborará una lista de buenas prácticas en un intento de mejorar las diferentes técnicas llevadas a cabo por los agricultores.

Palabras clave: Gestión integrada de malas hierbas, programas europeos, cultivos leñosos perennes, olivar

1. Introducción

El proyecto europeo IWMPRAISE "Integrated Weed Management: PRActical Implementation and Solutions for Europe" (Manejo integrado de malas hierbas: implementación práctica y soluciones para Europa) está incluido dentro del programa Horizonte 2020. Con una duración de cinco años (2017-2022), cuenta con la participación de 38 entidades pertenecientes a ocho países: Dinamarca, Países Bajos, Reino Unido, Francia, Suiza, Eslovenia, Italia y España. El objetivo general de IWMPRAISE es apoyar la implementación de nuevas y efectivas estrategias de manejo integrado de malas hierbas (en adelante IWM) en la agricultura europea, en un intento de mejorar su sostenibilidad agronómica, económica y ambiental. Estas estrategias serán evaluadas mediante experimentación adaptativa en los sistemas de cultivo más representativos de Europa, existiendo 10 *work packages* (en adelante WP) y 4 grandes escenarios de manejo de cultivos: cultivos anuales con separación entre líneas de siembra estrecha, cultivos anuales con separación entre líneas de siembra ancha, cultivos perennes herbáceos y cultivos perennes leñosos. Dentro de este último escenario, IAS-CSIC e INTIA participan en cuatro WPs con el cultivo del olivar, dada su importancia a nivel nacional.

El cultivo del olivo ocupa una superficie de 2.521.694 ha (MAPA, 2017a) en España. La mayor parte se concentra en Andalucía (1.596.717 ha), pero existen regiones como Navarra donde se ha producido una gran expansión en los últimos años, existiendo en la actualidad unas 8.446 ha (MAPA, 2017b). Dada su amplia distribución geográfica, las decisiones de manejo de suelo y control de malas hierbas se ven influenciadas por la ubicación, las condiciones meteorológicas, el suelo, la topografía y las preferencias de los agricultores (Huqi *et al.*, 2009). Además, la mayoría de los olivares cuentan con dos zonas claramente diferenciadas: la zona bajo copa, donde es necesario facilitar la recolección, y las calles, donde existe una mayor compactación y susceptibilidad a la erosión del suelo (CAP, 2006). Los sistemas de manejo de suelo más utilizados son el laboreo reducido, las cubiertas vegetales espontáneas y el no laboreo con aplicación de herbicidas (MAPA, 2017c). Sin embargo, ninguna de estas prácticas está exenta de problemas: pérdida de suelo (Gómez *et al.*, 2009), posible propagación de plagas y enfermedades (Martinelli *et al.*, 2017) o aparición de resistencias de malas hierbas (Saavedra and Pastor, 2002), respectivamente. Este hecho pone de manifiesto la importancia de realizar un manejo integrado de malas hierbas, en un intento de reducir los impactos negativos en el suelo y la producción, a la vez que se mantiene la flora beneficiosa en un umbral económico y manejable. Los objetivos específicos de IWMPRAISE son 1) cuantificar y abordar las barreras socioeconómicas y agronómicas actuales para la adopción de estrategias IWM; 2) estudiar distintos métodos de control de malas hierbas y diseñar nuevos métodos alternativos; 3) evaluar sus efectos a corto plazo e implicaciones económicas y ambientales a largo plazo; y 4) difundir y poner a disposición de los usuarios finales los resultados obtenidos.

2. Material y Métodos

Dentro del proyecto IWMPRAISE, el análisis del contexto de estudio y las percepciones de los usuarios en la adopción de IWM se realiza dentro del WP 1, y el diseño de las herramientas y determinaciones a evaluar en los WP 2 y 8, respectivamente. El trabajo de diseñar, probar y evaluar distintas estrategias IWM se incluye en cuatro WPs, uno para cada escenario de manejo de cultivos (WP 3 a 6). En cada uno de ellos, los ensayos de campo se llevan a cabo durante 3 años consecutivos. Dado que se trata de estrategias de experimentación adaptativas, cada año se evalúan las prácticas de IWM estudiadas, siendo posible realizar ajustes en los ensayos de campo planteados. Fruto de este trabajo a corto plazo se prevé obtener una serie de datos que permitirán crear escenarios y aplicar modelos para evaluar las implicaciones económicas y ambientales a largo plazo, trabajo realizado en el WP 8, y los resultados obtenidos serán difundidos por distintos medios mediante el WP 9 y 10 (Figura 1).

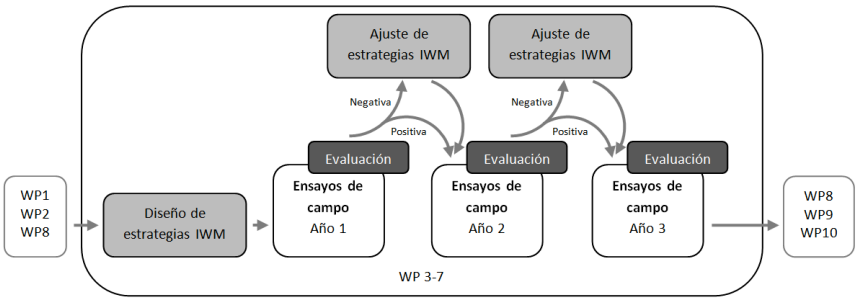
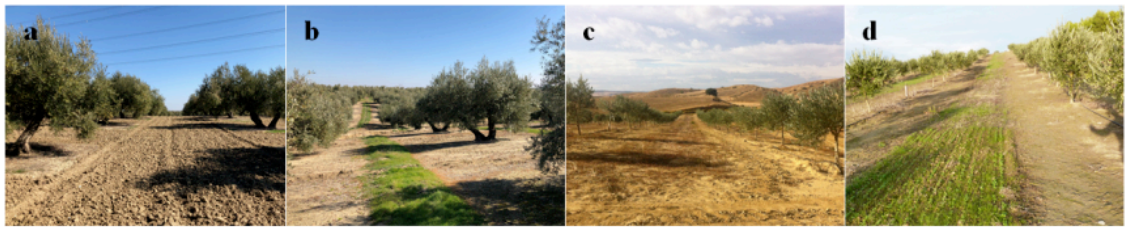


Figura 1.Esquema de trabajo del proyecto IWMPRAISE.



En el caso de España, los ensayos de campo están incluidos dentro del WP 6 (escenario de cultivos leñosos perennes) y se llevarán a cabo durante 3 años consecutivos (2018/2019, 2019/2020 y 2020/2021) en el sur (Cañete de las Torres, Córdoba) y el norte de España (Larraga, Navarra). En el sur de España, las fincas experimentales pertenecen a agricultores asociados a la Cooperativa Olivarera "Virgen del Campo" de Cañete de las Torres (Córdoba). En el norte de España, las parcelas pertenecen a agricultores que colaboran con el INTIA de Navarra. En cada localidad se están evaluando dos estrategias de manejo integrado comúnmente utilizadas por los agricultores. Los tratamientos en el sur de España incluyen laboreo reducido con incorporación de restos de poda y no laboreo con cubierta vegetal de gramíneas espontáneas (principalmente *Bromus* spp.) en las calles, además de un control químico más restos de poda en las líneas de plantación (Figura 2.a y b). En el norte de España se

compara no laboreo con control químico de malas hierbas con un manejo que integra una cubierta vegetal formada por mostaza blanca (*Sinapis alba*) que convive con la flora silvestre de la zona (Figura 2.c y d).

Figura 2. Laboreo (a) y cubierta de gramíneas (b) en el sur de España y no laboreo con control químico (c) y cubierta de mostaza blanca (Sinapis alba) y vegetación espontánea (d) en el norte de España.

En cada campo se ha realizado un diseño experimental en bloques al azar con 4 repeticiones y el tamaño de la parcela elemental se corresponde con la distancia entre 5 árboles, distribuidos en diferentes líneas de olivar. Las evaluaciones se están llevando a cabo en las calles y en las líneas de cultivo en dos momentos diferentes: antes de la realización de las prácticas de control de cada año (diciembre-enero en el sur de España y febrero-marzo en el norte de España) y cuatro semanas después de su realización. Para evaluar la efectividad de las prácticas de manejo de malas hierbas, en cada una de las dos zonas de muestreo de la parcela elemental se estima el porcentaje de cobertura de cada especie mediante notación visual siguiendo la escala de Barralis (1976), identificando cada una de las especies y agrupándolas por familias. Otras determinaciones son la densidad de plantas emergidas mediante conteo, la altura modal y el estado fenológico según la escala de Hess *et al.* (1997) de cada especie, así como la biomasa aérea total mediante siega en 4 muestras de 0.5 m^2. En los tratamientos donde existe cubierta vegetal también se evalúa el porcentaje de cobertura, altura y ciclo fenológico de las especies presentes. Para estudiar el efecto de las prácticas de manejo en el suelo, cada año en otoño se tomarán muestras de fertilidad del suelo (N, P, K) y materia orgánica en las calles y líneas de cultivo. Y por último, la influencia del manejo de malas hierbas sobre el rendimiento del cultivo, la producción de aceituna (kg/ha) así como su rendimiento graso, humedad y acidez serán evaluados durante los tres años.

3. Resultados y Discusión

El análisis de las percepciones de los usuarios finales (agricultores y expertos) desarrollado en el WP 1 ha permitido diseñar las estrategias IWM a evaluar durante el primer año en el WP 6 (Figura 3). Como los ensayos de campo comenzaron en septiembre de 2018 en ambas localidades, aún no se dispone de resultados. Actualmente se están realizando los segundos muestreos en el sur y norte de España.



Figura 3. Marco de trabajo diseñado dentro del WP 1 para establecer las estrategias de manejo IWM a evaluar en el cultivo del olivar en España (WP 6).

En resumen, los experimentos del proyecto IWMPRAISE contemplan un doble propósito. Por un lado, proporcionar resultados que permitan evaluar los posibles efectos a corto plazo de las estrategias de manejo integrado estudiadas y, por otro lado, servir para fines demostrativos y difusión de resultados. Por ello, este congreso es una magnífica oportunidad para dar visibilidad al proyecto y difundir su existencia. A lo largo de cada año se organizarán jornadas de campo y otras actividades de divulgación, y se elaborará una lista de buenas prácticas en un intento de mejorar los sistemas de manejo de suelo en olivar, su sostenibilidad y rentabilidad.

4. Agradecimientos

Este estudio está financiado gracias al programa de investigación e innovación de la Unión Europea Horizonte 2020 a través del Proyecto IWMPRAISE Nº 727321, y cuenta con la ayuda y colaboración del personal y agricultores de la Cooperativa Olivarera "Virgen del Campo" (Cañete de las Torres, Córdoba) y técnicos y agricultores asociados al INTIA (Navarra).

Referencias

BARRALIS G (1976) Méthode d'étude des groupements adventices des cultures annuelles. In: *V^è Colloque International sur l'Ecologie et la Biologie des Mauvaises herbes,* Vol. **1**, 59–68, INRA, Dijon, France.

CAP (2006) Manual de buenas prácticas agrarias en los diferentes sistemas productivos del olivar andaluz. Programa de mejora de la calidad de la producción de aceite de oliva y aceitunas de mesa. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Sevilla, España. 60 pp.

GÓMEZ JA, GUZMÁN MG, GIRÁLDEZ JV & FERERES E (2009) The influence of cover crops and tillage on water and sediment yield, and on nutrient, and organic matter losses in an olive orchard on a sandy loam soil. *Soil Tillage Research* **106**, 137–144.

HESS M, BARRALIS G, BLEIHOLDER H *et al*. (1997) Use of the extended BBCH-scale – general for the description of the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. *Weed Research* **37**, 433–441.

HUQI B, DHIMA K, VASILAKOGLOU I *et al*. (2009) Weed flora and weed management in established olive groves in Albania. *Weed Biology and Management* **9**, 276–285.

MARTINELLI R, MONQUERO PA, FONTANETTI A *et al*. (2017) Ecological mowing: An option for sustainable weed management in young citrus orchards. *Weed Technology* **31**, 260–268.

MAPA (2017a) Anuario estadísticas agrarias y alimentación. Superficies y producciones de cultivo. Olivar. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. URL https://bit.ly/2DAn56f (Último acceso 08. 02.19)

MAPA (2017b) Encuesta sobre Superficies y Rendimientos Cultivos (ESYRCE). Encuesta de Marco de Áreas de España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Disponible en: http://bit.ly/2igtnjv (Último acceso 10.02.19)

MAPA (2017c) Informe sectorial. Técnicas de mantenimiento de suelo. Encuesta sobre Superficies y Rendimientos Cultivos (ESYRCE). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Disponible en: http://bit.ly/2jzTRZz (Último acceso 08.02.19)

SAAVEDRA M & PASTOR M (2002) Sistemas de cultivo en olivar. Manejo de malas hierbas y herbicidas, Editorial Agrícola Española, Madrid, España. 429 pp.

The project IWMPRAISE: Integrated Weed Management, PRActical Implementation and Solutions for Europe

Summary: The five-year IWMPRAISE project is included in the EU Horizon 2020 programme with 38 partners in eight European countries and its main focus is the integrated weed management (IWM). Indeed, IWMPRAISE aims at supporting the adoption of IWM practices and demonstrate that its implementation can create cropping systems that are agronomically and environmentally more sustainable and more resilient without jeopardizing profitability or the steady supply of food, feed and biomaterials. The project will develop, test and assess management strategies delivered across the most important cropping systems in Europe, being one of them perennial woody crops, and more specifically olive orchards in Spain. The project has 10 different work packages, in four of which IAS-CSIC and INTIA participate at a national level. Field trials will be conducted during 3 growing seasons (2018-2021) at two different locations: the south of Spain (Cañete de las Torres, Córdoba) and the north of Spain (Larraga, Navarra). The strategies tested are based on the most common weed management practices used by olive farmers in each area and the work aims at evaluating their influence on weeds, soil and crop yields and quality. Field days and other outreach activities will be organized for their dissemination and a list of good practices will be produced in an attempt to achieve more sustainable weed control objectives.

Keywords: Integrated weed management, European Programmes, perennial woody crops, olive

Acolchado de aplicación líquida o hidroacolchados: primeros resultados sobre el control de malas hierbas en melocotoneros

BAQUERO R[1], PARDO G[1], MARÍ AI[2], AIBAR J[3], CIRUJEDA A[1]

[1]Unidad de Sanidad Vegetal. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza). Avda. Montañana 930; 50059 Zaragoza, Spain.
baqueroruben10@gmail.com, *gpardos@aragon.es*, *aimari@cita-aragon.es*, *acirujeda@aragon.es*
[2] Departamento de Sanidad Vegetal, Grupo de Gestión Integrada, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza, España
aimari@aragon.es
[3]Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural. Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza).
jaibar@unizar.es

Resumen: El control de las malas hierbas en frutales jóvenes no es fácil debido a la sensibilidad de éstos a herbicidas y daños físicos en los primeros años. El objetivo de este trabajo fue ensayar unas primeras mezclas de hidroacolchados basados en subproductos agrícolas sobre el control de malas hierbas bajo melocotoneros recién plantados. Se seleccionaron 6 mezclas provenientes de ensayos preliminares y se aplicaron en 1 m^2 alrededor de cada uno de ellos. Los tratamientos se distribuyeron completamente al azar en tres repeticiones. Las mezclas constaron de tres subproductos agrícolas mezclados con dos conglomerantes diferentes y con pasta de papel reciclado y se incluyó un testigo desherbado mecánicamente y testigos sin desherbar. A los 23, 31, 38 y 45 días después de la instalación (DDI) se llevó a cabo el seguimiento de la emergencia de las malas hierbas. El control de éstas fue bueno en los primeros 38 días, pero las lluvias excepcionalmente copiosas registradas en abril 2018 causaron un reblandecimiento de los acolchados durante unos 10 días permitiendo la emergencia de *Amaranthus retroflexus* con coberturas medias de entre 38 y 77% en los acolchados a los 45 DDI frente al 6% en testigo sin desherbar. Estos estudios preliminares sientan la base para posteriores mejoras del material de hidroacolchado.

Palabras clave: acolchados biodegradables, residuos agrícolas, especies arvenses perennes

1. Introducción

El control de malas hierbas en frutales no es fácil durante los primeros años de implantación, ya que en caso de control químico es frecuente que haya problemas de fitotoxicidad y resistencias, mientras que el control mecánico no siempre es suficientemente selectivo. Por otro lado, entre las formulaciones herbicidas autorizadas

para melocotoneros jóvenes, algunas son hormonales y pueden causar problemas en los árboles y otras controlan sólo gramíneas, por lo que la gama de productos disponibles no es muy elevada. Según el Registro de Productos Fitosanitarios del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2019), en melocotoneros jóvenes están disponibles las siguientes formulaciones: mezclas de glifosato con otras materias activas como oxifluorfen y diflufenican, así como isoxaben, herbicidas antigramíneas como quizalofop, herbicidas de contacto de reciente autorización como ácido pelargónico y algunos herbicidas hormonales como MCPA y 2,4-D. Aunque en principio puede parecer que hay suficientes herbicidas, las limitaciones del espectro de control de varios de ellos, así como el carácter sistémico de otros que aumenta el riesgo de fitotoxicidad provocan cierta preocupación en el sector relacionada con la falta de formulaciones fiables y no dañinas para los árboles.

Entre los métodos de control físicos, los acolchados con materiales plásticos generalmente no son recomendables en fruticultura, ya que pueden favorecer el desarrollo de enfermedades fúngicas. Una alternativa podría ser aplicar residuos agrícolas unidos por pasta de papel y aplicar la mezcla de forma semilíquida en el suelo. Ya en el año 1998, Runham et al. (1998) y Warnick et al. (2006) comprobaron que la mezcla formada por agua y papel molido fue un método de control de malas hierbas igual de resistente que el polietileno. La principal ventaja es que esta mezcla es biodegradable y no implica un impacto negativo sobre el medio ambiente. El control de especies dicotiledóneas fue posible con aplicaciones más gruesas de estas cubiertas. Lukas (2011), además, concluyó en sus ensayos que se podía controlar la germinación de especies no deseadas a través de hidroacolchados formados por pasta de papel y restos vegetales. Uno de los inconvenientes de la utilización del hidroacolchado podría ser la incompatibilidad con otras operaciones agrícolas (aplicación de fitosanitarios, poda, etc.) mientras éste está presente en el suelo. Sin embargo, como la superficie cubierta por el hidroacolchado no sobresale en exceso de los troncos, no debería ser pisado cuando se realizan las tareas rutinarias de la explotación. Una ventaja adicional de esta técnica es que permite usar materiales baratos, subproductos agrícolas y de origen local, como los restos de cultivo de algodón utilizados por Scholl et al. (2013). En este trabajo se han utilizado residuos agrícolas, basándose en los resultados de los ensayos realizados por Galvis (2015) bajo la dirección de A. Anzalone en Venezuela. Los objetivos del presente trabajo son ensayar diferentes mezclas seleccionadas tras ensayos previos en una plantación de melocotoneros y describir su capacidad de control de malas hierbas.

2. Material y Métodos

Los primeros ensayos se llevaron a cabo en septiembre de 2017 en las instalaciones del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) en Montañana (Zaragoza). Los ingredientes fueron pasta de papel reciclado procedente de la empresa SAICA (Fuentes de Ebro, Zaragoza), diferentes residuos agrícolas locales y cuatro conglomerantes. Después del análisis de resistencia a punción y tracción

realizado sobre 25 mezclas diferentes (Mas, Verdú y Claramunt, datos publicados en este mismo Congreso), se seleccionaron las mezclas que mostraron los mejores valores en dichos parámetros y se ensayaron en campo sobre superficies de 0,5 m^2 en noviembre de 2017 y enero de 2018. A partir de las observaciones realizadas en campo se modificó ligeramente la composición del hidroacolchado. El presente trabajo incluye seis mezclas resultantes de la combinación de tres subproductos agrícolas (S1, S2 y S3) y dos conglomerantes (C1 y C2), las cuales fueron aplicadas, de forma manual, sobre 1 m^2 en melocotoneros de nueva plantación en la finca de San Bruno (CITA, Montañana, Zaragoza) en la misma localidad.

Las mezclas fueron elaboradas in situ y aplicadas entre los días 21 y 27 de marzo de 2018. Se añadieron sendos testigos, uno sin desherbar y otro donde se realizaba un control mecánico manual. El diseño experimental con tres repeticiones incluía unidades experimentales de 5 árboles, de los cuales se evaluaron los tres centrales para evitar el efecto borde. Los melocotoneros plantados para el ensayo fueron variedad BabyGold 6 injertados sobre GF305 plantados el 23 de febrero de 2018. A los 23, 31, 38 y 45 días después de la instalación (DDI) se evaluó la presencia de las malas hierbas en los acolchados sobre la superficie acolchada de $1m^2$, de la cual se registró el porcentaje de cobertura total y de cada una de las especies observadas.

En la primavera de 2018 se registraron 101 mm de precipitación en el mes de abril y 77 mm en el mes de mayo (datos facilitados por la Oficina del Regante, 2018), lo cual es 60 y 30 mm superior a la media de la zona de los meses de abril y mayo, respectivamente (AEMET, 2019, media de los años 1981-2010).

Se comprobó la distribución de la normalidad y homocedasticidad de los datos (Minitab v. 4). Se realizó un análisis de varianza y una posterior separación de medias mediante el test de Tukey, $P<0,05$ (SAS, v. 9).

3. Resultados y Discusión

La cobertura de malas hierbas se mantuvo por debajo del 10% para todos los acolchados hasta los 38 DDI, mientras que ésta excedió el 45% en los testigos sin desherbar (Figura 1). En esa fecha, la composición de la flora dominante fue muy diferente en los testigos, donde dominaban las especies de germinación otoñal, con una cobertura de *Amaranthus retroflexus* y *Cyperus rotundus* todavía poco importante comparada con los acolchados (Tabla 1).

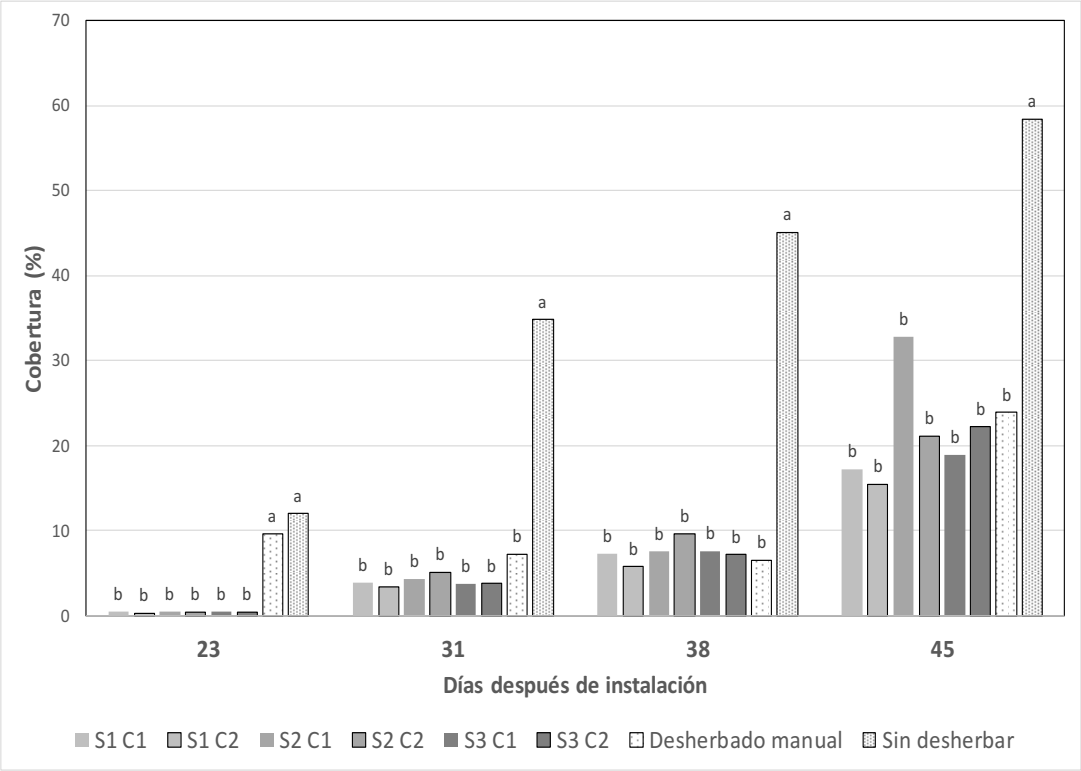


Figura 1. Porcentaje de cobertura de malas hierbas en los diferentes acolchados de aplicación líquida observados a lo largo del tiempo. Diferentes letras dentro de cada fecha de muestreo indican diferencias significativas según el test de Tukey ($P<0.05$).

Las abundantes lluvias registradas entre el 4 y el 17 de abril de 2018 fomentaron la emergencia de malas hierbas, especialmente *Amaranthus retroflexus;* además esa especie fue capaz de crecer a través de los hidroacolchados reblandecidos por la precipitación registrada, lo cual quedó reflejado en el muestreo de los 45 DDI (Figura 1, Tabla 1). El promedio de cobertura de los seis acolchados fue de 0, 4, 7,5 y 21,3 para los muestreos realizados a los 23, 31 y 38 días, respectivamente, pero alcanzó el 58% a los 45 DDI debido fundamentalmente a la masiva emergencia de dicha especie (Tabla 1).

La presencia de *C. rodundus* en todos los acolchados no sorprendió, ya que en ensayos preliminares (Cirujeda et al., 2012) ya se había observado que esta especie es muy difícil de controlar mediante uso de este tipo de acolchados, debido a la capacidad de punción de las hojas que emergen del suelo.

Tabla 1. Promedio de la cobertura del suelo (%) por las cinco especies principales de malas hierbas en cada tratamiento a los 45 días después de la instalación del hidroacolchado.

Especie	S1C1	S1C2	S2C1	S2C2	S3C1	S3C3	Testigo
Amaranthus retroflexus	38	55	77	59	38	44	6**
Cyperus rotundus	21	24	7	20	18	21	
Capsella bursa-pastoris	4	4		2		4	13
Convolvulus arvensis		3	4	3	4		
Sonchus oleraceus						4	10
Chenopodium album			2		4		12
Echinochloa spp.*					14	15	
Portulaca oleracea			2	4			
*Avena sterilis**	9						
*Bromus rigidus**	8						
Malva sylvestris		2					
Sisymbrium irio							11
Senecio vulgare							9
Lamium amplexicaule							9

*especies probablemente introducidas con los subproductos agrícolas
**especie presente en sexto orden de magnitud que se incluye para comparar con los acolchados.

A pesar de que en el último muestreo (45 DDI) los diferentes hidroacolchados mostraron eficacias en el control de malas hierbas similares al control manual, los resultados apuntan hacia la necesidad de modificar y mejorar la mezcla de los materiales ensayados (combinación de pasta de papel, subproducto agrícola y aglutinante) para favorecer la estabilidad del hidroacolchado después de una lluvia y así dificultar la emergencia de malas hierbas.

4. Agradecimientos

Este trabajo se ha financiado mediante el proyecto RTA2015-00047-C05-01. Agradecemos la colaboración de F. Arrieta y J.A. Alins en las tareas de campo.

Referencias

AEMET (2019)
http://www.aemet.es/es/serviciosclimaticos/datosclimatologicos/valoresclimatologicos?l=9434&k=arn, (último acceso 27 de mayo de 2019).

CIRUJEDA A, MARÍ A, MURILLO S, AUIBAR J, ZARAGOZA C (2012). Resultados preliminares de la aplicación de hidromulch en cultivo de pimiento. En: *X Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica (SEAE)*. (Albacete, España), 161.

GALVIS PJ (2015). Evaluación de mezclas de paja de arroz, papel y yeso como hidroacolchado para el control de malezas. Trabajo de Grado, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Venezuela.

LUKAS S (2011). Evaluation of pre-emergence herbicides contained within a hydromulch cap to determine weed control and safety for two native hawaiian grasses in a simulated roadside environment (Master). University of Hawaii.

MAPA (2019). https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/menu.asp (último acceso 20 de mayo de 2019).

RUNHAM S, TOWN S, FITZPATRICK J (1998). Evaluation over four seasons of a paper mulch used for weed control in vegetables. *Acta Horticulturae*, **513**, 193-201.

SCHOLL B N, HOLT G, THORNTON C, DUKE S (2013). Hydromulch Blends Using Agricultural Byproducts: Performance Implications of Cotton Quantity. *The Journal of Cotton Science* **17**, 302–308 (2013).

WARNICK J, CHASE C, ROSSKOPF E, SCHOLBERG J, SIMONNE E, KOENING R, ROE N (2006). Hydramulch for muskmelon and bell pepper crop production systems. *Journal of Vegetable Science*, **12**(2), 39-55.

Liquid spray-on mulches or hydromulch: first results of weed control in a peach orchard

Summary: Weed control in young fruit orchards is not easy due to the susceptibility of the trees to herbicides and physical damage in the first years. The objective of this work was to test first hydromulch mixtures based on agricultural by-products on weed control under recently-planted fruit trees. After preliminary trials conducted in greenhouse and field, 6 mixtures were selected and applied on a recently planted peach orchard at Montañana (Zaragoza, March 2018). The blends were mixed immediately before installation and placed in 1 m^2 around the trees. Treatments were randomly distributed with three replicates. The mixtures consisted in three agricultural waste products blended with two binders and recycled paper paste, and a mechanical control and a non-weeded control plots were included. At 23, 31, 38 and 45 days after installation (DAI) weed assessments were conducted. Weeds were controlled correctly during the first 38 days but unusual high rainfall between 4^{th} and 17^{th} April 2018 caused a long-lasting softening of the mulches of around 10 days allowing the emergence of *Amaranthus retroflexus* with mean cover between 38 and 77% in the mulches compared to 6% in the untreated plots. These preliminary trials provide the basis for further hydromulch improvements.

Keywords: biodegradable mulches, agricultural waste products, perennial weeds.

Efecto fitotóxico de *Medicago* sp. sobre malas hierbas problemáticas en viñedo

VALENCIA-GREDILLA F[1], PEDROL N[2], IGLESIAS-RODRÍGUEZ J[2], CANABAL-ABALO A[2], SOUTO C[2], RECASENS J[1], PUIG CG[2]

[1]Grupo de Malherbología y Ecología Vegetal. Dpto. Hortofruticultura, Botánica y Jardinería. Agrotecnio-ETSEA. Universitat de Lleida. Av. Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida.
francisco.valencia@hbj.udl.cat, jrecasens@hbj.udl.cat
[2]Grupo de Agrobiología ambiental: calidad de suelos y plantas, Universidade de Vigo, 36310 Vigo, Pontevedra.
cgpuig@uvigo.es, pedrol@uvigo.es, joseiglesiasr@uvigo.es, ancanabal@gmail.com, csouto@uvigo.es

Resumen: Las distintas especies empleadas como cubiertas vegetales en cultivos de viña han mostrado ejercer cierto control sobre las malezas al competir con las mismas tanto por nutrientes y agua como por espacio. Además, cuando se siegan y se utilizan como acolchado pueden actuar como barrera física que limite la emergencia de malas hierbas, en particular de especies anuales. Pero, ¿y si, al mismo tiempo, parte de ese control se debiera a la liberación de sustancias alelopáticas capaces de inhibir la germinación y el desarrollo de ciertas malas hierbas? En este estudio *in vitro* se evaluó el potencial fitotóxico de los extractos acuosos de dos especies leguminosas empleadas como cubierta o acolchado vegetal en viña: *Medicago sativa* cv. 'Victoria' y *M. rugosa* cv. 'Sapo', probados a diferentes concentraciones (0,0, 33,3 y 66,7 g L^{-1}) sobre la germinación y crecimiento temprano de *Conyza bonariensis* y *Aster squamatus*. Los extractos acuosos mostraron efectos fitotóxicos dosis-dependientes, destacando el extracto de *M. sativa* al inhibir completamente la germinación de ambas especies. Mediante análisis químico de los extractos acuosos por HPLC-DAD, se obtuvieron e identificaron compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides) potencialmente responsables de la fitotoxicidad observada.

Palabras clave: alelopatía, compuestos naturales, cubierta vegetal, acolchado vegetal, leguminosas.

1. Introducción

La gestión del suelo del viñedo mediante el manejo de una cubierta vegetal se ha convertido en una de las opciones preferidas por los viticultores. Dentro de las ventajas que conlleva este sistema de manejo (ambiental, agronómico y económico) (Ibáñez, 2015), resulta de especial interés la presión que puede ejercer sobre las malas hierbas. Una cubierta vegetal compite por nutrientes, agua y espacio, como acolchado ejerce

como de barrera física y en ambos casos puede inhibir la emergencia y desarrollo de malas hierbas a través de la liberación de sustancias alelopáticas. La alelopatía es una herramienta más que nos ayuda a manejar las malas hierbas en los cultivos, y su efecto depende tanto de la especie utilizada como cubierta y/o acolchado, como de las malas hierbas que se desean controlar. Estudios recientes avalan el potencial efecto alelopático de ciertas especies utilizadas como cubierta vegetal (e.g., Álvarez-Iglesias *et al*., 2014, Hartwig & Ammon, 2002) y en concreto el de algunas leguminosas utilizadas a su vez como fijadoras de nitrógeno (Álvarez-Iglesias et al., 2014, Pardo-Muras et al., 2018). En este sentido, se ha planteado un estudio cuyos objetivos son, por un lado, evaluar el potencial fitotóxico de los extractos acuosos de dos especies leguminosas: *Medicago sativa* cv. 'Victoria' y *M. rugosa* cv. 'Sapo', probados a diferentes concentraciones (0, 33,34 y 66,67 g L^{-1}) sobre la germinación y el crecimiento temprano de *Conyza bonariensis* (L.) Cronq. y *Aster squamatus* (Sprengel) Hieron. Por otro lado, mediante análisis químico de los extractos acuosos por cromatografía de líquidos de alta presión con detector diodo-array (HPLC-DAD), obtener e identificar los compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides) potencialmente responsables de la fitotoxicidad observada.

2. Material y Métodos

En noviembre de 2016, se sembraron las especies *M. sativa* cv. 'Victoria' y *M. rugosa* cv. 'Sapo' en el campus de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria en Lleida. En el momento de floración, se recolectó tanto la parte aérea como subterránea conjuntamente. Las muestras se dejaron secar en semioscuridad a una temperatura de 20ºC hasta mantener un peso constante y posteriormente se almacenaron. En julio de 2017, en los laboratorios del grupo de Agrobiología ambiental de la Universidade de Vigo, y siguiendo la metodología descrita por Puig *et al*. (2013), el material vegetal se troceó en fragmentos de aprox. 1cm^2. De cada especie se añadieron en un matraz Erlenmeyer 66,7 g de material vegetal y 1 L de agua destilada. La mezcla se mantuvo en oscuridad y a temperatura ambiente durante 24 h, y se agitó manualmente cada seis horas para facilitar la homogeneización. A continuación, los extractos se pasaron por un filtro de membrana de 0,45 µm de diámetro de poro para eliminar impurezas, y por un segundo filtro de 0,2 µm para conseguir prácticamente una asepsia total del extracto y evitar así una contaminación por microorganismos. Los extractos se diluyeron en agua destilada obteniendo tres dosis: 0,0, 33,3 y 66,7 g L^{-1}, correspondientes al control, dosis al 50% y dosis al 100%, respectivamente. Para el bioensayo se utilizaron semillas de *C. bonariensis* y *A. squamatus* recolectadas en septiembre de 2016 en una parcela de viña (*Vitis vinifera* L.) en la localidad de Raimat (Lleida). Momento previo al ensayo, las semillas se desinfectaron. Para evaluar el efecto fitotóxico de los extractos sobre la germinación de las semillas de ambas especies de malas hierbas, se utilizaron placas de seis pocillos de 3,48 cm de diámetro; en cada pocillo se colocaron 15 semillas sobre papel de filtro humedecido con 600 µL de cada disolución. Las placas se incubaron en cámaras de crecimiento a 30/20 ºC para *C. bonariensis* y 15/5 ºC para *A. squamatus*, con un fotoperiodo de 12 h para ambas especies. El número de semillas germinadas se

contó cada 24 h hasta que dejaron de observarse efectos de germinación en el control. Una semilla se consideraba germinada cuando la radícula superaba 1 mm (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1963). Para la medición del crecimiento, se utilizaron diez semillas pre-germinadas de cada especie en placas Petri de 9 cm con 4 mL de extracto de cada concentración. Tras 48 h de incubación, se midió la longitud de la radícula y del hipocótilo de cada plántula.

Ambos extractos acuosos se analizaron químicamente por HPLC-DAD con el fin de identificar y cuantificar los compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides). Los bioensayos siguieron un diseño completamente aleatorizado con seis repeticiones por tratamiento. Los valores de germinación, así como del crecimiento de la radícula y del hipocótilo se expresaron como porcentajes relativos al control. Los valores obtenidos se analizaron mediante ANOVA de una vía y prueba post-hoc de Waller-Duncan de comparación múltiple de medias en caso de varianzas homogéneas. En el caso de datos que no cumplen los requisitos de las pruebas paramétricas, se aplicaron las pruebas de Kruskal-Wallis y la prueba post-hoc T2 de Tamhane. Todos los análisis se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics 19.0 software package (IBM SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Resultados y Discusión

Los extractos de ambas especies de *Medicago* mostraron un efecto significativamente inhibitorio ($P \leq 0,05$) sobre la germinación de *C. bonariensis* y de *A. squamatus*. Los extractos acuosos mostraron efectos fitotóxicos dosis-dependientes, destacando el extracto de *M. sativa* al inhibir completamente la germinación de ambas malas hierbas (Figura 1). En el caso de *M. rugosa*, una mayor concentración de extracto inhibió en mayor medida la germinación de ambas especies, reduciendo la germinación de *C. bonariensis* un 85% para la dosis más concentrada y un 48% para la dosis intermedia y en el caso de *A. squamatus*, un 95% y un 57%, respectivamente. Los extractos de ambas leguminosas resultaron ser fuertemente inhibidores del crecimiento radicular sobre ambas especies de malas hierbas, con un 100% para todas las dosis a excepción de *M. sativa* a dosis intermedia sobre *C. bonariensis*, cuya reducción fue del 96% pero sin diferencias significativas respecto al resto de tratamientos (Figura 1). El efecto de ambos extractos en el crecimiento del hipocótilo fue notablemente diferente entre ambas especies de malas hierbas. En *A. squamatus* se redujo el crecimiento en torno al 35% para el extracto de *M. rugosa* a ambas concentraciones y un 50% para *M. sativa* con la dosis de mayor concentración. En *C. bonariensis*, no se observaron diferencias significativas entre el efecto de los extractos y el control, estimulando incluso el crecimiento a excepción del extracto de *M. rugosa* a mayor concentración, que logró reducir el crecimiento de esta especie un 18% (Figura 1).

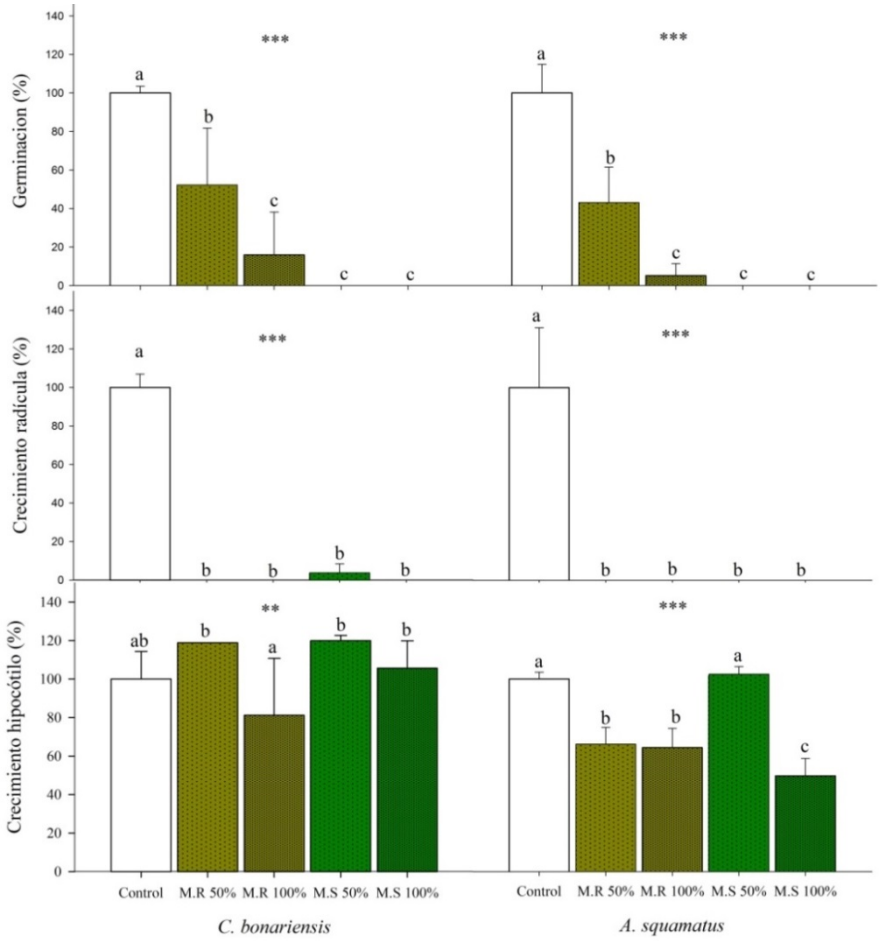


Figura 1. Efecto de los extractos acuosos de *Medicago rugosa* (M.R) y *Medicago sativa* (M.S) en la germinación de *Conyza bonariensis* y *Aster squamatus* a diferentes concentraciones (0%=0,0 g/L, 50%=33,3 g/L y 100%=66,7 g/L). Los valores medios están representados como porcentajes relativos del control. Las barras de error indican la desviación estándar. Para cada especie de mala hierba, los asteriscos denotan diferencias significativas entre los tratamientos: ***P* ≤0,01 y ****P* ≤0,001 (ANOVA o Kruskal-Wallis *H* test). Para cada especie, letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (pruebas post-hoc Waller-Duncan o T2 de Tamhane).

El efecto fitotóxico de *M. sativa* en la germinación y crecimiento radicular de malas hierbas ha sido constatado por otros autores: Koloren (2007) observó una inhibición de la germinación cercana al 100% en *Amaranthus retroflexus* (L.), *Lolium perenne* (L.)*, Ipomoea hederacea* (Jacq.) o *Portulaca olaracea* (L.) a una dosis de extracto de 250 g L^{-1}. Otros autores han demostrado el efecto fitotóxico de la alfalfa sobre *Lolium rigidum* (Gaud.) (Zubair *et al*., 2017). No obstante, y coincidiendo con nuestros resultados, los extractos de *M. sativa* pueden tener un efecto positivo en el inicio del crecimiento de las especies ensayadas, como demostraron Xuan *et al*. (2015), donde el extracto de tres cultivares de *M. sativa,* a las dosis más bajas ensayadas (50 y 100 ppm), incrementaron el crecimiento radicular y del hipocótilo en arroz y alfalfa.

Un total de doce compuestos fueron identificados en las especies de *Medicago* analizadas. El ácido ferúlico fue dominante en *M. sativa*, seguido del derivado de la luteolina ‘2’ y la apigenina, representando el 29,6, 22,5 y 19,4%, respectivamente, de los compuestos identificados. En el caso de *M. rugosa*, el compuesto mayoritario fue el derivado de luteolina ‘2’, seguido del elagitanino y un derivado de la apigenina, con presencia del 27,1, 19,8 y 15,0%, respectivamente. Varios compuestos han sido

identificados en distintos cultivares de *M. sativa,* como el ácido vainíllico, ferúlico o *ρ*-hidroxibenzoico (Xuan *et al*. 2015) y la apigenina (Zubair *et al*., 2017). Los extractos de otras leguminosas (e.g., *Canavalia ensiformis* L.) han demostrado tener un efecto fitotóxico, y en ellos, se han identificado algunos de los compuestos presentes en nuestros extractos, como el ácido ferúlico y el kaempferol (Pereira *et al*., 2018). La fitotoxicidad de algunos de los compuestos identificados, como el ácido ferúlico, *ρ*-cumárico, *ρ*-hidroxibenzoico, así como el ácido vainíllico, ya ha sido demostrada al inhibir o retrasar tanto la germinación como el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Reigosa y Pazos-Malvido, 2007). El control de malas hierbas que ejercen estas especies de leguminosas en campo podría deberse, entre otros factores, al potencial efecto alelopático causado por la liberación de estos ácidos fenólicos y flavonoides, a través del fenómeno alelopático. Estos resultados apoyan el uso de la alelopatía como una herramienta más en la gestión integrada de malas hierbas, reforzando así el uso de especies de leguminosas como cubierta o acolchado.

Tabla 1. Compuestos fenólicos de los extractos acuosos de las especies *M. sativa* y *M. rugosa* obtenidos a través de HPLC-DAD.

Compuesto	TR [a]	*Medicago sativa*		*Medicago rugosa*	
		Contenido (µg·ml^{-1} de extracto acuoso)	%[b]	Contenido (µg·ml-1 de extracto acuoso)	%
Ácidos fenólicos					
Ácido vainíllico	19.2	2.81	1.7	4.57	2.1
Ácido ρ-hidroxibenzoico	22.3	2.96	1.8	0.00	0.0
Ácido ρ-cumárico	33	13.58	8.1	10.64	5.0
Ácido ferúlico	37.5	49.57	29.6	19.53	9.1
Flavonoides					
Elagitanino	20.3	0.00	0.0	42.48	19.8
Derivado de luteolina `1´	22.1	0.00	0.0	16.59	7.7
Ácido elágico	23	0.00	0.0	30.64	14.3
Luteolina	28.6	23.88	14.3	0.00	0.0
Derivado de Apigenina	31.3	0.00	0.0	32.18	15.0
Derivado de luteolina `2´	32	37.68	22.5	58.12	27.1
Kaempferol	32.5	4.34	2.6	0.00	0.0
Apigenina	33.2	32.41	19.4	0.00	0.0
TOTAL		167.24		214.76	

[a]TR = tiempo de retención en min

[b]% = porcentaje de cada compuesto respecto al total

4. Agradecimientos

Este trabajo se enmarca dentro del Proyecto Plan Estatal - Retos de la Sociedad, Ref: AGL2014-52465-C4-2-R financiado por el Ministerio de Industria y Competitividad. El primer autor ha contado con una beca predoctoral otorgada por la Universitat de Lleida.

Referencias

ÁLVAREZ-IGLESIAS L, PUIG CG, GARABATOS A, REIGOSA R M, PEDROL N (2014) *Vicia faba* aqueous extracts and plant material can suppress weeds and enhance crops. *Allelopathy Journal* **34**, 299-314

HARTWIG N & AMMON H (2002) Cover crops and living mulches. *Weed Science* **50**, 688-699

IBÁÑEZ S (2015) *Mantenimiento del suelo en el viñedo mediante cubiertas vegetales*. Ed. Gobierno de la Rioja. 167 p.

KOLOREN O (2007) Allelopathic Effects of *Medicago sativa* L. and *Viccia cracca* L. Leaf and Root Extracts on Weeds. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **10**, 1639-1642

MAYER AM, POLJAKOFF-MAYBER A (1963). *The Germination of Seeds*. 1st ed. Oxford: Pergamon Press. pp. 244

PARDO-MURAS M, PUIG CG, LÓPEZ-NOGUEIRA A, CAVALEIRO C, PEDROL N (2018) On the bioherbicide potential of Ulex europaeus and *Cytisus scoparius*: Profiles of volatile organic compounds and their phytotoxic effects. *Plos One* **13**, 1-21.

PEREIRA JC, PAULINO CLA, GRANJA BS, SANTANA AEG, ENDRES L, DE SOUZA RC (2018). Potencial alelopático e identificação dos metabólitos secundários em extratos de *Canavalia ensiformis* L. *Revista Ceres* **65**, 243-252.

PUIG CG., ALVAREZ-IGLESIAS L., REIGOSA MJ., PEDROL N (2013) *Eucalyptus globulus* leaves incorporated as green manure for weed control in maize. *Weed Science* **61,** 154-161.

REIGOSA MJ, PAZOS-MALVIDO E (2007) Phytotoxic effects of 21 plant secondary metabolites on *Arabidopsis thaliana* germination and root growth. *Journal of Chemical Ecology* **33**, 1456-1466.

ZUBAIR HM, PRATLEY J, SANDRAL G, HUMPHRIES A (2017) Allelopathic interference of alfalfa (*Medicago sativa* L.) genotypes to annual ryegrass (*Lolium rigidum*). *Journal of Plant Research* **130**, 1-12.

XUAN T D, TSUZUKI E, TERAO H, MATSUO M, KHANH TD (2003) Correlation between Growth Inhibitory Exhibition and Suspected Allelochemicals (Phenolic Compounds) in the Extract of Alfalfa (*Medicago sativa* L.), *Plant Production Science*, **6**, 165-171.

Phytotoxic effect of *Medicago* sp. on problematic weeds in vineyard

Summary: Different species used as cover-crops in vineyard have shown to exert some control over weeds by competition (cover-crop) or as a physical barrier (mulching). But, can such control be partly due to the release of allelopathic substances, capable of inhibiting the germination and early growth of certain weeds? In this *in vitro* approach, the phytotoxic potential of two legume species used as cover-crops or vegetable mulch in vineyard was evaluated. Aqueous extracts of *Medicago sativa* cv. Victoria and *Medicago rugosa* cv. Sapo were tested at different concentrations (0.0, 33.3 and 66.7 g L^{-1}) on the germination and early growth of *Conyza bonariensis* and *Aster squamatus*. The aqueous extracts showed dose-dependent phytotoxic effects, and the effect of *M. sativa* extract inhibiting completely the germination of both target species is highlighted. The chemical analysis of the aqueous extracts was performed by HPLC-DAD, identifying some phenolic compounds (phenolic acids and flavonoids) potentially responsible for the observed phytotoxicity.

Keywords: allelopathy, natural compounds, cover-crop, mulching, legumes

Evaluación del intercultivo de pastos de verano y cultivos extensivos de invierno sobre el control de malas hierbas

LUNA IM[1], FERNÁNDEZ-QUINTANILLA C[2], PEÑA JM[2], DORADO J[2]
[1] Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) - Estación Experimental Agropecuaria Quimilí, Santiago del Estero Ruta Prov. Nº 6 km 9, Argentina,
luna.ignacio@inta.gob.ar
[2] Instituto de Ciencias Agrarias (CSIC), Serrano 115B, 28006 Madrid,
cesar@ica.csic.es; jmpena@ica.csic.es; jose.dorado@csic.es

Resumen: El intercultivo de pastos perennes de ciclo estival con cereales de invierno es una técnica que permitiría reducir el uso de herbicidas para el control de malas hierbas. El objetivo del presente trabajo fue analizar los efectos de dicho sistema sobre el establecimiento de cultivos invernales y el desarrollo de las poblaciones de malas hierbas. Se evaluaron 6 tratamientos: siembra convencional de cebada o veza, e intercultivo de estas dos especies de invierno con dos gramíneas perennes de ciclo estival, *Cynodon dactylon* y *Eragrostis curvula*. No se registraron diferencias en el establecimiento de los cultivos de cebada y veza entre siembra convencional e intercultivo. El primer año la reducción de la densidad de malas hierbas en los tratamientos de intercultivo respecto a los convencionales fue, en promedio, del 82% y 92% para veza y cebada respectivamente. El segundo año las mayores densidades de malas hierbas se registraron nuevamente en cebada convencional aunque no se observaron diferencias entre sus biomasas. La veza sembrada en convencional produjo más biomasa que en intercultivo. En el caso de la cebada no fue posible establecer diferencias entre ambos sistemas.

Palabras clave: Intercultivo, cultivos de invierno, no-laboreo, malas hierbas

1. Introducción

El intercultivo de pastos perennes de ciclo estival con cereales de invierno, sistema también denominado "pasture cropping" es una técnica que permitiría reducir el uso de herbicidas, disminuir los procesos de erosión del suelo y mejorar la estructura y el contenido de materia orgánica del suelo sin comprometer la productividad de los cultivos principales (Jones, 1999; Millar & Badgery, 2009; Descheemaeker et al., 2011; Lawes et al., 2014). Dicha técnica podría adaptarse a las condiciones climáticas de la región centro de España. Sin embargo, la experiencia local disponible es aún muy escasa (Dorado et al., 2017). En tal sentido, el objetivo del presente trabajo fue analizar los efectos del intercultivo de pastos-cultivos extensivos de invierno sobre el establecimiento de los cultivos invernales y el desarrollo de las poblaciones de malas hierbas.

2. Materiales y Métodos

El experimento se realizó en la finca experimental "La Poveda" (Arganda Del Rey, Madrid). Durante dos campañas se evaluaron 6 tratamientos: siembra convencional de cebada (Ceb) o veza (Vez), e intercultivo de estas dos especies de invierno con dos gramíneas perennes de ciclo estival: *Cynodon dactylon* (Cyn/Ceb y Cyn/Vez) y *Eragrostis curvula* (Era/Ceb y Era/Vez). El diseño experimental fue de parcelas divididas con 4 repeticiones, siendo el tamaño de cada unidad experimental (subparcela) de 17 × 10 m.

Las especies de pasto se sembraron manualmente en abril de 2017 a razón de 8 kg/ha en *E. curvula* y 10 kg/ha en *C. dactylon*, apoyando su establecimiento con riegos hasta septiembre. Una vez implantado el pasto y tras la siega otoñal, se realizó la siembra de cebada y veza utilizando una sembradora de siembra directa, los días 28 noviembre para el primer ciclo (2017-2018) y 5 de diciembre para el segundo (2018-2019). En este último ciclo se efectuó un tratamiento con carfrentazona (0,3 L/ha) sobre ambos pastos previo a la siembra para conseguir el secado del material verde, ya que como consecuencia de las condiciones ambientales favorables, las mismas todavía no habían entrado en latencia. Los controles Ceb y Vez, manejados de forma convencional, fueron sembrados en las mismas fechas sobre suelo previamente labrado con rotocultivador. En el caso de Vez, se emplearon 80 kg semilla/ha de veza en mezcla con 15 kg/ha de avena, esta última utilizada como tutor. El cultivar de cebada empleado fue Hispanic a razón de 180 kg/ha. En el segundo ciclo de cultivo se aplicaron herbicidas para el control de las malas hierbas presentes (pinoxadem 42 g a.i./ha y tifensulfuron-metil 50% + tribenuron-metil 25% 30 g a.i./ha) en el caso de cebada y cletodim (360 g a.i. /ha) en el caso de veza en las parcelas con manejo convencional. En las parcelas con intercultivo de pastos no se aplicó ningún herbicida.

El seguimiento de los cultivos consistió en registrar la densidad de veza+avena y de cebada en todos los tratamientos. El muestreo de malas hierbas se realizó a la salida del invierno (marzo 2018 y febrero 2019), identificando las especies y registrando su densidad en todos los tratamientos. Posteriormente, ya avanzada la primavera, se determinó la biomasa de malas hierbas y del pasto. El análisis estadístico de los datos de densidad en cultivo y malas hierbas se realizó mediante un Modelo Lineal General univariante y la prueba de comparación múltiple *post hoc* de Tukey (P<0,05). Los datos de biomasa de malas hierbas se analizaron mediante Modelos Lineales Mixtos con efectos fijos de Tratamiento y efectos aleatorios de Bloque. Se modeló la heteroscedasticidad residual de Tratamiento. Mediante criterios de verosimilitud penalizada (AIC y BIC) se eligió el modelo que mejor describió los datos y utilizando el mismo se efectuaron inferencias acerca de las medias de los tratamientos con el test de Tukey con un nivel de significancia de α=0,05.

3. Resultados y Discusión

No se observaron diferencias significativas en el establecimiento de los cultivos (veza y cebada) en ninguno de los dos años (Figura 1). En el segundo año la densidad de plantas sufrió un descenso general en todas las parcelas debido a unas condiciones ambientales desfavorables.

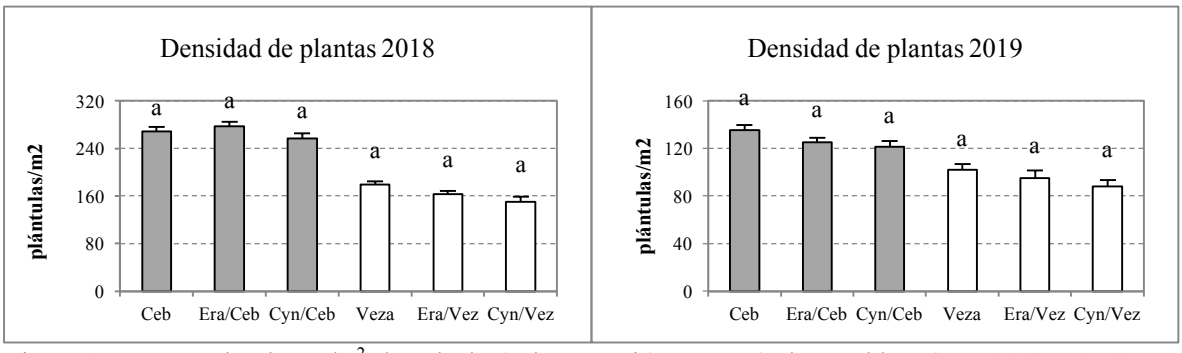


Figura 1: Número de plantas/m^2 de cebada (columna gris) y veza (columna blanca) en 2018 y 2019. Barras verticales: error estándar; letras distintas indican diferencias significativas según prueba de Tukey (P<=0,05).

En relación a la densidad total de malas hierbas, durante la primera campaña se observaron valores más altos en el cultivo convencional de cereal y veza respecto a los intercultivos con pastos (Figura 2A). La reducción en la densidad en los tratamientos de intercultivo fue, en promedio, del 82% y 92% para veza y cebada respectivamente. Es importante remarcar que dicho año se caracterizó por precipitaciones abundantes, concentradas especialmente en la primavera. Esto habría favorecido el rápido crecimiento de los pastos que pudieron cubrir homogéneamente el suelo, favoreciendo su competencia frente a la comunidad arvense. En el segundo año, las mayores densidades de malas hierbas se registraron nuevamente en cebada cultivada de forma convencional (Figura 2B). Sin embargo, los valores observados en las parcelas de intercultivo fueron más elevados que en el año anterior, presentando mayor variabilidad. Posiblemente, esta variabilidad fue consecuencia de la reducción en la cobertura de los pastos dentro de las parcelas con intercultivo, causada por las condiciones ambientales ocurridas en el periodo de estudio: sequía y temperatura extrema durante el verano previo y las escasas precipitaciones recogidas desde fines del 2018 hasta mayo de 2019. Las condiciones excepcionales de pluviometría en 2019 ocasionaron un menor desarrollo de los cultivos y pastos, dificultando la competencia sobre malas hierbas.

En la primavera de 2018 la superficie cubierta por los pastos en las parcelas de intercultivo fue muy elevada y uniforme, disminuyendo de forma sustancial en 2019 hasta alcanzar valores en torno al 45% en el conjunto de parcelas (Figura 3). A pesar de haber sufrido una disminución similar de la cobertura de pastos en las dos especies, la respuesta de las malas hierbas fue diferente: tanto en cebada como en veza *E. curvula* produjo una disminución significativamente mayor de malas hierbas que *C. dactylon*.

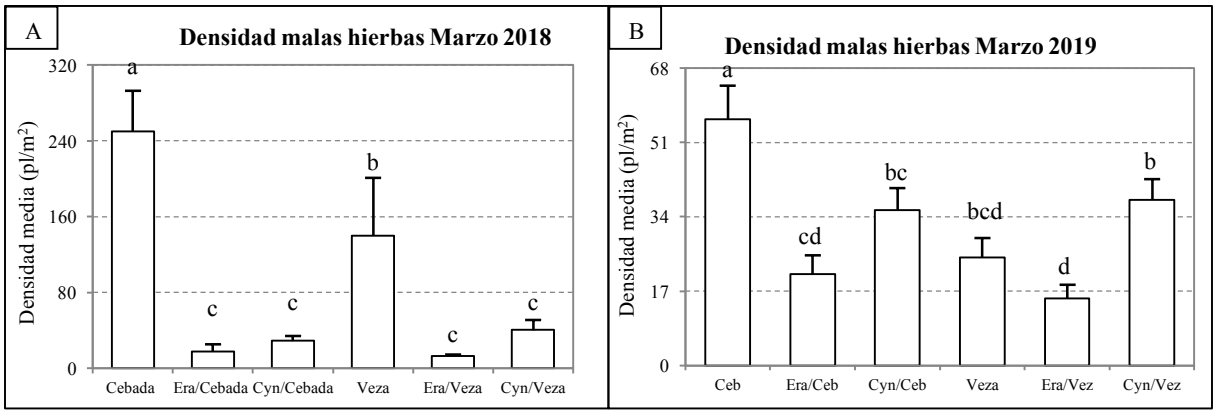


Figura 2: Densidad de malas hierbas/m^2 en A) Marzo 2018; B) Marzo 2019. Barras verticales: error estándar; letras distintas indican diferencias significativas según prueba de Tukey (*P*<=0,05).

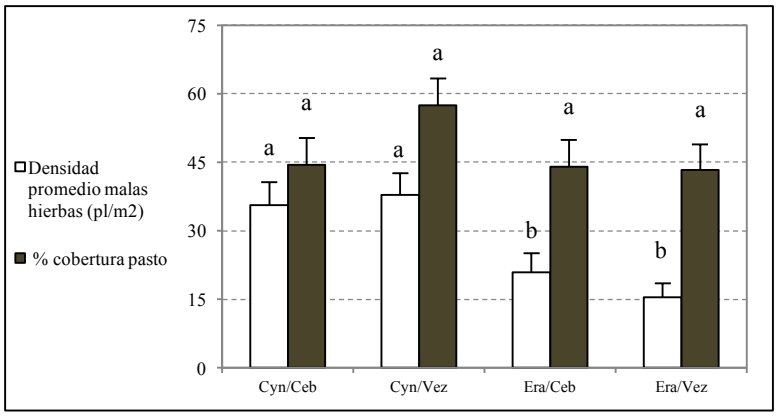


Figura 3: Densidad de malas hierbas/m^2 (columna blanca) y porcentaje de cobertura de pastos (columna gris) en los tratamientos de intercultivo en 2019. Barras verticales: error estándar; letras distintas indican diferencias significativas según prueba de Tukey (*P*<=0,05).

En relación a la biomasa total de malas hierbas, en la primera campaña la veza sembrada convencionalmente registró mayor biomasa que la veza en intercultivo, independientemente del pasto utilizado (Figura 4). En el caso de la cebada no fue posible establecer diferencias entre ambos sistemas. Sin embargo, resulta interesante observar que en la cebada en siembra convencional (Ce) tiende a ser más elevada que en intercultivo (Cyn/Ceb; Era/Ceb). En términos medios, la reducción de peso seco fue aproximadamente el 63% y 27% en los intercultivos de veza y cebada, respectivamente. En la segunda campaña la biomasa de malas hierbas no fue significativamente diferente entre tratamientos. Estos resultados sugerirían que tanto los pastos y cultivos principales vieron fuertemente reducida su capacidad competitiva frente a las mismas, aun considerando las aplicaciones de herbicida en los tratamientos de cebada y veza convencional. Esto podría explicarse como consecuencia de la menor densidad de plantas de veza/cebada logrado en la siembra, sumado a la acentuada falta de crecimiento de ambos cultivos por carencia de agua.

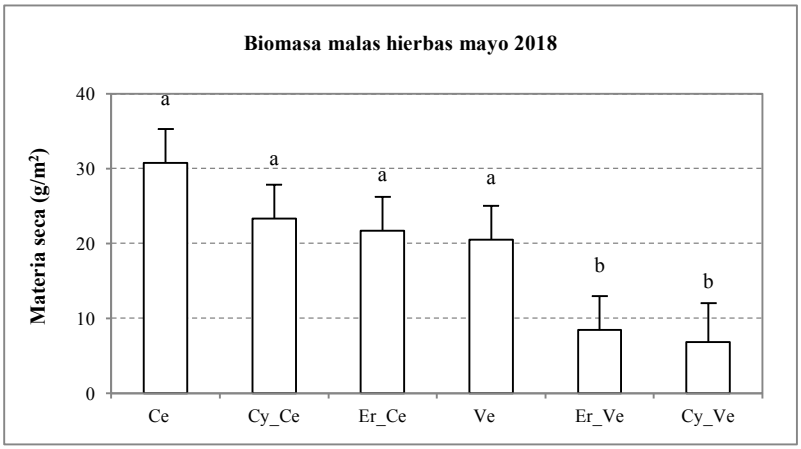


Figura 4: Biomasa de malas hierbas (gramos materia seca/m^2) por tratamiento en mayo de 2018. Letras distintas indican diferencias significativas según prueba de Tukey (P<=0,05).

Teniendo presente la marcada variabilidad interanual en la que se ha desarrollado el presente experimento, es necesario continuar investigando el comportamiento del sistema de intercultivo sobre la comunidad de malas hierbas. Sin embargo, algunos resultados ya serían indicativos de algunas limitantes para un control eficaz de las mismas. En tal sentido, se pueden resaltar dos aspectos importantes. El primero es la disminución de la cobertura de pastos en el tiempo. Para que los mismos ejerzan una competencia efectiva, su cobertura debe ser uniforme y mantenerse entre ciclos. En la medida que esta sea más baja, se abren nichos que las malas hierbas pueden explorar y capitalizar, de tal forma que su densidad irá progresivamente en aumento. Una de las causas que explicaría la pérdida de cobertura de los pastos es su necesidad de agua durante el verano. Descheemaeker, et al. (2011), trabajando en Australia bajo condiciones climáticas mediterráneas, concluyeron que el sistema de intercultivos era una opción en zonas con al menos 150 mm de lluvia durante el período de crecimiento de los pastos, situación contrastante con la explorada en el presente ensayo. En otros estudios llevados a cabo en Italia, Corleto et al., 2009 lograron implantar *E. curvula* exitosamente en diferentes ambientes y mantenerlas durante 3 años, pero además del riego de implantación fueron requeridos riegos de apoyo variables durante el verano. Como también menciona Dorado et al., 2017, la implantación de los pastos durante el primer año es un factor crítico y debe apoyarse con riego de ser necesario. Sin embargo existen experiencias exitosas en condiciones de secano para ambientes mediterráneos. Lawes et al. (2014) utilizaron la rotación cebada/lupino bajo el sistema de "pasture cropping", no observando diferencias estadísticas en el desarrollo de malas hierbas, indicando que un establecimiento adecuado de los pastos posiblemente contribuyó a controlar las mismas en los sistemas de intercultivo. El segundo aspecto a contemplar, es la probabilidad de déficit hídrico en primavera y otoño (habitual en la región centro de España), ya que perjudica el crecimiento inicial de los pastos y, por ende, su capacidad competitiva en este periodo. Primaveras frías y la posibilidad de heladas tardías implican otro riesgo que perjudica el desempeño de los pastos, teniendo presente su naturaleza tropical. Del mismo modo, inviernos benignos conllevan la necesidad de intervenir en el secado de los pastos para asegurar la siembra de los cultivos principales

al verse demorada la parada invernal de los pastos por efecto de la temperatura, como fue el caso en el último ciclo evaluado.

Agradecimientos

Financiación de los estudios de posgrado de Ignacio M. Luna a través del programa Bec.Ar (ME, Argentina) y proyecto AGL2017-83325-C4-1-R (AEI/FEDER, UE).

Referencias

CORLETO A, CAZZATO E, VENTRICELLI P *et al.* (2009) Performance of perennial tropical grasses in different Mediterranean environments in southern Italy. *Tropical Grasslands* **43**, 129–138.

DORADO J, ANDÚJAR D, SAN MARTÍN C *et al.* (2017) Evaluación de los efectos del sistema combinado de pastos-cultivo sobre las malas hierbas. In: *XVI Congreso de la Sociedad Española de Malherbología. Pamplona-Iruña* (eds M Royuela & A Zabalza,), 159–164, Edita Universidad Pública de Navarra, Pamplona

JONES C (1999) Cropping native pasture and conserving biodiversity: a potential technique. In *Proceedings Bushcare Conference 'Balancing Conservation and Production in Grassy Landscapes*, Clare, South Australia, pp. 142–144.

DESCHEEMAEKER K, LLEWELLYN R, MOORE A, WHITBREAD A (2014) Summer-growing perennial grasses are a potential new feed source in the Mallee. *Crop and Pasture Science* **65**, 1033–1043.

LAWES RA, WARD PR & FERRIS D (2014) Pasture cropping with C4 grasses in a barley-lupin rotation can increase production, *Crop and Pasture Science* **65**, 1002–1015.

Millar GD & BADGERY WB (2009) Pasture cropping: a new approach to integrate crop and livestock farming systems. *Animal Production Science* **49**, 777.

Effect of intercropping of summer grasses and extensive winter crops on weed control

Summary: Intercropping perennial pastures with winter crops is a technique that would allow reducing herbicide use for weed management. The aim of the present work was to analyze the effects of this system on the development of the weed community and establishment of winter crops. Six treatments were tested: Conventional barley and vetch, and the same crops intercropped with two perennial grasses: *Cynodon dactylon* and *Eragrostis curvula*. There were no differences in the establishment of winter crops between conventional and intercropping. The first year, reduction of weed density was higher on intercropping treatments, with an average of 82% y 92% for vetch and barley, respectively. On the second year, the highest weed density was recorded on conventional barley again. Conventional vetch produced more biomass than intercropping; no differences were observed in the case of barley. Weed biomass was not significantly different in the various treatments.

Keywords: Intercropping, winter crops, no-till, weeds.

Determinación de la influencia de la trufa negra (*Tuber melanosporum* Vittad.) sobre la flora arvense asociada a los quemados de plantaciones truferas de la Comarca de la Ribagorza

BARRIUSO J[1], PASCUAL GIRÓN A, AIBAR J[1].

[1]Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural. Instituto agroalimentario de Aragón (IA2). Universidad de Zaragoza.
barriuso@unizar.es, jaibar@unizar.es

Resumen: El objetivo principal de este estudio era comprobar el efecto producido por la trufa fresca y por el compuesto dimetil sulfuro (componente principal del aroma de la trufa negra) en la germinación y crecimiento de las formas reproductivas de 6 especies arvenses: *Convolvulus arvensis, Bromus tectorum, Conyza canadensis , Galium aparine* y *Lolium rigidum* (semillas); *Desmazeria rigida* y *Sedum sediforme* (semillas) como especies que aparecen habitualmente en los quemados, además de *Oxalis latifolia* (bulbos) y *Cyperus rotundus* (tubérculos). Las semillas se desinfectaron superficialmente. El diseño experimental estadístico fue de bloques al azar con 4 repeticiones y 4 tratamientos. La metodología que se realizó constaba de dos recipientes bien diferenciados dentro de un receptáculo mayor, en uno se introdujo la trufa fresca a cuatro dosis diferentes (0, 1, 2 y 4g) o el dimetil sulfuro a saturación y en el otro las semillas o los bulbos, correspondientes a cada especie ensayada. Se introducían en estufas, según las necesidades específicas a 20ºC o a 30ºC, según las normas ISTA. Los aromas de trufa y el dimetil sulfuro han producido efectos detectables en la germinación de las semillas, y tubérculos de estas siete especies. *O. latifolia* además ha visto reducida la germinación de sus bulbos de forma estadísticamente significativa. Se han encontrado diferencias significativas en la longitud y el peso final de los coleoptilos. Las especies *D. rigida, S. sediforme* y *C. canadensis,* que habitualmente aparecen en los quemados, presentaron un poder germinativo y una longitud de sus coleoptilos según la cantidad de trufa utilizada.

Palabras clave: Quemados, dimetil sulfuro, aromas de trufa, germinación

1. Introducción

Desde finales del siglo pasado la producción silvestre de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vittad.) ha ido decayendo de forma alarmante debido a varias causas, sobreexplotación de las truferas del monte, deficiente gestión de las mismas y por el cambio climático que ha modificado el régimen de lluvias, fundamental para completar satisfactoriamente el ciclo del hongo. Las investigaciones y el bien hacer de los

truficultores ha consolidado a la truficultura como una actividad agrícola efectiva y en auge. En la actualidad, la mayor parte de la trufa consumida en el mundo procede de la producción controlada en parcelas de cultivo. No todas las regiones, ni todos los ambientes son propicios para esta actividad y por eso debemos centrarnos en la España caliza.

Las trufas son el fruto (ascocarpo) de un hongo hipogeo Ascomiceto, y en relación simbionte con la raíz de un árbol hospedador, habitualmente de la familia fagáceas. En esta simbiosis planta – hongo, se produce un flujo de intercambio de nutrientes y agua, a través de la micorriza, la cual se forma entre las raíces del árbol y el micelio del hongo. Las plantas truferas tienden a formar una zona desprovista de vegetación que se conoce como quemado, calvero, burns en inglés o brûle en francés. La formación del quemado no es condición necesaria ni suficiente para que el árbol produzca trufas, siendo normal que existan quemados en los que no se producen y, al contrario, encinas que producen trufas sin que hayan desarrollado una zona quemada muy aparente (Reyna**,** 2012).

La causa por la que se produce este fenómeno radica en el efecto alelopático que tiene el micelio de la trufa expandido por el suelo, el cual impide la germinación de otros vegetales. En diversas experiencias se ha comprobado cómo las semillas de cebada y trigo germinaban en mucha menor proporción cuando se regaban con extractos de trufa (Bonfante *et al*., 1971). Durdević *et al*., (2016) demostraron cómo los metabolitos volátiles que produce la trufa tienen efectos fitotóxicos produciendo una fuerte inhibición de las raíces y del desarrollo del cotiledón.

Plattner y Hall (1995), confirmaron la gran abundancia de micorrizas de *T. melanosporum* en los quemados desarrollados, y a su vez la producción de lesiones en las raíces de las malas hierbas, lo que indica que el hongo se comporta como un patógeno en las malas hierbas de los quemados. Queda por determinar si este efecto patógeno actúa en tándem con la producción de sustancias volátiles tóxicas por el fruto del hongo. La expansión del quemado provoca cambios notorios en el sistema radicular del huésped, con la localización de la zona de competición más agresiva en la periferia del mismo (Sourzat, 2010). Además del efecto alelopático a causa de las sustancias químicas inhibidoras de la germinación y el crecimiento, también el hecho de una potente micorrización otorga al árbol una eficiencia superior en la competencia por el agua. Los quemados comienzan a producirse normalmente entre el 4º y el 10º año de la plantación del árbol micorrizado, comenzando alrededor de la planta para luego ir separándose según va avanzando la zona de raíces finas. Este, evita la competencia de otros vegetales hacia el árbol simbionte del que vive (Reyna y De Miguel, 2012).

Olivier *et al.*, (2002) aseguran que las primeras plantas que desaparecen de la zona del quemado son las especies dicotiledóneas. Después las gramíneas colonizadoras de terrenos baldíos. Finalmente, sólo quedan en el quemado las plantas favorecedoras o inhibidoras de zonas potenciales de producción trufera. Las especies con mayor frecuencia de aparición en los distintos quemados son en la cuenca mediterránea, *Sedum sediforme*, los caméfitos *Helianthemum marifolium* y *Thymus vulgaris* y las gramíneas

vivaces *Avenula bromoides* y *Koeleria vallesiana*. Entre los terófitos o herbáceas anuales destaca la presencia de *Arenaria leptoclados* y *Desmazeria rigida* (Garcia Barreda *et al.*, 2012).

Otro estudio realizado en la comunidad de Navarra, revela datos de las especies con mayor abundancia presentes en las parcelas estudiadas en dicho estudio, siendo *Convolvulus arvensis, Desmazeria rigida, Andryala integrifolia, Astragalus monspessulanun, Senecio vulgaris, Vulpia myuros, Calendula arvensis, Sedum sediforme, Erodium cicutarium, Geranium colombinum, Muscari neglectum, Avena barbata y Anagallis arvensis*, entre otras. Se trata de especies comunes, lo que refleja que se requiere un estudio más exhaustivo para poder concluir sobre cuáles son las especies más características de los quemados de las truferas (González Armada *et al*., 2005).

La elección del dimetil sulfuro para este ensayo radicó en los estudios de Culleré *et al*., (2010) y de Durdevic *et al*., (2016) que identificaron la mayoría de las moléculas responsables de los aromas de este hongo, siendo esta una de las más importantes en el conjunto de todas ellas.

2. Material y Métodos

El estudio se ha realizado en los términos municipales de Graus y Benabarre en la Comarca de la Ribagorza, al noreste de la provincia de Huesca. Las parcelas de truficultura analizadas poseen unas condiciones edafo-climáticas muy similares, en altitudes que van desde los 500 hasta los 750 msnm, y se encuentran a una distancia de 16 km, entre ellas.

Material vegetal. Para la elección de las especies de flora se tuvieron en cuenta los siguientes factores, como era la presencia de la especie en truferas silvestres o en plantaciones truferas, o si la especie pudiera encontrarse en espacios donde existe posibilidad de haber un trufero. Se han analizado las especies *Convolvulus arvensis, Bromus tectorum, Galium aparine, Conyza canadensis* y *Lolium rigidum, q*ue se multiplican por semillas y *Oxalis latifolia*, que se multiplica por bulbos; *Desmazeria rigida y Sedum sediforme* como especies que aparecen habitualmente en los quemados (semillas). Y, por último, una especie de la familia de las Ciperáceas, que se multiplica por tubérculos como *Cyperus rotundus*.

Metodología empleada. Se utilizaron dos recipientes bien diferenciados dentro de un receptáculo mayor, en uno se introdujo la trufa fresca a cuatro dosis diferentes (0, 1, 2 y 4g) o el dimetil sulfuro a saturación y en el otro las semillas o los bulbos, correspondientes a cada especie ensayada (fig. 2).



Figura 2. Metodología de los experimentos. Un recipiente con trufa o dimetil sulfuro y encima otro con las semillas, bulbos o tubérculos a crecer. En este caso semillas de la especie *Desmazeria rigida*. Todo incluido en otro recipiente mayor y cerrado.

Tanto las semillas como los bulbos o tubérculos se introdujeron en estufas de cultivo para su germinación o desarrollo. Unas a 20^{0}C, las de invierno y otras a 30^{0}C, las adaptadas a primavera-verano. Cada recipiente mayor constituye una unidad experimental, planeando un ensayo en bloques al azar con 4 repeticiones y 4 tratamientos, que incluye un testigo sin aporte de trufa y tres dosis crecientes de aporte de trufa al bote, es decir 0, 1, 2 y 4 gramos por ensayo. El experimento utilizando aroma de trufa (dimetil sulfuro) era una repetición más con atmósfera saturada de este producto volátil. A lo largo de los ensayos se realizarán tres comprobaciones tomando datos de los siguientes parámetros: Número de semillas germinadas, longitud de los brotes del coleoptilo y peso seco de los brotes. Para el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos: se utilizó el programa SPSS versión 21.0., con el que se analizó el porcentaje de germinación y la longitud del coleoptilo para cada una de las especies y cada una de las variables de la trufa, pesos y aroma empleados.

3. Resultados y Discusión

Los resultados de los ensayos, respecto al crecimiento del coleoptilo y porcentaje de germinación de semillas y bulbos de las especies *Conyza canadensis y Sedum sediforme*, *Convolvulus arvensis, Galium aparine, Bromus tectorum, Desmazeria rigida, Lolium rigidum, Cyperus rotundus* y *Oxalis latifolia* ha sido significativamente menor cuanto mayor era la cantidad de trufa fresca utilizada. A modo de ejemplo se muestra en la tabla1 el comportamiento de *G. aparine*. En la Tabla 1 el de *G. aparine*, en la tabla2 el de *D. rigida* y en la tabla 3 el de *O. latifolia.* Sobre el comportamiento de las especies *C. arvensis* y *C. rotundus* ha sido diferente, a medida que se incrementaba la cantidad de trufa se observó una mayor longitud del coleoptilo, parece como una adaptación a concentraciones altas de estos compuestos volátiles alelopáticos. Se realizó un experimento similar al desarrollado con trufa, pero en vez de incorporar trufa se introdujeron distintas cantidades de dimetil sulfuro (0,4, 0,6 y 0,8mL) como compuesto mayoritario de los aromas volátiles de la trufa. La alta concentración en el ambiente producido por este elemento tan volátil hizo que ninguna de las semillas, ni bulbos ni rizomas germinaran.

	gl	*F*	*Sig.*	
% germinación	3	7,125	0,008	
Trufa (g)	*N*	*Subconjunto para alfa= 0.05*		
4	2	20,00a		
2	2	21,50ab		21,50ab
1	2			22,50b
0	2			24,50b

Tabla 1. ANOVA al 95% de confianza de la germinación de *G. aparine* y Test de Duncan de la longitud de la raíz a distintas concentraciones de trufa.

	gl	*F*	*Sig.*	
% germinación	3	82,267	0,000	
Muestra trufa (g)	*N*	*Subconjunto para alfa= 0.05*		
4	2	10,00a		
2	2			24,00b
1	2			24,50b
0	2			24,50b

Tabla 2. ANOVA al 95% de confianza de la germinación de *D. rigida* y Test de Duncan de la longitud de la raíz a distintas concentraciones de trufa.

	gl	*F*	*Sig.*	
% germinación	3	17,333	0,009	
Trufa (g)	*N*	*Subconjunto para alfa= 0.05*		
4	2	1,00a		
2	2	2,50ab	2,50ab	
1	2		3,50b	
0	2			7,00c

Tabla 3. ANOVA al 95% de confianza de la germinación de *O. latifolia* y Test de Duncan de la longitud de la raíz a distintas concentraciones de trufa.

Aunque estos ensayos no pueden ser concluyentes más que en la medida que el dimetil sulfuro, a altas concentraciones no permite la germinación de los sistemas reproductivos de las arvenses estudiadas, es un punto muy interesante de partida para futuros ensayos en esta dirección.

Nuestro agradecimiento a la Diputación Provincial de Huesca por la concesión de una Beca de Investigación “Félix de Azara” (2018) para la realización de este estudio.

4.- Bibliografía

BONFANTE P, FONTANA A, MONTACCHINI F (1971). Studi sull’ ecologia del *Tuber melanosporum*. I. Dimostrazione di un effetto fitotosico. *Allionia*, **17**, 47-54.

CULLERÉ L, FERREIRA V, CHEVRET B, VENTURINI ME, SÁNCHEZ-GIMENO AC, BLANCO, D (2010). Characterisation of aroma active compounds in black truffles (*Tuber melanosporum*) and summer truffles (*T. aestivum*) by gas chromatography–olfactometry. *Food Chemistry*, **122 (1)**, 300-306.

DURDEVIĆ L, GAJIĆ G, JARIĆ S, KOSTIĆ O, MITROVIĆ M, PAVLOVIĆ P (2016). Truffles Allelopathy. *Allelopathy Journal*, **38**, 1-24.

GARCÍA BARREDA S., REYNA S, PÉREZ R, RODRÍGUEZ JA (2012). Ecología de la trufa y las áreas truferas. En S. Reyna (Ed.), Truficultura. Fundamentos y técnicas (pp. 154-208). *Ed. Mundi- Prensa*, Madrid.

GONZÁLEZ B, CAVERO R, DE MIGUEL AM (2005). Diversidad florística en zonas truferas de Navarra. 4º Congreso Forestal Español: CD de Actas; Sep 26-30; Zaragoza, España. Zaragoza (8pp.), Ed. *Sociedad Española de Ciencias Forestales*. http://hdl.handle.net/10171/22052

OLIVIER JM, SAVIGNAC JC, SOURZAT P (2002). Truffles et trufficulture. *Fanlac*, Périgueux, France. 263pp.

REYNA S(Ed.). (2012). Truficultura: Fundamentos y Técnicas (2ª ED.) *Ed. Mundi- Prensa*, Madrid. 720pp.

REYNA S, DE MIGUEL AM (2012). Las micorrizas. Ciclo biológico de la trufa. En S. Reyna (Ed.), Truficultura. Fundamentos y técnicas (pp. 107-152). *Ed. Mundi- Prensa, Madrid*. 720pp.

SOURZAT P (2010) Le principe de précaution en trufficulture. Les nouvelles techniques de culture de la truffe. pp. 32–46.*M.G.D., Sarlat.*

Determination of the influence of the black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.) on the flora associated with the "truffle burn" in plantations in the region of Ribagorza

Summary: The main objective of this study was to verify the effect produced by the fresh truffle and the dimethyl sulfide compound (main component of the aroma of the black truffle) in the germination and growth of the reproductive forms of 6 weed species: *Convolvulus arvensis*, *Bromus tectorum*, *Conyza canadensis*, *Galium aparine* y *Lolium rigidum* (seeds); *Desmazeria rigida* y *Sedum sediforme* (seeds) as species that usually appear in the burns, in addition to *Oxalis latifolia* (bulbs) and *Cyperus rotundus* (tubers) The seeds were superficially disinfected. The statistical experimental design was randomized blocks with 4 repetitions and 4 treatments. The methodology that was carried out consisted of two well-differentiated containers inside a larger receptacle, in one the fresh truffle was introduced at four different doses (0, 1, 2 and 4g) or the dimethyl sulfide at saturation and in the other, the seeds or the bulbs, corresponding to each species tested. They were introduced in stoves, according to specific needs at 20ºC or 30ºC, according to ISTA standards. The aromas of truffle and dimethyl sulfide have produced detectable effects on the germination of the seeds, and tubers of these seven species. *O. latifolia* has also reduced the germination of its bulbs in a statistically significant way. Significant differences have been found in the length and final weight of coleoptiles. Species *D. rigida*, *S. sediforme* and *C. canadensis*, which usually appear in the burns, showed a germinative power and a length of their coleoptiles depending on the amount of truffle used.

Key words: Burns, dimethyl sulfur, truffle flavors, germination

Uso de *Pilosella officinarum* como cubierta vegetal bajo las líneas de cultivo en viña ecológica

VALENCIA-GREDILLA F[1], FERNÁNDEZ-QUINTANILLA C[2], DORADO J[2], GUERRA JG[2], CABRERA C[1], RECASENS J[1]

[1]ETSEA. Agrotecnio. Universitat de Lleida. Avda. Rovira Roure 191. 25198 Lleida.
francisco.valencia@hbj.udl.cat; carlos.cabrera@udl.cat; jrecasens@hbj.udl.cat
[2]Instituto de Ciencias Agrarias. CSIC. Serrano 115b. 28006 Madrid.
cesar@ica.csic.es; jose.dorado@csic.es; jose.garcia.guerra@madrid.org

Resumen: El uso de una cubierta vegetal bajo la línea de cultivo de viñedo en producción ecológica, se plantea como una alternativa al pase de intercepas con el fin de reducir la erosión del suelo y favorecer la competencia contra malas hierbas. Con este objetivo, se han implementado en viñedos de Raïmat (Lleida) y Arganda del Rey (Madrid) sendos ensayos con el fin de evaluar la capacidad de instalación y de expansión de la especie estolonífera *Pillosella officinarum*. En invierno/primavera de 2017/2018 se realizó en ambas localidades la siembra y el trasplante de la especie a diferentes densidades: en Raïmat a 10 kg ha^{-1} y a 2, 5, 10, 20 y 40 plantas m^{-2}, y en Arganda del Rey a 8 kg ha^{-1} y a 8, 16,5 y 25 plantas m^{-2}. A lo largo de la campaña 2018 e inicios de 2019 se valoró la supervivencia en el trasplante y el porcentaje de cobertura de *P. officinarum* como medida de la expansión de la especie. Los resultados obtenidos mostraron que a las mayores densidades ensayadas (20 y 40 plantas m^{-2} en Raimat y 25 plantas m^{-2} en Arganda del Rey) se alcanza, al final de campaña, un denso tapiz y un recubrimiento prácticamente completo del suelo.

Palabras clave: acolchado, malas hierbas, mulching, rosetas estoloníferas, viñedos.

1. Introducción

En viñedos ecológicos, el mantenimiento del suelo libre de malas hierbas precisa de intervenciones frecuentes mediante el pase de intercepas. Esta estrategia comporta ciertos inconvenientes, tales como la pérdida de estructura del suelo y el riesgo de erosión, aparte de causar posibles lesiones a cepas jóvenes. A su vez, en el caso de disponer de riego por goteo, la proliferación de malas hierbas se ve favorecida, siendo necesaria una mayor recurrencia de los pases de intercepas aumentando el riesgo de ocasionar daños en los tubos y puntos de conexión y, a su vez, generar mayores costes debido al consumo de combustible y, por ende, mayores emisiones de CO_2.

A fin de evitar estas continuas intervenciones, surgen alternativas como son la gestión de una cubierta vegetal bajo la línea del cultivo. Una cubierta vegetal viva en viña es una técnica de mantenimiento del suelo con especies vegetales, bien dejando crecer la flora espontánea, o bien sembrando ciertas especies destinadas para tal fin (EVENA 2012). La implantación de una cubierta vegetal brinda varias ventajas tanto

agronómicas como medioambientales, como son: el aumento del contenido de materia orgánica y la actividad microbiana del suelo, la reducción del riesgo de formación de una costra superficial, la mejora de la capacidad de retención de agua, el incremento de la actividad biológica y la fijación de elementos nutritivos en el complejo de cambio, lo que se traduce, en definitiva, en un aumento en la fertilidad del suelo (Zibri et al., 2011; DeVetter et al., 2015). No obstante, se discute sobre el posible efecto competitivo que esa cubierta puede ocasionar sobre el vigor de la viña (Sagüés et al., 2013), aunque ciertos estudios apuntan que constituye una herramienta sostenible, ya que a través de una correcta gestión y regulación del riego se puede controlar el vigor de la vid e incluso aumentar la calidad del mosto (Ibáñez, 2015; Sagüés et al., 2013).

Las cubiertas vegetales tienen, a su vez, un efecto competitivo inhibidor de las malas hierbas tanto por su efecto físico (intercepción de luz y temperatura), como químico debido a la posible liberación de sustancias alelopáticas (Dhima, 2006). En este sentido, una especie que ha mostrado resultados prometedores en otros países es *Pilosella officinarum* F.W.Schultz et Sch.Bip (= *Hieracium pilosella* L.). Se trata de una asterácea plurianual estolonífera que muestra hábito como hemicriptófito. Crece de forma natural en pastizales secos sobre sustratos superficiales en ambientes frescos por la mitad Norte de la Península Ibérica, entre los 500 y 2000 m.s.n.m. (Mateo Sanz y del Ejido Mazuelas, 2017). Dada su capacidad de propagación vegetativa mediante el desarrollo de estolones y generación de nuevas rosetas, se ha propuesto su uso como cubierta vegetal bajo las líneas de cultivo, ya que esta especie puede llegar a formar un denso tapiz donde se vería muy limitada la incorporación de semillas de malas hierbas así como su posterior emergencia.

En este estudio se presentan los resultados de sendos ensayos llevados a cabo en viñedos ecológicos de Raïmat (Lleida) y Arganda del Rey (Madrid), cuyo objetivo era evaluar la capacidad de implantación y de recubrimiento del suelo, bajo las líneas de viña, de la especie *P. officinarum*.

2. Material y Métodos

El ensayo se llevó de forma paralela en los viñedos de Raïmat (Lleida) y Arganda del Rey (Madrid). En otoño de 2017, se sembraron semillas de *P. officinarum* en alveolos con turba y se mantuvieron en invernadero hasta su trasplante a finales de invierno de 2018. El trasplante se realizó a distintas densidades: 2, 5, 10, 20 y 40 plantas m^{-2} en Raïmat y a 8, 16,5 y 25 plantas m^{-2} en Arganda del Rey. Paralelamente, en noviembre de 2017 se sembraron semillas de esta especie a una dosis de 10 kg ha^{-1} en Raïmat y de 8 kg ha^{-1} en Arganda del Rey. Cada zona de trasplante o siembra (plot) era de 3,5 m –correspondiente a tres espacios intercepas– y a una anchura de 40 cm, en Raïmat, y de 20cm, en Arganda del Rey, a cada lado de la línea del cultivo. El ensayo siguió un diseño completamente aleatorizado y con seis repeticiones para cada densidad de siembra o trasplante. La variedad de viña donde se instaló el ensayo era Cabernet Sauvignon en Raïmat y Tempranillo en Arganda del Rey y en ambos casos correspondía a un sistema de plantación en espaldera con riego por goteo.

En los plots de seguimiento, se estimó el porcentaje de supervivencia de las plantas tras el trasplante a los 21 y 45 días en Raïmat y a los 16 y 58 días en Arganda del Rey, así como el número de plántulas emergidas tras la siembra a los cuatro y cinco meses en Raïmat y a los tres meses en Arganda del Rey. En octubre de 2018 y abril de 2019, se cuantificó el porcentaje de suelo cubierto por *P. officinarum* con el fin de evaluar su capacidad expansiva acorde con la densidad inicial establecida de siembra o trasplante.

Estos valores de porcentaje de establecimiento y de cobertura de suelo, según densidades de trasplante y de siembra, fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) y posterior separación de medias mediante test de Tukey ($P < 0.05$) con el programa JMP Pro 14 (SAS Institute 2010. SAS Campus Drive, Cary, NC 27513, USA. SAS Institute, Inc.).

3. Resultados y Discusión

Ensayo en Raïmat:

El número total de emergencias contabilizadas a los cuatro y cinco meses después de la siembra fueron, respectivamente, 21,2 y 24,2 plantas m^{-2}. Respecto al trasplante se observó que tanto a los 21 días como a los 45 días después de realizar el mismo, el porcentaje de establecimiento de la especie fue, para todas las densidades ensayadas, superior al 91%, e incluso cercano al 98% en algunos casos (Tabla 1). No se observaron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de establecimiento por parte de la especie, entre las densidades de trasplante ensayadas.

Tabla 1. Porcentaje de supervivencia de plantas de *Pilosella officinarum* en dos fechas diferentes después del trasplante: 21 y 45 días en Raimat y 16 y 59 días en Arganda del Rey.

Raïmat			Arganda del Rey		
Densidad (pl m^{-2})	21 días	45 días	Densidad (pl m^{-2})	16 días	58 días
2	97,6	97,6			
5	96,4	96,4	8	100	100
10	94,0	94,0	16,5	100	100
20	92,6	91,4	25	100	100
40	96,3	92,7			

No se han observaron diferencias significativas entre los valores medios registrados en cada columna

En cuanto al porcentaje de suelo cubierto por parte de *P. officinarum* se observó un claro incremento a lo largo del tiempo tanto en los plots procedentes de siembra como de trasplante (Figura 1). Estos valores fueron menores en los primeros, tanto en octubre 2018 (con un 49%) como en abril de 2019 (con un 62%) (Tabla 2). Por el contrario, en los plots donde se realizó el trasplante la capacidad de recubrimiento del suelo resultó más alta. En octubre de 2018, estos valores oscilaron entre un 45% para la menor densidad (2 pl m^{-2}) y un 85% para las densidades de trasplante más altas (20 y 40 pl m^{-2}), sin diferencias significativas con las densidades intermedias de trasplante (5 y 10 pl m^{-2}). En el mes de abril de 2019, catorce meses después de la instalación del ensayo, el porcentaje de cobertura del suelo observado a la menor densidad de trasplante de 2 pl m^{-2} fue de 53%, significativamente menor que el valor (95%) registrado en las dos densidades más altas. En esta fecha, la cobertura media del suelo mostrada por las plantas procedentes de la siembra alcanzó un 62%, un valor intermedio en relación a las diferentes densidades de trasplante.

Tabla 2. Porcentaje de suelo cubierto por *Pilosella officinarum*, bajo las líneas de viña, en las distintas fechas de muestreo, a partir de siembra y trasplante en las dos localidades de estudio.

Raïmat			Arganda del Rey		
Densidad (pl m^{-2})	2018 octubre	2019 abril	Densidad (pl m^{-2})	2018 octubre	2019 abril
Semilla	49 bc	62 ab	Semilla	35 c	92 b
2	45 c	53 b			
5	78 ab	83 ab	8	31 c	90 b
10	55 abc	61 ab	16,5	47 b	91 b
20	88 a	95 a	25	71 a	98 a
40	85 ab	95 a			

En cada columna, valores con distinta letra indican diferencias significativas (P<0,05)



Figura 1. Recubrimiento del suelo por parte de *Pilosella officinarum* bajo la línea de la viña

Ensayo en Arganda del Rey:

En el muestreo realizado tres meses después de la siembra se contabilizó una media de 29,7 pl m^{-2}, un valor similar al observado en Raïmat. En relación al trasplante, el establecimiento de *P. officinarum* en ambas fechas de muestreo fue del 100%, sin observar ninguna baja en las plantas utilizadas en esta localidad (Tabla 1). La utilización de geotextil para proteger a las plantas recién trasplantadas de las bajas temperaturas tuvo probablemente que ver con el éxito de esta operación.

Tal y como ocurrió en Raïmat, la cobertura generada por *P. officinarum* se incrementó significativamente con el tiempo, tanto en siembra como en trasplante (Tabla 2). En los plots procedentes de siembra, este incremento pasó del 35% en octubre 2018 al 92% en abril 2019, es decir, en el segundo año el porcentaje de cobertura alcanzó valores similares a los del trasplante en plots que partían de una densidad de planta intermedia (16,5 pl m^{-2}, Tabla 2). Únicamente en plots donde se trasplantó la densidad más alta (25 pl m^{-2}), los valores resultaron significativamente superiores pasando de un 71% de

cobertura en 2018 a un 98% en 2019. En cualquier caso, el éxito del trasplante observado en el segundo año en Arganda del Rey se refleja en unas cifras siempre superiores al 90% de cobertura, independientemente de la densidad de planta utilizada.

En definitiva, con los resultados obtenidos en ambos ensayos, podemos confirmar que *Pilosella officinarum* se presenta como una prometedora especie tapizante para ser utilizada a modo de cubierta vegetal en las hileras de viña. El proceso de instalación de esta especie mediante su siembra resulta lento siendo necesarios varios meses para alcanzar un alto porcentaje de cobertura, si bien transcurrido el primer año se alcanzan valores de cobertura similares a algunas densidades de trasplante. El trasplante, por su parte, siendo más laborioso, permite alcanzar una cobertura del suelo mayor y más rápida, aunque obliga a ciertos cuidados como pueden ser la protección del frio con geotextile de las plantas recién trasplantadas, o bien la realización de escardas manuales de malas hierbas durante el primer año, con el fin de favorecer la expansión de la especie. Algunas de estas desventajas han sido citadas por AGRIDEA (2009), si bien, detalla que el efecto competitivo de la especie tras su correcto establecimiento llega a ser, en años sucesivos, eficaz frente a diversas malas hierbas pudiendo generar incluso efectos alelopáticos.

4. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por del Proyecto Plan Estatal - Retos de la Sociedad, Ref: AGL2017-83325-C4-2-R y AGL2017-83325-C4-1-R financiados por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y Fondos EU-FEDER. F. Valencia Gredilla y C. Cabrera han contado con una beca predoctoral otorgada por la Universitat de Lleida.

Referencias

AGRIDEA (2009) Arboriculture Système Sandwich. www.agridea.ch. Last accessed 20 May 2009.

DE VETTER LW, DILLEY CA, NONNECKE GR (2015) Mulches reduce weeds, maintain yield, and promote soil quality in a continental-climate vineyard. *American Journal of Enology and Viticulture* **66**, 54–64.

DHIMA KV, VASILAKOGLOU IB, ELEFTHEROHORINOS IG, LITHOURGIDIS AS (2006) Allelopathic potential of winter cereal cover crop mulches on grass weed suppression and sugarbeet development. *Crop Science* **46**, 1682–1691.

EVENA (2012) Ensayos en cubiertas vegetales en Viña. 1995-2010. Departamento de Desarrollo Rural, Medio Ambiente y Administración Local. Litografía Ipar. 182p.

IBÁÑEZ PASCUAL S (2015) Mantenimiento del suelo en el viñedo mediante cubiertas vegetales: aspectos generales y experiencias. Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino. Logroño: Consejería de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente. Ochoa Impresores. 168p.

MATEO SANZ G, EJIDO MAZUELAS F (2017) Estudio monográfico sobre los géneros *Hieracium* y *Pilosella* en España. Ed. Jolube. 405 pgs.

SAGÜÉS A, AGUIRREZABAL F, CIBRIÁN F, CAMINERO L, SUBERVIOLA J (2013) Gestión del suelo vitícola: cubiertas vegetales e incidencia en la calidad del mosto y vino. Acenología.

http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/gestion_suelo_viticola_cienc0813.htm (Con acceso el 23-05-2019.)

ZRIBI W, FACI JM, ARAGÜES A (2011) Efectos del acolchado sobre la humedad, temperatura, estructura y salinidad de suelos agrícolas. ITEA **107**, 148-162.

Pilosella officinarum as a cover-crop in the intra-rows in an organic vineyard.

Summary: The implementation of a cover-crop in the vine rows (beneath the vines) can be considered as an alternative to the use of in-row tillage in an organic vineyard with the aim to reduce soil erosion and improve competition against weeds. With this objective, two experiments were implemented in vineyards of Raïmat (Lleida) and Arganda del Rey (Madrid) in order to evaluate the installation and expansion capacity of the stoloniferous species *Pillosella officinarum*. In winter/spring 2017/2018, sowing and transplanting of the species at different densities was carried out in both locations: in Raïmat at 10 kg ha^{-1} and at 2, 5, 10, 20 and 40 plants m^{-2}, and in Arganda del Rey at 8 kg ha^{-1} and at 8, 16.5 and 25 plants m^{-2}. Throughout the season 2018 and the beginning of 2019, the survival in the transplant and the cover percentage of *P. officinarum* as a measure of the expansion of the species were assessed. Results showed that, at the end of the campaign, a dense tapestry and practically complete soil coverage was achieved at the highest densities tested (20 and 40 m^{-2} plants in Raimat and 25 m^{-2} plants in Arganda del Rey).

Keywords: Mulching, weeds, stoloniferous rosettes, vineyards.

"Humildad y fiereza en la misma pieza": uso del mastranzo (*Mentha suaveolens* Ehrh.) para control de malezas

IGLESIAS-RODRÍGUEZ J, PUIG CG, PARDO-MURAS M, PEDROL N[1]

[1]Departamento de Biología Vegetal y Ciencias del Suelo. Universidade de Vigo. Campus As Lagoas-Marcosende, 36310, Vigo.
joseiglesiasr@uvigo.es, cgpuig@uvigo.es, mpardomuras@uvigo.es, pedrol@uvigo.es

Resumen: La especie silvestre perenne *Mentha suaveolens* Ehrh. (mastranzo) está ampliamente distribuida en la Europa mediterránea. Su accesibilidad en los agroecosistemas, junto con evidencias previas de actividad biológica y riqueza en compuestos potencialmente alelopáticos, nos llevó a plantearnos su uso para el control de malezas. Se ensayó como abono verde en un cultivo mixto de fresa y cebolleta en invernadero de producción ecológica. Para ello, se incorporó al suelo biomasa aérea en flor de mastranzo y se estudiaron sus efectos sobre las malezas durante cuatro meses. Paralelamente, se monitorizó el estado fisiológico de los cultivos utilizando la plataforma fenotípica portátil MultispeQ. *Mentha suaveolens* redujo significativamente la densidad y la biomasa de malezas durante los dos primeros meses tras su incorporación. Las especies arvenses *Stellaria media*, *Veronica* sp. y *Poa annua* fueron sensibles a la fitotoxicidad de *M. suaveolens*. Además, el mastranzo no produjo síntomas de estrés fisiológico en los cultivos. El abonado en verde a base de *M. suaveolens* recogida en las inmediaciones de la explotación puede ser una técnica viable para el control ecológico de malezas en invernaderos de producción hortícola, en combinación con otras prácticas de manejo integrado de malezas.

Palabras clave: abonos verdes, agricultura ecológica, fitotoxicidad, *Poa annua*, *Stellaria media*, *Veronica* sp.,

1. Introducción

En la búsqueda de nuevos bioherbicidas, el uso de biomasa alelopática incorporada al suelo como abono verde se plantea como una herramienta ecológica en el manejo integrado de malezas en campos de cultivo (Puig *et al*., 2013, 2019; Pardo-Muras *et al*., 2018). Dada la abundancia de biomasa de *Mentha suaveolens* Ehrh. (mastranzo) en el sistema agroforestal atlántico y las evidencias de fitotoxicidad presentes en los aceites esenciales y extractos acuosos de otras especies de su género, el mastranzo podría ser utilizado como un cóctel natural de aleloquímicos con efecto bioherbicida que, bajo determinadas condiciones y debidamente dosificados, al ser aportados como abonos

verdes controlasen la germinación y/o crecimiento de malas hierbas en cultivos tolerantes. El objetivo principal de este estudio consistió en probar la viabilidad del uso de biomasa seca de *Mentha suaveolens* en forma de abono verde y su efectividad para el control de malezas en cultivos mixtos en invernadero de producción ecológica.

2. Material y Métodos

Durante octubre de 2017, en las inmediaciones del campus de la Universidad de Vigo (Galicia, España), se recolectó la parte aérea en flor de la especie silvestre *M. suaveolens*. Todo el material recogido fue secado al aire en oscuridad y almacenado en bolsas de plástico hasta su uso. Inmediatamente antes de ser incorporado al suelo de cultivo como abono verde, el material vegetal se cortó en porciones de aproximadamente 1 cm^2. El experimento se llevó a cabo en un invernadero localizado en Pazos de Borbén (42° 18' 46.3" N, 8° 29' 51.1" W, 385 m. s. n. m.), próximo a la Serra do Suido (Galicia, NO España). Dentro del invernadero, se eligió un terreno con un suelo de tipo franco-arenoso (horizonte Ap) que había sido dedicado a la producción de flores durante 20 años, y dejado en barbecho los dos años anteriores al ensayo..

Para la realización del ensayo se dividió el terreno en 9 parcelas de 2,25 m^2 cada una. Estas nueve parcelas se distribuyeron al azar para acoger los tratamientos del ensayo: en tres parcelas se incorporó al suelo biomasa seca de *M. suaveolens* en una proporción del 1% (dw/dw) (Puig *et al.*¸ 2013); otras tres parcelas se destinaron al tratamiento de escarda manual, y las tres restantes se dejaron sin tratamiento como control del ensayo. En cada parcela se plantaron 49 plantones de fresa, intercaladas con otros 49 de cebolleta.

Las malezas crecidas en cada parcela se muestrearon mensualmente en los cuatro meses siguientes al inicio del ensayo (diciembre de 2017, y enero, febrero y marzo de 2018). El tratamiento de escarda manual se llevó a cabo tras el primer y el segundo muestreo de malezas (diciembre de 2017 y enero de 2018). El muestreo se realizó con ayuda de cuadrantes de 25x25cm, que se lanzaron al azar en la parcela correspondiente, excluyendo los márgenes para evitar el "efecto borde". Se realizaron 3 réplicas por parcela, resultando en un total de 9 réplicas por tratamiento. Aquellas malezas encerradas en cada cuadrante se cortaron a nivel del suelo, se guardaron en bolsas debidamente etiquetadas y se trasladaron al laboratorio donde se almacenaron a 4ºC. Una vez allí, se llevó a cabo la caracterización botánica de las muestras y el conteo del número de plántulas por área muestreada (densidad). Las plantas separadas por especie se secaron en la estufa a 70°C durante 72h y se pesaron para determinar la biomasa total de especies arvenses por cuadrante muestreado, así como la aportación de cada especie a la biomasa total.

El estado fisiológico de los dos cultivos se monitorizó mes a mes, a través de los siguientes parámetros fisiólogicos utilizando la plataforma fenotípica portátil MultispeQ v.1.0 (PhotosynQ LLC, East Lansing, MI, EEUU): contenido relativo en clorofilas o ICC, relación FvP/FmP (índice de eficiencia fotosintética basado en fluorescencia de clorofilas: fluorescencia variable potencial/fluorescencia máxima potencial) y grosor de las hojas. Se eligieron estos parámetros ya que cualquier variación en sus rangos

normales pueden ser indicativos de estrés, ya sea por la competencia por nutrientes, espacio y luz con las malezas (competencia por los recursos), o por el efecto potencial de los compuestos aleloquímicos liberados por el abono verde a base de mastranzo en el suelo.

Las mediciones en los dos cultivos se realizaron siempre inmediatamente antes de cada recogida de muestras de malezas. Con el fin de estandarizar la toma de datos a lo largo del tiempo, las mediciones simultáneas se realizaron en la hoja más joven del cultivo completamente desenvuelta, entre la nervadura central y el margen foliar.

Los datos obtenidos se analizaron mediante ANOVA de una vía y prueba post-hoc de Waller- Duncan de comparación múltiple de medias, en caso de varianzas homogéneas. En el caso de datos no paramétricos, se realizaron las pruebas de Kruskal-Wallis y la prueba post-hoc T2 de Tamhane. Todos los datos fueron analizados mediante el programa IBM SPSS Statistics 19.0 software package (IBM SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Resultados y Discusión

La dinámica de efectos observada en este estudio es similar a la descrita por Chalkos *et al.*, (2010) tras la incorporación de *M. spicata* compostada al suelo. En los muestreos realizados durante los dos primeros meses, el mastranzo controló tanto la biomasa como la densidad de las especies arvenses con eficiencia similar a la del tratamiento de escarda manual (Figura 1). Debe destacarse que la escarda es el método principal o suplementario más utilizado para el control de malezas en la agricultura ecológica (Merfield, 2002), sobre todo en producción hortícola de invernadero, considerándose el método mecánico más efectivo, pero también el más demandante en mano de obra y tiempo de trabajo. La posibilidad de prescindir de al menos una tanda de escarda utilizando un recurso disponible en el agroecosistema puede suponer una reducción considerable del coste de la producción de invernadero.

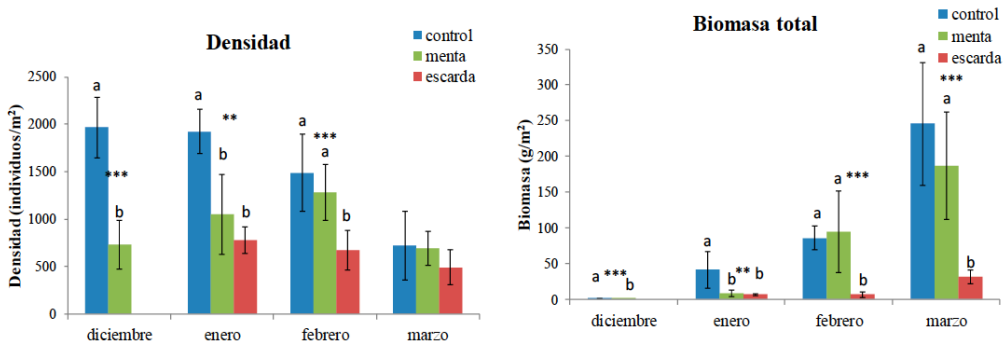


Figura 1. Efectos de la incorporación al suelo de *Mentha suaveolens* como abono verde y de la escarda manual sobre la densidad y biomasa de especies arvenses, frente al control sin tratamiento, a lo largo de cuatro meses. Se representan las medias de 9 réplicas; las barras de error representan la desviación típica. Los asteriscos denotan efectos significativos de los tratamientos: * $P \leq 0{,}05$; ** $P \leq 0{,}01$; *** $P \leq 0{,}001$; sin asterisco, no significativo ($P > 0{,}05$); ANOVA o Kruskal-Wallis. Para cada mes, valores

medios etiquetados con letras distintas son significativamente diferentes ($P \leq 0{,}05$); pruebas post-hoc Waller-Duncan o T2 de Tamhane.

En la Figura 2, se representa la evolución de la biomasa de las especies arvenses comunes a todos los tratamientos y presentes en la práctica totalidad de las parcelas: *Stellaria media* (L.)Vill., *Cerastium glomeratum* Thuill., *Veronica* sp. y *Poa annua* L. Los resultados obtenidos demostraron un control significativo de la emergencia de *S. media*, *Veronica* sp. y *P. annua.* En diciembre, la abundante *S. media* fue controlada por el abono verde a base de mastranzo, con una disminución altamente significativa ($P \leq 0{,}001$) de la biomasa de unas cinco veces con respecto al control. La biomasa de *P. annua* también fue reducida muy significativamente ($P \leq 0{,}01$) por el tratamiento aplicado. En el mes de enero los efectos del abono verde fueron notables sobre el establecimiento de la maleza más tardía *Veronica* sp. ($P \leq 0{,}001$), efectos que se mantuvieron hasta febrero, mientras que el resto de las especies sólo fueron controladas significativamente por la escarda, especialmente *C. glomeratum*.

Otros autores encontraron que los extractos y aceites esenciales de otras especies del género *Mentha* (*M. spicata*, *M. sylvestris* y *M. piperita*) controlaban tanto la germinación como el crecimiento temprano de ciertas malezas dicotiledóneas (Argyropoulos *et al*., 2008; Mahdavikia & Jamal Saharkhiz, 2015). Los compuestos presentes en el aceite esencial de *M. spicata*, potencialmente fitotóxicos, pueden perdurar hasta 35 días en el suelo tras su incorporación como abono verde (Kadoglidou *et al.,* 2014). Sin embargo, cuando comienza la descomposición del residuo, se produce un incremento en la disponibilidad de nutrientes en el suelo, pero también una disminución del efecto fitotóxico debido a la degradación o transformación de los aleloquímicos por los microorganismos edáficos, o a su inmovilización en el suelo (Kruidhof *et al*., 2011), pudiendo explicar así la disminución de la efectividad del tratamiento en los meses finales.

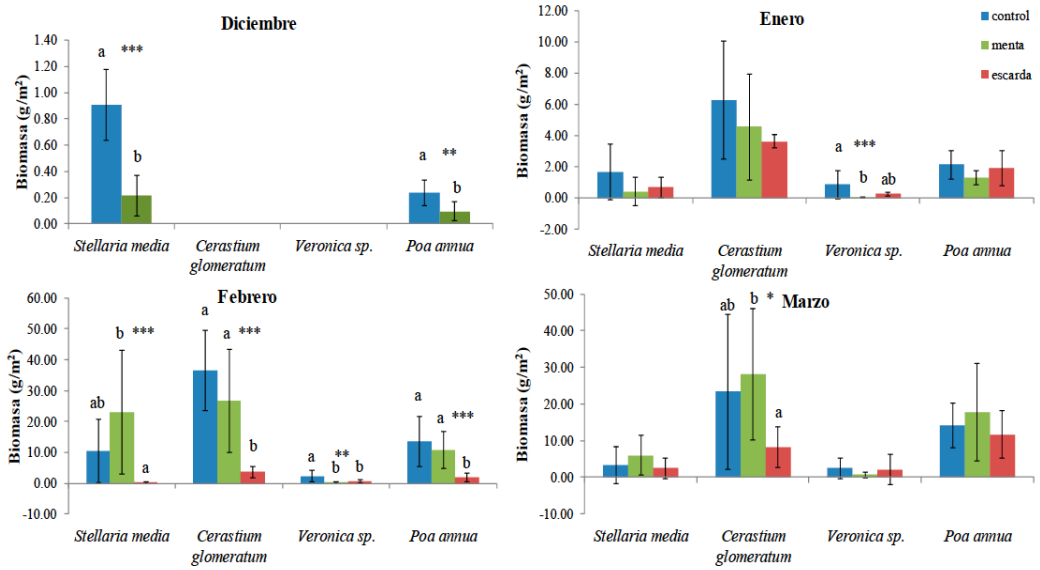


Figura 2. Efectos de la incorporación al suelo de *Mentha suaveolens* como abono verde y de la escarda manual sobre la biomasa de las especies arvenses comunes a todos los tratamientos (*Stellaria media*,

Cerastium glomeratum, *Veronica* sp., y *Poa annua*), frente al control sin tratamiento, a lo largo de cuatro meses. Se representan las medias de 9 réplicas; las barras de error representan la desviación típica. Los asteriscos denotan efectos significativos de los tratamientos: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; sin asterisco, no significativo ($P > 0,05$); ANOVA o Kruskal-Wallis. Para cada mes y especie, valores medios etiquetados con letras distintas son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$); pruebas post-hoc Waller-Duncan o T2 de Tamhane.

En cuanto a la eficiencia fotosintética, en plantas sanas y no estresadas de *Fragaria* sp. los valores asociados a la eficiencia máxima fotosintética oscilan entre 0,78-0,85 (Casierra Posada *et al*., 2011). En el caso de la cebolleta, los valores medios de Fv/Fm de plantas sanas oscilan entre 0,76-0,83 (Renee Abney, 2009). En este trabajo, los valores obtenidos para ambas especies se encuadran dentro de estos rangos, indicando que los cultivos no se encontraban inducidos a estrés por fitotoxicidad tras la incorporación de *M. suaveolens* como abono verde al suelo, y que son fisiológicamente tolerantes a la competencia por los recursos impuesta por la flora arvense.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan evidencias a favor del uso de biomasa alelopática de *M. suaveolens,* incorporada al suelo como abono verde, para el control de malezas en invernaderos de producción hortícola ecológica. Su disponibilidad en el agroecosistema permitiría ahorrar el espacio y tiempo destinado a su cultivo, y por tanto ayudaría a optimizar el rendimiento agrícola.

El efecto inhibitorio inicial del abono verde de menta coincide con el período crítico para el control de malezas de otoño-invierno en la producción hortícola ecológica de invernadero. Por otro lado, dada la efectividad del control comparable al de un evento de escarda manual, el uso de *M. suaveolens* como abono verde podría prevenir la aplicación de al menos la primera escarda, reduciendo así costes en tiempo y mano de obra necesarios en el control de malezas.

5. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el MINECO (CGL2016-78660-R). El primer autor cuenta con un contrato predoctoral de la Xunta de Galicia (ED481A-2018/215).

Referencias

ARGYROPOULOS EI, ELEFTHEROHORINO 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**, 69-78.

CASIERRA POSADA F, PEÑA OLMOS J & ULRICHS C (2011). Crecimiento y eficiencia fotoquímica del fotosistema II en plantas de fresa (*Fragaria* sp.) afectadas por la calidad de la luz: Implicaciones agronómicas. *Rev U. D. C. A Act & Div. Cient*, **14(2)**, 43-53.

CHALKOS D, KADOGLIDOU K, KARAMANOLI K et al. (2010). *Mentha spicata* and *Salvia fruticos*a composts as soil amendments in tomato cultivation. *Plant and Soil*, **332(1),** 495-509.

KADOGLIDOU K, CHALKOS D, KARAMANOLI K, et al. (2014). Aromatic plants as soil amendments: effects of spearmint and sage on soil properties, growth and physiology of tomato seedlings. *Sci Hortic-Amsterdam*, **179**, 25-35.

ER, HARAMOTO ER & BASTIAANS L (2011). Selective weed suppression by cover crop residues: effects of seed mass and timing of species sensitivity. *Weed Resistance* **51**, 177-86.

MAHDAVIKIA F & JAMAL SAHARKHIZ M (2015). Phytotoxic activity of essential oil and water extract of peppermint (*Mentha × piperita* L. CV. Mitcham). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, **50**, 1-8.

MERFIELD CN (2002). Organic Weed Management: A Practical Guide. Lincoln University, Canterbury, United Kingdom.

PARDO-MURAS M, PUIG CG, LÓPEZ-NOGUEIRA A, CAVALEIRO C, & PEDROL N (2018). On the

bioherbicide potential of *Ulex europaeus* and *Cytisus scoparius*: Profiles of volatile organic compounds and their phytotoxic effects. *PloS one*, ***13*(10)**, e0205997.

PUIG CG, ALVAREZ-IGLESIAS L, REIGOSA MJ, PEDROL N (2013). *Eucalyptus globulus* leaves incorporated as green manure for weed control in maize. *Weed Science*, **61** (1), 154-161.

PUIG CG, REVILLA P, BARREAL ME, REIGOSA MJ, & PEDROL N (2019). On the suitability of *Eucalyptus globulus* green manure for field weed control. *Crop Prot*

RENEE ABNEY K (2009). *The effects of ultraviolet radiation on pigment production, growth, and photochemical efficiency in Allium spp.* PhD Thesis, University of Tennessee, Knoxville, EEUU.

"Humble and fierce, inside the same piece": use of applemint (*Mentha suaveolens* Ehrh.) for weed control

Summary: The perennial wild species *Mentha suaveolens* Ehrh. (apple mint) is widely distributed in Mediterranean Europe. Its accessibility in agroecosystems, together with previous evidences of biological activity and richness in potentially allelopathic compounds, led us to consider its use for weed control. It was tested as green manure in an intercrop of strawberry and spring onion under organic production. To do this, applemint aerial biomass at flowering was incorporated into the soil and its effects on the weeds were studied over four months. Concomintanly, the physiological status of the crops was monitored using the MultispeQ portable phenotypic platform. *Mentha suaveolens* significantly reduced weed density and biomass during the first two months after incorporation. The weed species *Stellaria media*, *Veronica* sp. and *Poa annua* were sensitive to the phytotoxicity of *M. suaveolens*. In addition, apple mint green manure did not produce symptoms of physiological stress in the crops. Adding *M. suaveolens* collected in the vicinity of the farm as green manure may be a viable technique for ecological control of weeds in horticultural production greenhouses, in combination with other integrated weed management practices.

Keywords: *Poa annua*, *Stellaria media*, *Veronica* sp., phytotoxicity, green manure, organic agriculture

La caracterización del estado final de las semillas contribuye a evaluar el potencial fitotóxico de los aceites esenciales

TORRES L[1,2], DÍAZ-VIZCAÍNO EA[1,3], RIGUEIRO A[2]

[1] Departamento de Botánica, Escuela Politécnica Superior de Ingeniería, Universidade de Santiago de Compostela, 27002-Lugo
lucia.torres@usc.es, elvira.diaz@usc.es
[2] Departamento de Producción Vegetal y Proyectos de Ingeniería, Escuela Politécnica Superior de Ingeniería, Universidade de Santiago de Compostela, 27002-Lugo
antonio.rigueiro@usc.es
[3]Instituto de Biodiversidad Agraria y Desarrollo Rural, Universidade de Santiago de Compostela, 27002-Lugo

Resumen: Los compuestos alelopáticos de las plantas son productos naturales que pueden representar 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. Su efecto se manifiesta habitualmente en una reducción de la germinación de las semillas y del crecimiento inicial de las plántulas de especies arvenses. En cuanto a las semillas, éstas pueden presentar dormición, lo que condiciona dicha eficacia; se hace necesario cuantificar la proporción de semillas que pueden ser afectadas, incluso cuando el producto resulta muy eficaz. Se han realizado bioensayos de fitotoxicidad para evaluar la potencialidad fitotóxica de aceites esenciales (3 aceites que han demostrado eficacia en nuestros estudios previos sobre la germinación de las semillas de plantas colonizadoras de monumentos históricos) sobre la germinación de *Spergula arvensis* L., mediante un protocolo completo que incluye una fase de inhibición en presencia del aceite y una fase de recuperación (agua destilada); evaluando en cada una la germinación de las semillas, así como su estado final (viable -germinada/no germinada-, no viable). De este modo se ha caracterizado para cada producto su efecto fitotóxico inhibidor, mediante curvas sigmoidales dosis-respuesta (pendiente variable), determinando el valor de IC_{50} (Concentración Inhibitoria Máxima Media); así como la proporción de semillas viables no afectadas, que pueden permanecer en el banco edáfico. Los aceites estudiados mostraron también eficacia sobre la germinación de las semillas de la arvense *S. arvensis*, evidenciando así un mayor espectro de potencialidad bioherbicida.

Palabras clave: Aceites esenciales, arvense, germinación, balance de semillas

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, 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), 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 (Setia *et al*., 2007).

La potencialidad bioherbicida de aceites de plantas aromáticas, se evalúa habitualmente mediante su efecto reductor sobre el nivel de germinación y el crecimiento inicial (longitud y/o biomasa) (Verdeguer *et al*., 2012; Pinheiro *et al*., 2015), así como mediante la elaboración de índices de vigor de plántulas obtenidos a partir de dichos datos (Hussain & Reigosa, 2014), independientemente de su capacidad para desarrollar una nueva planta, características sin duda relacionadas entre sí.

Estudios realizados con tres aceites comerciales de orégano y tomillo, han demostrado potencialidad fitotóxica sobre las semillas de *Parietaria judaica* L., planta colonizadora de monumentos históricos (Torres, 2019), por lo que se plantea la hipótesis de que también presenten actividad fitotóxica sobre la germinación de las semillas de especies que con frecuencia compiten con los cultivos como *Spergula arvensis* L., lo que permitiría incorporar por tanto su utilización en los tratamientos de control de malas hierbas, contribuyendo así a una agricultura sostenible. Además en nuestros estudios hemos caracterizado el estado final de las semillas, lo que podría contribuir a definir la potencialidad fitotóxica de estos aceites esenciales, especialmente la relativa con la formación de bancos de semillas en el suelo.

2. Material y Métodos

Spergula arvensis L., es una hierba anual, muy variable en hábito, pubescencia, tamaño y ornamentación de las semillas; se trata de una arvense presente en campos de cereales y otros cultivos de secano, además de huertos y pastos alterados.

Se han realizado bioensayos de fitotoxicidad (dosis-respuesta), estudiando tres aceites esenciales comerciales de orégano (*Origanum vulgare* L., compuesto principal 70% carvacrol), y dos de tomillo (*Thymus vulgaris* L., 81% linalol, y *Thymus zygis* Loefl. ex L., 49% timol), que han demostrado eficacia, incluso a bajas concentraciones, en bioensayos de fitotoxicidad realizados previamente con la colonizadora *Parietaria judaica* L. 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 22ºC, y 8 horas oscuridad, a 16ºC, humedad relativa 80%), condiciones que, según estudios preliminares, resultaron muy adecuadas para su germinación

(Torres *et al*., 2017). Se ensayaron cuatro concentraciones decrecientes (2, 1, 0.5 y 0.25 µl ml^{-1}), dosificando el aceite y añadiendo agua destilada, y un control; de manera similar a las utilizadas en otros estudios con aceites (Verdeguer *et al*., 2012). En cada tratamiento se han preparado cuatro réplicas de 25 semillas, colocadas en placas Petri de 9 cm de diámetro, sobre doble capa de papel de filtro, humedecido con la correspondiente dosificación.

Cada bioensayo dosis-respuesta se llevó a cabo en dos fases secuenciales temporalmente de cuatro semanas de duración cada una (tiempo suficiente para que se estabilizara la dinámica de la germinación para la especie, como se observó en estudios previos (Torres *et al*., 2017)) en las que se realizó una evaluación diaria de las germinaciones. Fase I: Inhibición, las semillas estuvieron en presencia del producto; Fase II: Recuperación, las semillas viables concluida la fase anterior, estuvieron en presencia de agua. Finalizadas ambas fases, se realizó una evaluación del estado (viabilidad) de las semillas no germinadas.

Los porcentajes finales acumulados de germinación y la proporción de semillas no viables se han comparado mediante pruebas ANOVA, y el test DMS (Mínima Diferencia Significativa) *a posteriori* ($p<0.05$), previa transformación "arco seno $\sqrt{p}$" para garantizar los requisitos de dicho test. El efecto fitotóxico inhibidor de cada aceite se ha caracterizado mediante curvas sigmoidales dosis-respuesta (pendiente variable), determinando el valor de IC_{50} (Concentración Inhibitoria Máxima Media).

3. Resultados y Discusión

La evaluación de la dinámica de la germinación de las semillas de *S. arvensis* en los bioensayos de fitotoxicidad con aceites esenciales (Figura 1), muestra que todos ellos son eficaces, inhibiéndola totalmente en la máxima concentración (2 µl ml^{-1}). El nivel de reducción de la germinación se incrementa con la concentración de los aceites, 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 a 0.50 y 1 µl ml^{-1} respectivamente (o superior), mientras el aceite de *T. vulgaris* lo hace a la concentración más elevada.

Las curvas dosis-respuesta de análisis no lineal, obtenidas para los aceites y los valores de IC_{50}, contribuyen a la evaluación de su eficacia (Fagodia *et al*., 2017; Synowiec *et al*., 2017) (Figura 2); en nuestro caso se observa la siguiente tendencia del efecto fitotóxico de los aceites: *O. vulgare*>*T. zygis*>*T. vulgaris*.

Los aceites 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, nula; siendo muy escasa con *T. vulgaris*, como han encontrado previamente Torres *et al*. (2017).

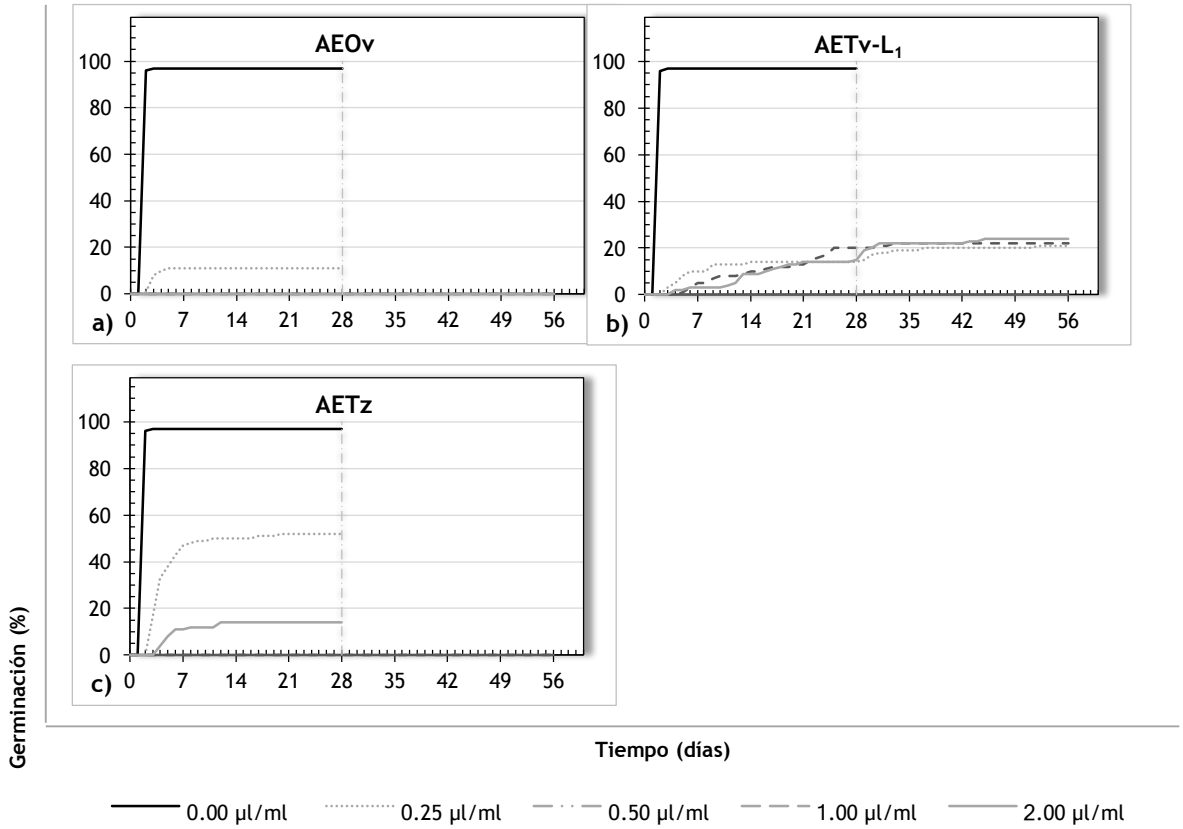


Figura 1 Germinación media acumulada (%) de *Spergula arvensis* para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control (0) y con concentraciones decrecientes de los aceites esenciales (2, 1, 0.5 y 0.25 µl ml^{-1}). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AETv-L_1: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol$_1$ (b), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (c).

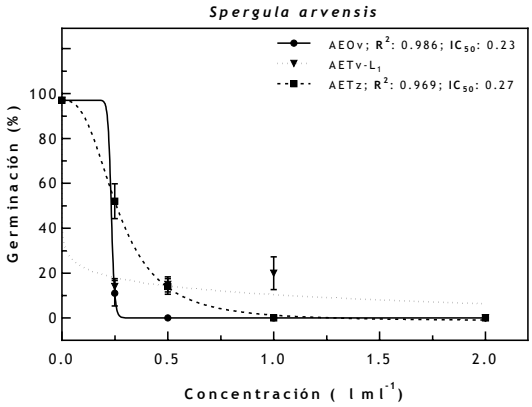


Figura 2 Efecto fitotóxico inhibidor sobre la germinación (%) de las semillas de *Spergula arvensis*, de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* (AEOv), *Thymus vulgaris* linalol$_1$ (AETv-L_1) y *Thymus zygis* (AETz), en concentraciones crecientes, evaluado transcurridas cuatro semanas. Los datos fueron analizados mediante una curva sigmoidal dosis-respuesta (pendiente variable), representando el error estándar de la media. R^2: coeficiente de determinación, IC_{50}: Concentración Inhibitoria Máxima Media.

En cuanto a la evaluación del estado final de las semillas de *S. arvensis* (Figura 3), al concluir la Fase I se ha encontrado una proporción de semillas aparentemente viables, especialmente en las dos concentraciones más elevadas; no obstante, dichas semillas, al finalizar la Fase II, resultaron no viables, lo que posiblemente refleja un daño fisiológico interno permanente (Setia *et al*., 2007), lo que complementa la evaluación de la potencialidad fitotóxica de estos aceites, ampliando su rango de actividad.

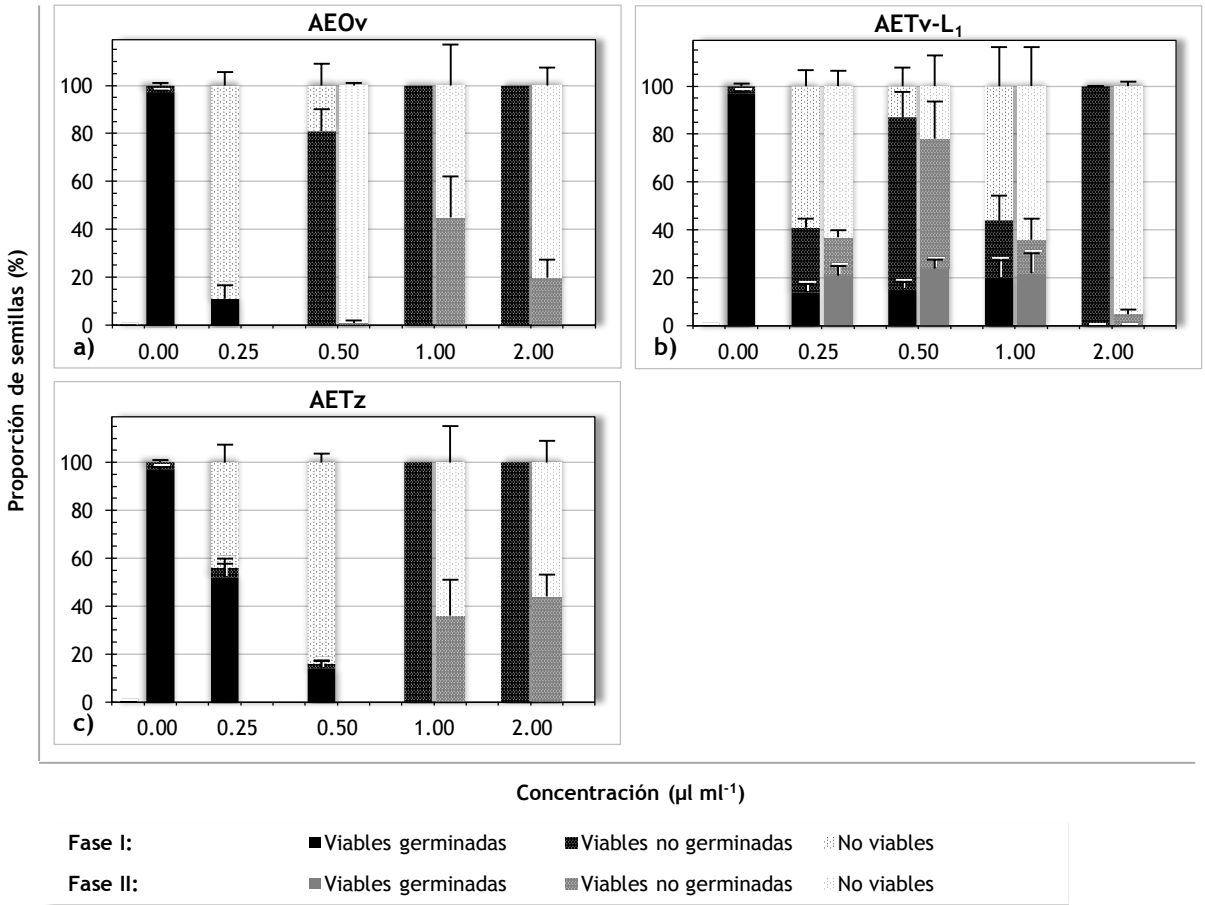


Figura 3 Germinación media acumulada (%) de *Spergula arvensis* para la Fase I-Inhibición (primera columna del par, primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (segunda columna del par, siguientes cuatro semanas, sin dato cuando no quedaron semillas viables al final de la Fase I), en el control (0) y con concentraciones decrecientes de los aceites esenciales (2, 1, 0.5 y 0.25 µl ml^{-1}). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare* (a), AETv-L_1: aceite esencial de *Thymus vulgaris* linalol$_1$ (b), AETz: aceite esencial de *Thymus zygis* (c).

Los aceites estudiados que han mostrado previamente su eficacia en *P. judaica* (Torres, 2019), también la presentan sobre *S. arvensis*, evidenciando así un mayor espectro de potencialidad bioherbicida. En todos ellos también existe una relación entre concentración y efecto fitotóxico (nivel de reducción), que permite confirmar el orden de (mayor) eficacia propuesto por dicha autora: *O. vulgare*, *T. zygis*, *T. vulgaris*.

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 y estado final de las semillas; que se ha verificado mediante el protocolo establecido de evaluación *in situ*.

Referencias

DAYAN FE, CANTRELL CL, DUKE SO (2009) Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **17(12)**, 4022-4034.

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.

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.

PINHEIRO PF, COSTA AV, ALVES TD, GAITER IN, PINHEIRO CA, PEREIRA AF *et al*. (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.

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.

SYNOWIEC A, KALEMBA D, DROZDEK E, BOCIANOWSKI J (2017) Phytotoxic potential of essential oils from temperature climate plants against the germination of selected weeds and crops. *Journal of Pest Science* **90(1)**, 407–419.

TORRES L (2019) Flora vascular de la muralla de Lugo: control del crecimiento y germinación de la dominante *Parietaria judaica* L. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, España.

TORRES L, DÍAZ-VIZCAÍNO EA, RIGUEIRO A (2017) Evaluación del potencial bioherbicida de orégano, romero y tomillo sobre la germinación de *Rumex obtusifolius* L. y *Spergula arvensis* L. En: Actas 2017 *XVI Congreso de la Sociedad Española de Malherbología* (ed ROYUELA M & ZABALZA A) (25-27 octubre, Pamplona, España).449-454. Rodona Industria Gráfica, Pamplona, España.

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.

The characterization of the final state of the seeds contributes to evaluate the phytotoxic potential of essential oils

Summary: The allelopathic compounds of plants are natural products that may represent an alternative to conventional herbicides and agrochemicals, contributing to the sustainability of agricultural production systems. Their effect is usually manifested in a reduction of seed germination and initial growth of seedlings of weed. Seeds may have dormancy that determines the efficacy of allelopathic compounds; it is necessary to quantify the proportion of seeds that can be affected, even when the product is very effective. Phytotoxicity bioassays have been carried out to evaluate the phytotoxic potential of essential oils (3 oils that have proven effective in our previous studies) on the germination of *Spergula arvensis* L. A complete protocol has been applied that included an inhibition phase in essential oil and a recovery phase; in each phase the germination of the seeds and their final state (viable -germinated/no germinated-, no viable) were evaluated. The phytotoxic inhibitory effect has been characterized, by means of dose-response sigmoidal curves (variable slope), determining the IC_{50} value (half maximal inhibitory concentration); and the proportion of viable seeds, which can remain in the edaphic bank. The essential oils studied also showed efficacy on the germination of the seeds of the weed *S. arvensis*, which evidences a greater spectrum of bioherbicidal potential.

Keywords: Essential oils, weed, germination, seeds balance

Mayor eficacia de aceites esenciales sobre la germinación de semillas de arvenses que de cultivadas

TORRES L[1,2], RIGUEIRO A[2], DÍAZ-VIZCAÍNO EA[1,3]

[1] Departamento de Botánica, Escuela Politécnica Superior de Ingeniería, Universidade de Santiago de Compostela, 27002-Lugo
lucia.torres@usc.es, elvira.diaz@usc.es
[2] Departamento de Producción Vegetal y Proyectos de Ingeniería, Escuela Politécnica Superior de Ingeniería, Universidade de Santiago de Compostela, 27002-Lugo
antonio.rigueiro@usc.es
[3]Instituto de Biodiversidad Agraria y Desarrollo Rural, Universidade de Santiago de Compostela, 27002-Lugo

Resumen: Los compuestos alelopáticos de las plantas son productos naturales que pueden representar 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. La evaluación de su eficacia se realiza habitualmente sobre la germinación y, en menor medida, sobre el crecimiento inicial de especies arvenses, siendo escasos los estudios en los que se evalúa sobre plantas cultivadas, lo que resulta de interés en el establecimiento de cultivos de siembra. Se han realizado bioensayos de fitotoxicidad con tres aceites esenciales (uno de orégano y dos de tomillo), que han demostrado eficacia en nuestros estudios previos, sobre la germinación y el crecimiento inicial de plántulas de especies arvenses (*Conyza canadensis* (L.) Cronquist.) y cultivadas (*Lactuca sativa* L. y *Brassica campestris* L.), mediante un protocolo completo que incluye una fase de inhibición en presencia del aceite (1, 0.5 y 0.25 µl ml^{-1}) y una fase de recuperación (agua destilada). Los resultados muestran una menor sensibilidad al efecto fitotóxico de las especies cultivadas, que presentan comparativamente mayor nivel de germinación y mayor proporción de plántulas viables, lo que confirma que los aceites esenciales potencialmente eficaces podrían ser utilizados en cultivos de siembra.

Palabras clave: Aceites esenciales, arvenses, cultivos, germinación, crecimiento inicial

1. Introducción

La evaluación de la eficacia de aceites esenciales se realiza habitualmente cuantificando su efecto inhibidor sobre la germinación de las semillas, y en menor medida sobre el crecimiento inicial (longitud y/o biomasa) de las plántulas de especies arvenses (Verdeguer *et al*., 2012), que también se modifica, ya que afectan fisiológicamente al proceso fotosintético, a la actividad respiratoria de las plántulas, al metabolismo

energético y otros procesos bioquímicos comprometiendo su desarrollo (Setia *et al*., 2007).

Más escasos son los estudios en los que se evalúa su eficacia sobre plantas cultivadas (Grosso *et al*., 2010; Gitsopoulos *et al.*, 2013). En nuestro caso, en el estudio de la eficacia inhibitoria de la germinación de las semillas y reductora del crecimiento inicial de plántulas de *Rumex obtusifolius* L. y *Spergula arvensis* L., y de una quincena de aceites industriales de plantas aromáticas, han destacado los que presentan una elevada proporción de carvacrol, linalol y timol (*Origanum vulgare* L., *Thymus vulgaris* L. y *Thymus zygis* Loefl. ex L.) (Torres, 2019); por lo que nos planteamos que dichos aceites podrían resultar menos eficaces sobre las semillas y plántulas de plantas cultivadas, en cuyo caso presentarían elevada potencialidad para ser utilizados en cultivos de siembra.

2. Material y Métodos

Se han realizado bioensayos de fitotoxicidad (dosis-respuesta), estudiando tres aceites esenciales comerciales de orégano (*Origanum vulgare* L.) y tomillo (*Thymus vulgaris* L. y *Thymus zygis* Loefl. ex L.), que han demostrado eficacia, incluso a bajas concentraciones, con flora colonizadora de monumentos históricos (*Parietaria judaica* L.) y también sobre la germinación de especies *Rumex obtusifolius* L. y *Spergula arvensis* L., seleccionando en este caso la arvense *Conyza canadensis* (L.) Cronquist. (peso medio de 100 semillas: 3.47±0.06 mg) y las cultivadas *Lactuca sativa* L. (peso medio de 100 semillas: 100.92±1.52 mg) y *Brassica campestris* L. (peso medio de 100 semillas: 339.40±8.57 mg).

Para evaluar su efecto sobre la germinación de las semillas, se ha diseñado un protocolo de bioensayo dosis-respuesta, en condiciones controladas. Se ensayaron tres concentraciones decrecientes (1, 0.5 y 0.25 µl ml^{-1}) dosificando el aceite y añadiendo agua destilada, de manera similar a las utilizadas en otros estudios con aceites (Verdeguer *et al*., 2012), y un control. En cada tratamiento se han preparado cuatro réplicas de 25 semillas, colocadas en placas Petri de 9 cm de diámetro, sobre doble capa de papel de filtro, humedecido con la correspondiente dosificación, realizando un recuento diario de la germinación. Cada bioensayo dosis-respuesta se ha realizado en dos fases secuenciales temporalmente de cuatro semanas de duración cada una. Fase I: Inhibición, las semillas estuvieron en presencia del producto; Fase II-Recuperación, en presencia de agua, procedimiento que ha sido aplicado en estudios similares a éste en *Rumex obtusifolius* L. y *Spergula arvensis* L. (Torres *et al*., 2017).

Además del estudio de la germinación, se ha evaluado paralelamente el desarrollo inicial de las plántulas; para ello, con periodicidad diaria, se han transferido las semillas germinadas a placas de tratamiento simultáneo. Se ha realizado una tipificación de las plántulas, diferenciando las viables de las que no lo fueron a los 5 días de desarrollo: Plántula Tipo I- normal, bien desarrollada (presencia de epicotilo/hipocotilo) y verde, distinguiendo su subtipo morfológico clorótico, no normal (Tipo I_b); Plántula Tipo II-no normal, que emite el hipocotilo/epicotilo pero no manifiesta desarrollo radicular, diferenciando también aquélla con sintomatología clorótica (Tipo II_b); Plántula Tipo III-

no normal, en la que no se evidencia desarrollo, con ausencia por lo tanto de epicotilo e hipocotilo (Torres, 2019).

Los porcentajes finales acumulados de germinación se han comparado mediante pruebas ANOVA y el test DMS *a posteriori* ($p<0.05$), previa transformación "arco seno $\sqrt{p}$" para garantizar los requisitos de dicho test.

3. Resultados y Discusión

Los aceites esenciales de *O. vulgare* y *T. zygis* inhibieron totalmente la germinación de las semillas de *C. canadensis* en las tres concentraciones, mientras que el de *T. vulgaris* lo hizo únicamente en la más elevada, reduciéndola significativamente hasta un nivel bajo y medio en las dos siguientes (Figura 1a,b,c). Los dos primeros aceites también redujeron significativamente la germinación de las semillas de *L. sativa* en la mayor concentración (1 µl ml^{-1}), hasta un nivel intermedio en la segunda (0.5 µl ml-1) y escaso en la más baja (0.25 µl ml^{-1}) (Figura 1d,e,f). Su efecto reductor sobre la germinación de las semillas de *B. campestris* fue bajo en la mayor concentración e inapreciable en las otras dos. Por su parte, el aceite de *T. vulgaris* no afectó significativamente a la germinación de las semillas de las dos cultivadas en las dos concentraciones menores (Figura 1g,h,i). Estos resultados no se han modificado tras el alivio de la presencia de los aceites (fase de recuperación) en ninguna de las especies.

La eficacia también se apreció al evaluar el crecimiento inicial (viabilidad) de las plántulas. En el caso de *C. canadensis* con el aceite de *T. vulgaris* la proporción de plántulas viables resultó muy baja (6%) en la concentración de 0.5 µl ml^{-1} y media (46%) en la de 0.25 µl ml^{-1}; entre las no viables la ausencia de crecimiento radicular (plántulas tipo II) es el efecto morfológico más evidente (Figura 2a,b,c). En *L. sativa*, con el aceite de *O. vulgare* y el de *T. zygis*, en la concentración de 0.25 µl ml^{-1}, únicamente una proporción baja de plántulas resultaron viables; mientras que en el de *T. vulgaris* fue más elevada (76%), próxima al control, reduciéndose hasta niveles intermedios (57%) y bajos (20%), al incrementarla (Figura 2d,e,f). Entre las no viables, la ausencia de crecimiento radicular (plántulas tipo II), así como de crecimiento aéreo y radicular (plántulas tipo III), es el efecto morfológico más evidente. Esta tendencia resultó más apreciable aún en *B. campestris*, que siempre presentó una mayor proporción de plántulas viables (Figura 2g,h,i).

La evaluación de la dinámica de la germinación de las semillas de la arvense y las cultivadas estudiadas, muestra una eficacia diferencial y permanente, mayor en la primera que en las otras dos, como han encontrado Grosso *et al*. (2010) y Gitsopoulos *et al*. (2013), lo que también se aprecia en una mayor viabilidad de las plántulas de especies cultivadas, que de este modo muestran una mayor tolerancia a estos bioherbicidas.

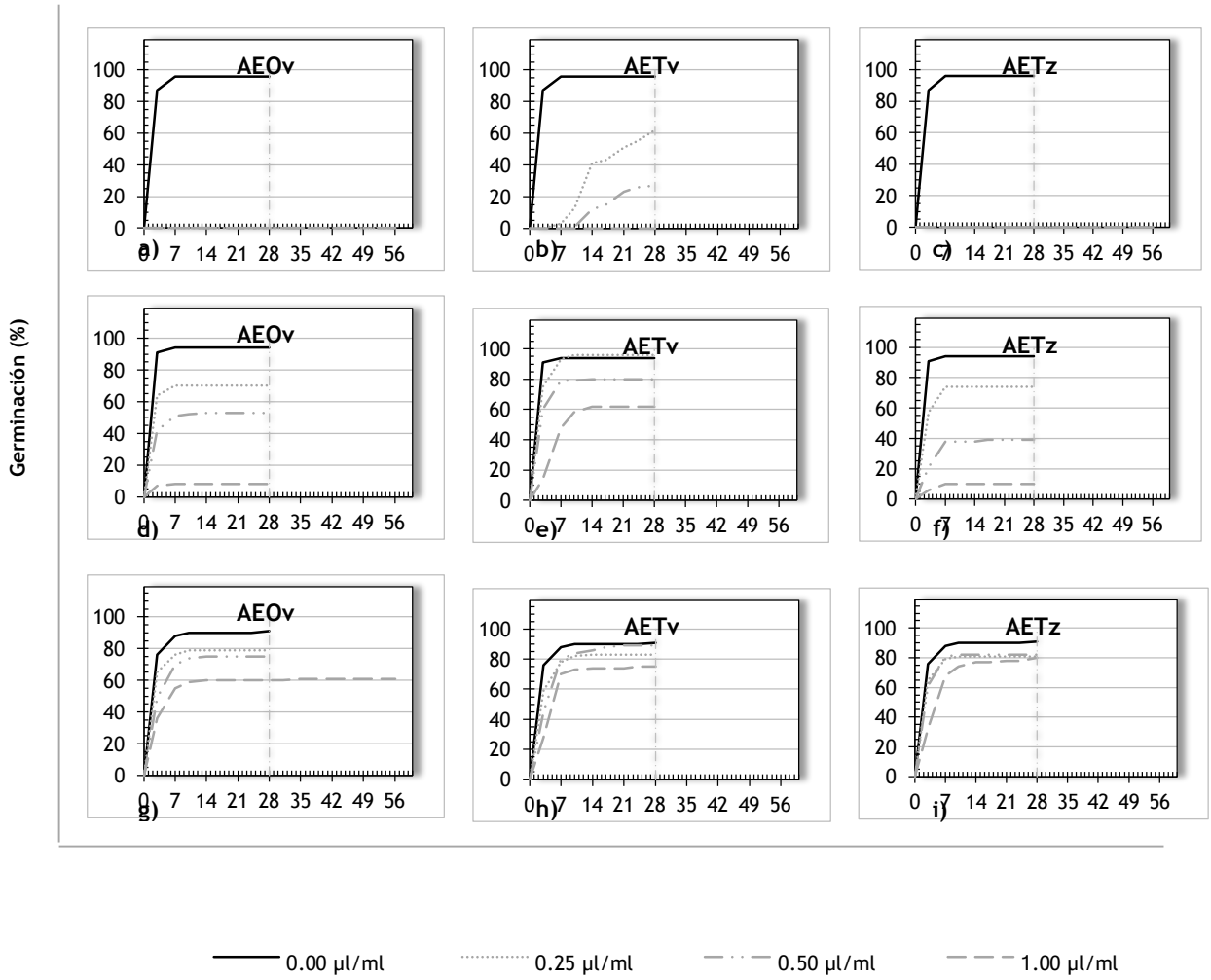


Figura 1 Germinación media acumulada (%) de *Conyza canadensis* (a, b, c), *Lactuca sativa* (d, e, f) *y Brassica campestris* (g, h, i), para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas) y la Fase II-Recuperación (si procede, siguientes cuatro semanas), en el control (0) y con concentraciones decrecientes de los aceites esenciales (1,0.5 y 0.25 µl ml^{-1}). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare*, AETv: aceite esencial de *Thymus vulgaris*, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis*.

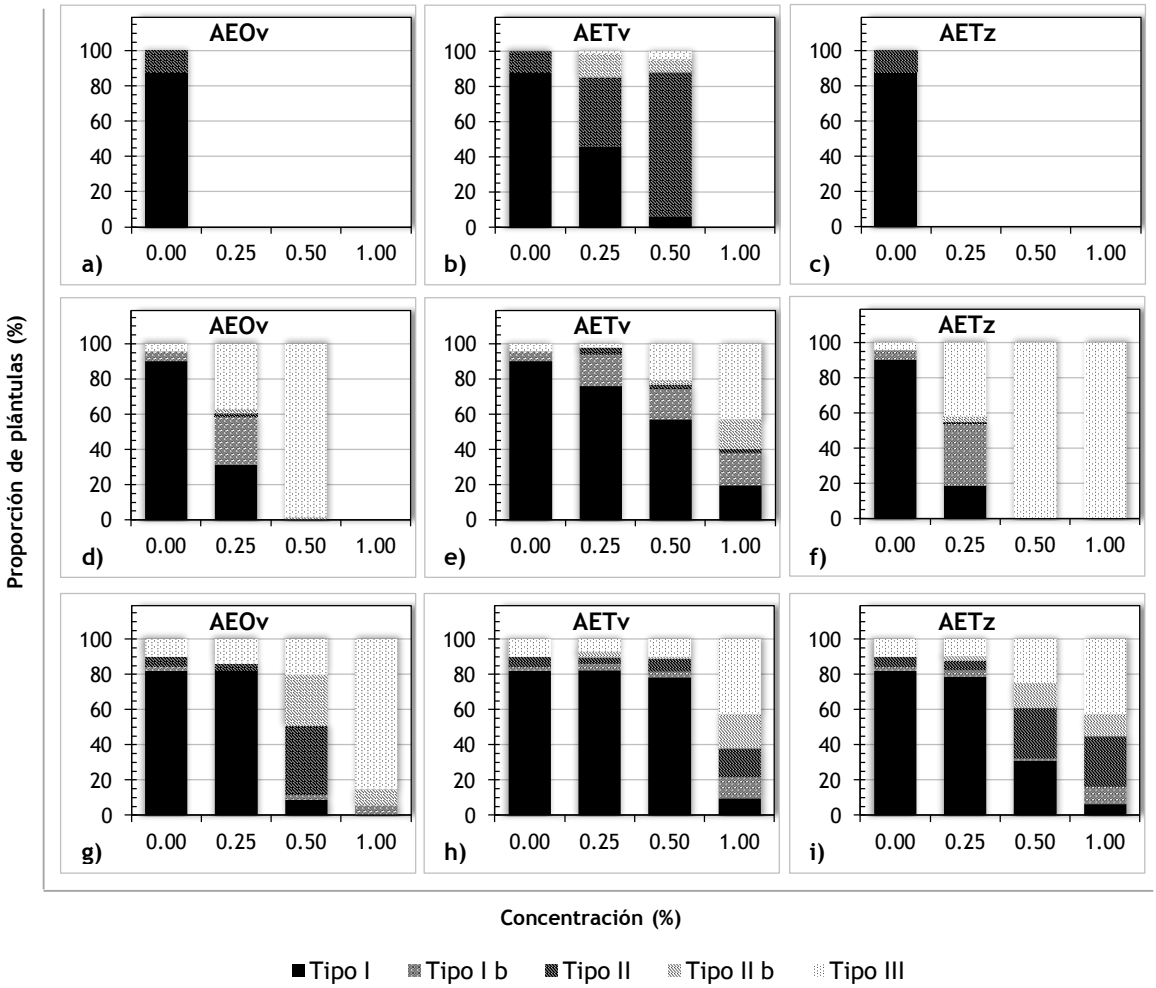


Figura 2 Distribución de los tipos de plántulas (%) de *Conyza canadensis* (a, b, c), *Lactuca sativa* (d, e, f) *y Brassica campestris* (g, h, i), a los 5 días para la Fase I-Inhibición (primeras cuatro semanas), en el control (0) y con concentraciones crecientes de los aceites esenciales (0.25, 0.5, 1 µl ml^{-1}). AEOv: aceite esencial de *Origanum vulgare*, AETv: aceite esencial de *Thymus vulgaris*, AETz: aceite esencial de *Thymus zygis*.

Tanto en relación con la germinación, como con la recuperación y viabilidad de las plántulas, la eficacia guarda relación con la concentración, resultando más adecuadas las más bajas, en las que se detecta elevada eficacia con arvenses y baja o muy baja con cultivadas. Además, entre las cultivadas se aprecian diferencias posiblemente relacionadas con su tamaño desigual, como consideran Synowiec *et al*. (2017); por lo que se hacen necesarios estudios para clarificar la importancia de esta característica de las semillas.

4. Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado dentro del proyecto "CONTECAD-Control ecológico de plantas adventicias en cultivos agrícolas en Galicia" (FEADER, 2018/012B), financiado por el Fondo Europeo Agrícola de Desenvolvemento Rural, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y Xunta de Galicia.

Referencias

GITSOPOULOS TK, CHATZOPOULOU P, GEORGOULAS I (2013) Effects of Essential Oils of *Lavandula x hybryda* Rev, *Foeniculum vulgare* Milland *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.

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.

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.

SYNOWIEC A, KALEMBA D, DROZDEK E, BOCIANOWSKI J (2017) Phytotoxic potential of essential oils from temperature climate plants against the germination of selected weeds and crops. *Journal of Pest Science* **90(1)**, 407–419.

TORRES L (2019) Flora vascular de la muralla de Lugo: control del crecimiento y germinación de la dominante *Parietaria judaica* L. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, España.

TORRES L, DÍAZ-VIZCAÍNO EA, RIGUEIRO A (2017) Evaluación del potencial bioherbicida de orégano, romero y tomillo sobre la germinación de *Rumex obtusifolius* L. y *Spergula arvensis* L. En: Actas 2017 *XVI Congreso de la Sociedad Española de Malherbología* (ed ROYUELA M & ZABALZA A) (25-27 octubre, Pamplona, España).449-454. Rodona Industria Gráfica, Pamplona, España.

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.

Greater effectiveness of essential oils on germination of weed seeds than cultivated species

Summary: The allelopathic compounds of plants are natural products that may represent an alternative to conventional herbicides and agrochemicals (whose negative effects on weed resistance, soil degradation and environmental degradation, as well as on living beings, are increasingly evident), contributing to the sustainability of agricultural production systems. The evaluation of their effectiveness is usually carried out on germination and, to a lesser extent, on the initial growth of weeds. There are few studies assessing cultivated plants, which is interesting in the establishment of planting crops. Phytotoxicity bioassays have been carried out with three essential oils (oregano and thyme), which have proven effective in our previous studies, on the germination and initial growth of seedlings of weeds (*Conyza canadensis* (L.) Cronquist.) and cultivated species (*Lactuca sativa* L. and *Brassica campestris* L.). A complete protocol has been applied that includes an inhibition phase in essential oil and a recovery phase. Cultivated species showed lower sensitivity to the phytotoxic effect, on germination and seedlings viability. It is confirmed that potentially effective essential oils could be used in planting crops.

Keywords: Essential oils, weeds, crops, germination, initial growth

UTILIZACIÓN DEL JARDÍN ARVENSE PARA EL ESTUDIO DE LAS EMERGENCIAS Y SUS APLICACIONES PARA LA AGRICULTURA

AUTORES: REBOLLO-VALERA M, GOMEZ REGIFE Y, SOUSA-ORTEGA C, URBANO JM

Departamento de Ciencias Agroforestales, ETSIA, Universidad de Sevilla (carretera Sevilla-Utrera, km 1), ESPAÑA.
mariarv16@hotmail.com

Resumen: La Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica de la Universidad de Sevilla dispone de un Jardín Arvense patrocinado por la Cátedra Adama, con 200 macetas en la que se estudiaron unas 150 especies de malas hierbas pertenecientes a 50 familias.

El objetivo de este trabajo es mejorar el conocimiento de las emergencias de las especies incluidas en el jardín arvense, de modo que se pueda utilizar esta información para un manejo más racional de las malas hierbas.

Sobre el mes de octubre (antes de las primeras lluvias) se realizaron las respectivas siembras de cada una de las especies de estudio. Posteriormente, se tomaron mediciones semanales de las emergencias en base a conteos destructivos. A su vez se tomaron datos de la pluviometría y la temperatura con ayuda de un pluviómetro y un datalogger instalado en el jardín del ensayo. Teniendo en cuenta el número de macetas por el número de semana por número de años, se obtiene una base de datos bastante amplia y difícil de gestionar. Esta base de datos se analizó con el programa R de modo que se pudieron obtener datos de percentiles de emergencias y distribución de las mismas.

Los primeros resultados permiten deducir que será posible conseguir información interesante sobre la vulnerabilidad de las malas hierbas a métodos químicos y no químicos y adicionalmente se podrá mejorar el conocimiento sobre las dormancias exógenas y endógenas y sobre la influencia de las condiciones de almacenamiento de las semillas.

Esta información permite conocer la vulnerabilidad y diseñar las mejores estrategias para su control, como por ejemplo la "falsa siembra". También la recopilación de estos datos de emergencias, incrementará la eficacia de las herramientas de control químicas y no químicas, al optimizar el momento de control.

Palabras clave: Datalogger, vulnerabilidades, control químico, control no químico.

1. Introducción

Un jardín arvense es un jardín botánico en el que se incluyen especies catalogadas como malas hierbas por diferentes motivos.

La cátedra Adama es una cátedra Universidad-Empresa creada en el año 2015 y uno de sus principales objetivos es mantener y fomentar el jardín arvense de la ETSIA de la Universidad de Sevilla, que ha demostrado ser una excelente herramienta docente, divulgativa y de investigación. Adicionalmente la cátedra Adama fomenta el establecimiento de otros jardines arvenses en distintos puntos de España.

En el jardín de la ETSIA se toman semanalmente datos de emergencias de cada maceta. Si se tiene en cuenta que el jardín cuenta con más de 230 macetas o contenedores, que incluye unas 144 especies vegetales distintas, se hace evidente el potencial del jardín arvense como suministrador de información, pero también se hace patente la dificultad de la gestión de tal cantidad de datos.

El periodo inmediatamente posterior a la emergencia es un momento crítico para la supervivencia de las infestaciones arvenses de semilla pequeña (que son mayoría), por ello el conocimiento de los patrones de emergencia tiene una importancia creciente, ya que es una alternativa para optimizar los métodos de control (químicos y no químicos). El desconocimiento de los patrones de emergencias justifica el retraso en la aplicación de las medidas de control, lo que supone disminución de eficacia, necesidad de dosis elevadas, fallos de control y pérdidas de rendimiento por competencia no evitada (Grundy 2003).

El objetivo de este trabajo es representar de forma gráfica y práctica, la evolución de la emergencia de las especies del Jardín Arvense de la ETSIA de la Universidad de Sevilla

2. Material y Métodos

El material vegetal utilizado en el ensayo proviene del banco de semillas de la ETSIA. Las semillas de este banco fueron recogidas de plantas previamente identificadas durante años anteriores. Una vez recolectadas, las semillas se limpiaron y se almacenaron en condiciones de baja humedad (mediante gel de sílice) y temperatura (4ºC).

En octubre de 2016, las macetas (30 cm de alto y 35,5 cm de diámetro) se rellenaron con una mezcla de arena lavada y sustrato hortícola con una relación 1:1 en volumen. En años posteriores, se mantuvo el mismo sustrato inicial.

Las macetas fueron sembradas anualmente realizando "rotaciones arvenses", es decir para decidir la especie a sembrar en cada maceta se tuvo en cuenta lo sembrado en años anteriores de modo que se intentó cambiar la familia botánica cada año (excepto en las especies perennes). Esta rotación arvense se realizó con el objetivo de facilitar la identificación de las plántulas. Los conteos de las emergencias fueron destructivos,

dejando hasta 3 individuos por macetas, para estudiar la evolución fenológica

En este trabajo se presentan los resultados de a) las emergencias medidas en 2016/17 (sembradas en 2016/17); b) emergencias medidas en 2017/18 (sembradas en 2016/17 ó 2017/18); c) emergencias medidas en 2018/19 (sembradas en 2016/17, 2017/18 ó 2018/19).

Para conseguir unos resultados que fuesen fácilmente interpretables se utilizó el programa estadístico R studio (R Core Team 2017), donde se aplicó la función geom_violin del paquete tidyverse (Wickham 2017), que permite la realización de gráficos que son una mezcla entre histogramas y gráfico de cajas y bigotes por lo que permiten identificar los percentiles más relevantes, así como su evolución, lo cual facilita su entendimiento y uso práctico.

3. Resultados y Discusión

Se ha generado una amplia base de datos con datos de emergencia de 144 especies durante tres campañas agrícolas. Estos datos pueden ayudar a representar el patrón de emergencias de las mala hierbas y, por tanto, ser de utilidad en la toma de decisiones para un manejo integrado del cultivo.

El comando que ha resultado más interesante de todos los estudiados ha sido:

ggplot(BaseDatos, aes(factor(EPPO),DDS)) + guides(fill = FALSE, color = FALSE, linetype = FALSE, shape = FALSE) + geom_violin(aes(weight=value2), draw_quantiles = c(0.1, 0.5, 0.9), trim = T, scale="width", alpha=0.5) + geom_jitter(data = BaseDatos, aes(factor(EPPO), DDS, color = YR3, size= value2, alpha=1), height = 0, width = 0.1, alpha=0.5) + theme_bw() + scale_y_continuous(limits=c(0, 300)) + coord_flip() + facet_grid(LOC2~YR2)

Donde:

- BaseDatos: número de emergencias.
- EPPO: código de cada especie.
- DDS: días desde la siembra.

En la Figura 1, se presenta la emergencia, durante cada año agrícola, de *Galium tricornutum,* como un ejemplo de los gráficos obtenidos a partir esta base de datos. El gráfico permite representar el valor del número de emergencias contabilizadas (mediante el grosor del punto) y separar según su siembra mediante colores (azul para emergencias de semillas sembradas en el mismo año, verde para las sembradas el año anterior y rojo para las sembradas dos campañas antes). Además, se pueden representar fácilmente

los percentiles mediante líneas verticales, que en este caso se han establecido en 10%, 50% y 90%. En este caso, la evolución de las emergencias se representa en función de los días transcurridos desde la siembra (o primera lluvia relevante), pero se puede representar en función de otros parámetros como calendario, integral térmica, etc.

Estos gráficos pueden tener una aplicación práctica inmediata para los técnicos de campo. Por ejemplo, en el año 2017, se alcanzó el percentil 10 a los 30 días, el percentil 50 a los 70 y el percentil 90 a los 120 días desde la siembra.

Por otro lado, también se puede comparar el patrón de las emergencias de distintas especies de un mismo género. En la Figura 2, se puede observar la emergencia de 4 especies del género *Plantago*. Si se comparan los perfiles de emergencias de dichas estas especies, se puede apreciar que el perfil de emergencia es relativamente similar entre *P. coronopus* (PLACO),

P. lanceolata (PLALA) y *P. major* (PLAMA). Sin embargo, la especie *Plantago afra* (PLAAF) presenta un perfil de emergencia muy diferente que las otras 3 especies.

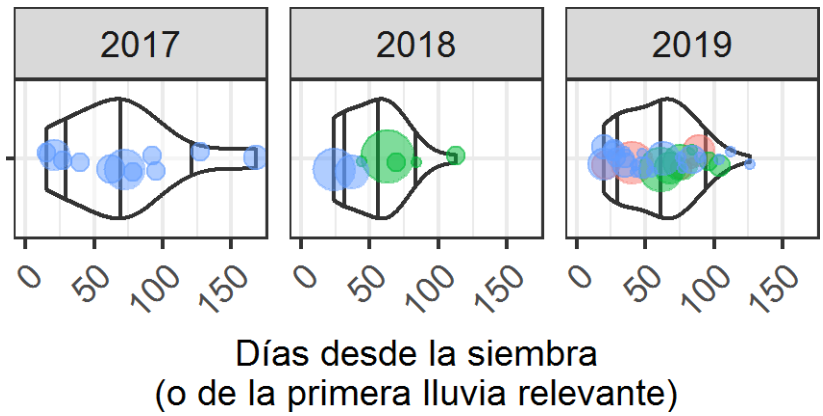


Figura 1: Emergencia de *Galium tricornutum* en función de los días desde la siembra para los tres años del ensayo. Cada violín está dividido por tres líneas verticales que corresponden a los percentiles 10, 50 y 90. Los diferentes tamaños de cada punto representa el número de emergencias contadas en cada conteo. El color nos indica el año de origen de las semillas emergidas: azul para semillas sembradas en el mismo año, verde para las sembradas el año anterior y rojo para las sembradas dos campañas antes.

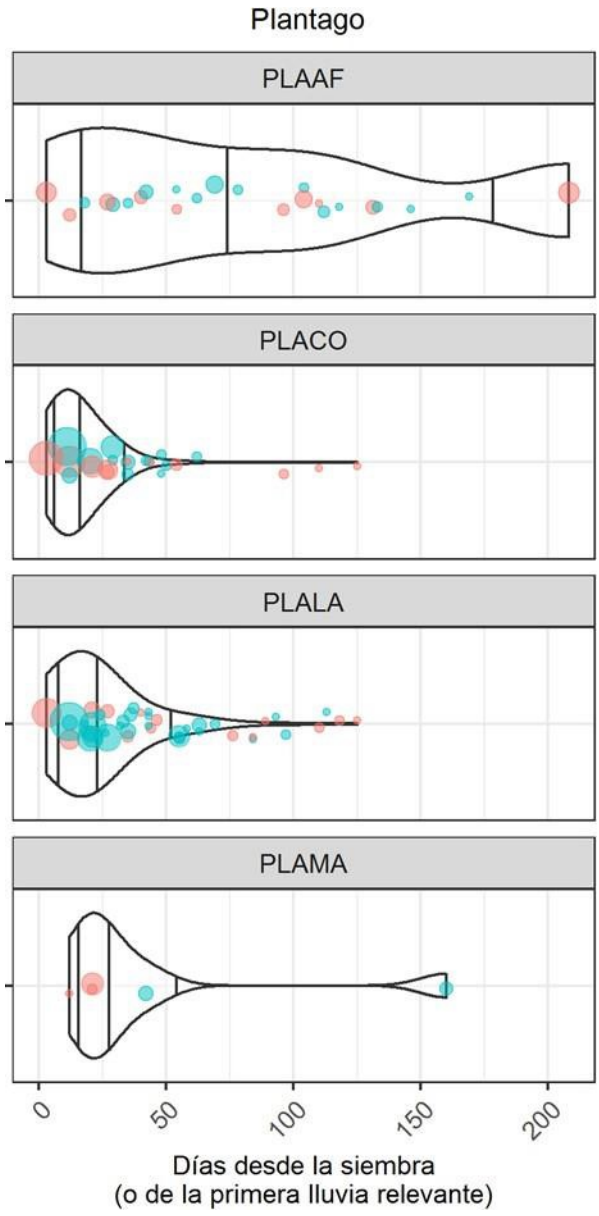


Figura 2*:* Perfil de emergencia de las distintas especies del género *Plantago*. Cada violín está dividido por tres líneas verticales que corresponden a los percentiles 10, 50 y 90 de emergencia. Los diferentes tamaños de cada punto representan el número de emergencias contadas en cada conteo. El color nos indica el año de origen de las semillas emergidas: azul para semillas sembradas en el mismo año, verde para las sembradas el año anterior y rojo para las sembradas dos campañas antes.

4. Agradecimientos

Los autores quieren hacer constar su agradecimiento a la Cátedra Adama, que ha financiado la beca que ha permitido realizar este trabajo.

Referencias

R Core Team (2017) R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria.: *R Foundation for Statistical Computing*

Cátedra Adama (2019) . https://adamacatedra.es/. Accessed June 11, 2019

Grundy AC (2003) Predicting weed emergence: A review of approaches and future challenges. *Weed Research* **43**:1–11

Wickham H (2017) tidyverse: Easily Install and Load the "Tidyverse." *Cran-R*:1–5

WEED GARDEN AS TOOL FOR THE STUDY OF EMERGENCES PATTERNS AND ITS POSSIBLE AGRICULTURE APPLICATIONS

Summary: The aim of this work is to improve the knowledge of patterns of weed emergence in order provide farmers with more accurate information for integrative weed management.

The E.T.S.I.A. of Universidad de Sevilla has a weed garden sponsored by Catedra Adama.

The weed garden contains 150 weed species, representing 50 botanical families in 200 pots.

The weeds were sown in October, before the first substantial rain, for three years beginning in 2016. The seedling were scored weekly and were removed after emergence to avoid double counting. Over this period, a datalogger measured soil temperature and moisture. The data was analyzed using R to obtain the percentiles and weed emergence distribution for each of the species.

The first results let us deduce that it was possible to get interesting information about the weed vulnerabilities to chemical and non chemical controls. From this, we are able to advance our knowledge about endogenous or exogenous seed dormancy and the effects of the environmental conditions over the weed emergence profile. Using more accurate timing of emergence, control practices, such as a 'false seedbed', can be more effectively implemented.

Keywords: Datalogger, vulnerabilities, chemical control, non-chemical control

Evaluación de métodos alternativos para el control de vegetación espontánea en márgenes de carreteras

MANSANET PEREA C[1], VARELA CASAL, N[2], ROMERO FRANCO R[3], FERNANDEZ LABRADA M[3], ILLERA VIVES M[3], LÓPEZ MOSQUERA ME[3]

[1]Área de Sanidade Vexetal, Xefatura provincial de Ourense, Consellería do Medio Rural, r/ Florentino Cuevillas, 4-6, Baixo, 32003, Ourense, ESPAÑA.
[2]Axencia Galega de Infraestruturas, Servizo Provincial de Ourense, r/ Sáenz Díez, 1. 32071, Ourense, ESPAÑA.
[3]Instituto de Biodiversidade Agraria e Desenvolvemento Rural, Campus Universitario s/n, 27002 Lugo, ESPAÑA.
miguelfernandez.labrada@usc.es, marta.illera@usc.es; melvira.lopez@usc.es

Resumen: Galicia es la segunda comunidad autónoma del estado con más kilómetros de carreteras (17.000), esto combinado con las condiciones climáticas (elevada pluviometría y temperaturas suaves) incrementa la importancia del control de la vegetación espontánea en los márgenes de vías de comunicación (siendo las familias mayoritarias en la zona de estudio compuestas y gramíneas). El objetivo de este trabajo fue comparar la aplicación de glifosato 36% (8 l·ha^{-1}) tras un desbroce, respecto a otros métodos alternativos: Ac: Ácido acético 80% (92,5 l·ha^{-1}); DAc: Desbroce y aplicación de ácido acético 80% (92,5 l·ha^{-1}); DSl: Desbroce y aplicación de salmuera (NaCl 118,4 kg·ha^{-1}); DAcSl: Desbroce, ácido acético 80% (92,5 l·ha-1) y salmuera (NaCl 118,4 kg·ha^{-1}).

Así, resultaron un total de cinco tratamientos que se compararon con un control desbrozado y otro sin desbrozar. Los herbicidas se aplicaron en dos ocasiones (29/06/2018 y 30/07/2018) con un pulverizador de manual y el desbrozado mecánico se realizó previamente a la primera aplicación. Todos los tratamientos se evaluaron por cuadruplicado en la carretera OU-902 Lalín (PO-534) en un total de 28 subparcelas de 150 m^2 que se sortearon al azar en cuatro bloques. En cada subparcela se evaluó la biomasa, frecuencia de cada especie, pH y CE del suelo un mes después de realizados los tratamientos. El empleo de sal, ácido acético o su combinación como alternativa al glifosato parece ser efectiva a corto plazo, aunque este estudio habría que hacerlo a lo largo del tiempo para poder corroborar estos resultados preliminares. Tras una única aplicación, no se produjo salinización ni acidificación secundaria con el empleo de la sal y/o ácido acético.

Palabras clave: Ácido acético, Salmuera, Glifosato, Desbroce

1. Introducción

La industria agroquímica se enfrenta críticas por el uso de pesticidas que pueden crear toxicidad y preocupación por los residuos que generan (Balogh y Anderson 1992; Barbash y Resek 1996; Huppatz 1990). Algunos productos naturales, como el vinagre, pueden ser utilizados como alternativa para el control de malezas (Evansy Bellinder, 2009). Actualmente el ácido acético es una sustancia autorizada como herbicida en varios estados miembros de la unión europea, pero en España aún no está regulado su uso. Recientemente se están publicando en distintos medios de comunicación, noticias sobre el empleo de ácido acético como herbicida a pesar de que su uso aún no está autorizado para este fin. Por otra parte, tampoco se conocen datos que evalúen su eficacia sobre el control de malezas. Teniendo en cuenta el desconocimiento actual sobre el comportamiento de la cubierta vegetal y del suelo frente a las aplicaciones de este producto, el objetivo de este ensayo es evaluar la posible eficacia de este compuesto en comparación con otras estrategias utilizadas comúnmente como son el desbroce o la aplicación de glifosato. Con el objetivo de complementar el ensayo, se ha introducido la aplicación de salmuera como tratamiento alternativo para el control de malezas.

2. Material y Métodos

Las parcelas de ensayo se eligieron en colaboración con los técnicos de la Axencia Galega de Infraestruturas (AXI) de Ourense en un trazado titularidad de la Xunta de Galicia (OU-902 Lalín (PO-534)). Se seleccionaron cuatro áreas de características similares y próximas entre ellas correspondientes a un trazado lineal de 201 m de longitud paralelos al eje de la calzada con un ancho de 5 m. Cada una de estas áreas se dividió en 7 suparcelas de 30 m ($150m^2$) donde se realizaron las distintas estrategias propuestas distribuidas al azar.

El control de la vegetación espontánea se llevó a cabo mediante diferentes tratamientos que consistían en, la realización o no de un desbroce mecánico con desbrozadora de carretera rotativa de martillos y la posterior aplicación un tratamiento herbicida mediante pulverizador de mochila, con boquilla de abanico a 3 bar y 1,6 $l \cdot min^{-1}$ a base de: i) Glifosato: Herbolex 360 (sal isopropilamina); ii) pH-tec: Ácido acético 80%; iii) Salmuera: Solución NaCl en agua 32%. La combinación de estos dos métodos derivó en los siguientes tratamientos: Ac: Ácido acético 80% (92,5 $l \cdot ha^{-1}$); DAc: Desbroce y ácido acético 80% (92,5 $l \cdot ha^{-1}$); DSl: Desbroce y salmuera (NaCl 118,4 $kg \cdot ha^{-1}$); DAcSl: Desbroce y ácido acético 80% (92,5 $l \cdot ha^{-1}$) y salmuera (NaCl 118,4 $kg \cdot ha^{-1}$); DGl: Desbroce y Glifosato 36% (8 $l \cdot ha^{-1}$); D: Desbroce; C: Control.

Todos los tratamientos herbicidas fueron aplicados manualmente con un pulverizador manual en un volumen total de 370 $l \cdot ha^{-1}$ en dos fechas: 1º tratamiento 29/06/2018 y 2º tratamiento 30/07/2018. Se realizaron tres muestreos. El primero antes del tratamiento, el segundo a los 20 días de la primera aplicación y el tercero a los 46 días tras la segunda. En todos ellos se tomó muestra de 3x0,1 m^2 de material vegetal y en el segundo se recogió también muestras de suelo con una sonda helicoidal de 15 cm de profundidad. Se efectuó una separación botánica en las muestras vegetales recogidas y se determinó su peso seco total. En las muestras de suelo se determinó el pH y CE en una solución 1:2,5 y 1:5 (p/p) (suelo:agua), respectivamente.

El análisis estadístico de los datos fue realizado con el programa SPSS versión 23.0. Para estudiar las diferencias entre tratamientos se realizó un ANOVA de una vía, previa comprobación de la normalidad de los datos (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de sus varianzas (prueba de Levene). Se aplicó el test DMS para $p<0,05$.

3. Resultados y Discusión

3.1 Evolución de las especies de malas hierbas más abundantes

Previamente al tratamiento se contabilizaron 60 especies en el conjunto de las parcelas del ensayo (Tabla 1), siendo las familias mayoritarias las compuestas y las gramíneas. Las especies dominantes fueron *Achillea millefolium, Andryala intergrifolia, Briza maxima, Dactylis glomerata, Plantago lanceolata, Rubus sp.* y *Trifolium pratense*.

Tabla 1. Especies de malas hierbas más abundantes antes y tras cada tratamiento. *:25%, **:50%, ***75% y ****:100% de frecuencia en los bloques.

Especie	Bloque				Frec.	Especie	Bloque				Frec.
	1	2	3	4			1	2	3	4	
Achillea millefolium L.	x	x	x	x	****	*Linum bienne* Mill.		x			*
Andryala intergrifolia L.	x	x	x	x	****	*Lolium perenne* L.				x	*
Anthemis arvensis L.			x	x	**	*Lotus corniculatus* L.		x	x	x	***
Arrhenatherum elatius L. Beau *ex Presle & Presle*		x			*	*Malva moschata* L.		x	x	x	***
Artemisia vulgaris L.		x			*	*Mentha suaveolens* Ehrh.	x	x		x	***
Avena barbata Pott ex Link	x	x	x		***	*Pentaglottis sempervirens* (L.) Tausch.	x	x			**
Betula pubescens Ehrh.		x		x	**	*Plantago coronopus* L.	x				*
Briza maxima L.	x	x	x	x	****	*Plantago lanceolata* L.	x	x	x	x	****
Bromus rigidus Roth		x		x	**	*Plantago major* L.		x	x		**
Bromus secalinus L.				x	*	*Poa pratensis* L.			x	x	**
Bromus sterilis L.						*Pseudarrhenatherum longifolium* (Thore) Rouy			x		*
Centaurea nigra L.	x			x	**	*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn	x		x	x	***
Cistus psilosepalus Sweet.		x	x		**	*Quercus robur* L.			x		*
Convulvulus arvensis L.		x	x		**	*Ranunculus repens* L.			x		*
Conyza canadensis L. Cronquist	x	x			**	*Rubus* sp.	x	x	x	x	****
Crepis lampsanoides Froel.	x				*	*Rumex acetosa* L.		x	x	x	***
Crepis vesicaria L.		x			*	*Rumex crispus* L.				x	*
Cynosurus echinatus L.	x		x	x	***	*Salix atrocinerea* Brot	x	x		x	***
Dactylis glomerata L.	x	x	x	x	****	*Scrophularia scorodonia* L.			x		*
Digitalis purpurea L.		x			*	*Senecio gallicus* Vill.	x		x	x	***
Echium vulgare L..	x	x			**	*Silene latifolia* Poir.		x		x	**
Fraxinus excelsior L.		x			*	*Sonchus asper*(L.) Hill.	x				*
Galium sp.		x	x	x	***	*Spergularia sp*				x	*
Geranium columbinum L.		x	x		**	*Trifolium pratense* L.	x	x	x	x	****
Geranium rotundifolium L.		x		x	*	*Trifolium repens* L.	x			x	**
Heracleum sphondylium L.		x	x	x	***	*Torilis arvensis* (*Huds.) Link*	x				*
Holcus mollis L.		x	x		**	*Ulex* sp.	x	x		x	***
Hypericum perforatum L.	x		x	x	***	*Urtica* sp.				x	*
Hypochaeris radicata L.		x		x	**	*Vicia angustifolia* L. Ex Reichard		x	x	x	***
Lamium maculatum L.			x		*	*Vicia tetrasperma* (L.) Scherb.	x		x		**

La población de las especies dominantes antes de aplicar las distintas estrategias de control, se vio disminuida en su mayor parte (Tabla 2), excepto en el caso del *Plantago lanceolata*. En el caso de *Poa pratensis* y *Trifolium repens* su desarrollo pudo verse favorecido al tener menos competencia con las otras especies dominantes, además se trata de especies perennes de distribución muy amplia en Galicia que poseen sistemas de reproducción vegetativa propia que facilitan su persistencia.

Tabla 2. Evolución de la frecuencia de aparición media de las especies de adventicias más abundantes después de realizados los dos tratamientos. *:25%, **:50%, ***75% y ****:100% de frecuencia en los bloques.

Especie	Inicio sin tratar	27 días tras la primera aplicación	52 días tras la segunda aplicación	Evolución
Achillea millefolium	****	**	***	<
Andryala intergrifolia	****	-	-	<
Briza maxima	****	**	-	<
Dactylis glomerata	****	***	***	<
Plantago lanceolata	****	***	****	=
Poa pratensis	**	***	***	>
*Rubus*sp.	****	*	-	<
Trifolium pratense	****	**	**	<
Trifolium repens	**	*	****	>

3.2 Biomasa de malas hierbas segundo tratamientos

En los muestreos realizados tras la aplicación de los tratamientos herbicidas se puede observar (Tabla 3) la falta de eficacia de la aplicación de ácido acético sin desbroce (Ac) con respeto a las parcelas control, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas. Después del desbroce la aplicación de glifosato redujo la vegetación casi su totalidad, pero la adición de ácido acético (DAc), sal (DSl) o ácido acético+sal (DAcSl) después del desbroce, también mantiene el control de la vegetación, no encontrándose diferencias significativas con el glifosato, como se puede ver en las Tablas 3 y 4 A corto plazo las estrategias de control estudiadas, parecen ser efectivas, aunque para confirmar este hecho, este estudio tendrá que llevarse a cabo a más largo plazo en distintos años.

Tabla 3. Biomasa en materia seca ($kg \cdot m^{-2}$) de malas hierbas segundo tratamiento bloque, media e desviación estándar 27 días tras la primera aplicación.

Tratamento	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Media	Desvest
C	0,62	0,33	0,39	0,73	0,52 b	±0,19
D	0,10	0,06	0,11	0,05	0,08 a	±0,03
Ac	0,34	0,28	0,41	0,64	0,42 b	±0,16
DGl	0,01	0,01	0,04	0,05	0,03 a	±0,02
DAc	0,06	0,04	0,06	0,14	0,08 a	±0,04
DSl	0,04	0,07	0,14	0,06	0,08 a	±0,04
DAcSl	0,05	0,07	0,09	0,02	0,06 a	±0,03

C: Control; D: Desbroce; Ac: Ácido acético 80% (92,5 $l \cdot ha^{-1}$); DGl: Desbroce y Glifosato 36% (8 $l \cdot ha^{-1}$); DAc: Desbroce y ácido acético 80% (92,5 $l \cdot ha^{-1}$); DSl: Desbroce y aplicación de salmuera (NaCl 118,4 $kg \cdot ha^{-1}$); DAcSl: Desbroce y aplicación de ácido acético 80% (92,5 $L \cdot ha^{-1}$) y salmuera (NaCl 118,4 $kg \cdot ha^{-1}$).

Tabla 4. Biomasa en materia seca ($kg \cdot m^{-2}$) de malas hierbas segundo tratamiento bloque, media e desviación estándar, 52 días tras la segunda aplicación.

Tratamento	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Media	Desvest
C	0,41	0,27	0,53	0,68	0,47 b	±0,18
D	0,08	0,06	0,17	0,06	0,09 a	±0,05
Ac	0,48	0,24	0,37	0,75	0,46 b	±0,22
DGl	0,02	0,00	0,02	0,05	0,02 a	±0,02
DAc	0,08	0,06	0,07	0,09	0,07 a	±0,02
DSl	0,06	0,11	0,11	0,07	0,09 a	±0,03
DAcSl	0,04	0,07	0,08	0,06	0,06 a	±0,01

C: Control; D: Desbroce; Ac: Ácido acético 80% (92,5 $l \cdot ha^{-1}$); DGl: Desbroce y Glifosato 36% (8 $l \cdot ha^{-1}$); DAc: Desbroce y ácido acético 80% (92,5 $l \cdot ha^{-1}$); DSl: Desbroce y aplicación de salmuera (NaCl 118,4 $kg \cdot ha^{-1}$); DAcSl: Desbroce y aplicación de ácido acético 80% (92,5 $L \cdot ha^{-1}$) y salmuera (NaCl 118,4 $kg \cdot ha^{-1}$).

3.3 Modificaciones producidas en el pH y en la salinidad del suelo a corto plazo

Las cantidades añadidas al suelo de los diferentes tratamientos no supusieron cambios apreciables en el mismo, ni en el pH ni en la salinidad medida a través de la CE. La sospecha de que la sal añadida había podido originar una salinización secundaria del suelo no ocurrió con las cantidades aplicadas. Los valores encontrados estuvieron muy por debajo de 500 $\mu S\ cm^{-1}$ (0,5 $dS\ m^{-1}$), valor de riesgo de salinización, aunque pudo apreciarse que los valores más altos de CE se encontraron en parcelas que recibieron sal. En caso de que estos tratamientos se hicieran de forma sistemática, convendría hacer un seguimiento de la salinidad en períodos secos. En períodos húmedos, en Galicia, el agua de lluvia suele ser suficiente para lavar el exceso de cloruro sódico.

Tabla 4. Valores medios de pH, CE y desviación estándar por bloque y tratamiento.

pH 52 días tras la segunda aplicación

Subparcela	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Media	Desvest
C	5,96	6,31	6,0	5,95	6,07	±0,17
D	6,24	6,47	6,08	5,79	6,15	±0,28
Ac	6,16	6,6	6,14	6,02	6,23	±0,25
DGl	6,2	6,31	6,0	5,88	6,10	±0,19
DAc	6,02	6,05	5,81	5,87	5,94	±0,11
DSl	6,51	6,35	5,58	5,90	6,09	±0,42
DAcSl	6,35	6,44	5,97	6,11	6,22	±0,21

CE ($mS\ cm^{-1}$) 52 días tras la segunda aplicación

Subparcela	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Media	Desvest
C	89,5	50,2	60,0	66,2	66,48	±16,70
D	66,2	81,1	80,5	116,5	86,08	±21,42
Ac	60,8	87,6	116,0	91,9	89,08	±22,61
DGl	65,0	98,1	58,9	108,3	82,58	±24,30
DAc	84,2	73,4	95,6	59,5	78,18	±15,40
DSl	68,0	114,8	99,8	99,4	95,50	±19,68
DAcSl	55,3	154,1	82,2	78,6	92,55	±42,73

C: Control; D: Desbroce; Ac: Ácido acético 80% (92,5 $l \cdot ha^{-1}$); DGl: Desbroce y Glifosato 36% (8 $l \cdot ha^{-1}$); DAc: Desbroce y ácido acético 80% (92,5 $l \cdot ha^{-1}$); DSl: Desbroce y aplicación de salmuera (NaCl 118,4 $kg \cdot ha^{-1}$); DAcSl: Desbroce y aplicación de ácido acético 80% (92,5 $l \cdot ha^{-1}$) y salmuera (NaCl 118,4 $kg \cdot ha^{-1}$);.

Referencias

BALOGH JC & ANDERSON JJ (1992) Environmental impacts of turfgrass pesticides. In: *Golf Course Management and Construction—Environmental Issues* (*eds.* Balogh JC & Walker JW), 221–222 Chelsea.

BARBASH, J E & RESEK E A (1996) *Pesticides in ground water: distribution, trends, and governing factors*. Ann Arbor Press.

EVANS GJ & BELLINDER RR (2009) The potential use of vinegar and a clove oil herbicide for weed control in sweet corn, potato, and onion. *Weed Technology*, No.*23*(1), 120-128.

Evaluation of alternative methods for spontaneous vegetation contro on road margins

Summary: Galicia has more than 17,000 km of roads, this fact combined with favorable climatic conditions (abundant rainfall and temperate temperatures) increases the importance of controlling spontaneous vegetation on the roads margins (being the most abundant families in the study area composite and grass).

The objective of this work was to compare the application of glyphosate 36% to other alternative methods in the control of weeds based on acetic acid and brine. The following treatments were studied: Ac: Acetic acid 80% (92.5 l · ha^{-1}); DAc: Clearing and acetic acid 80% (92.5 l · ha^{-1}); DSm: Clearing and brine (NaCl 118.4 kg·ha^{-1}); DAcSl: Clearing and acetic acid 80% (92.5 l·ha^{-1}) and brine (NaCl 118.4 kg·ha^{-1}); DGl: Clearing Glyphosate 36% (8 l·ha^{-1}); D: Clearing; C: Control. The herbicides were applied twice (06/29/2018 and 07/30/2018) with a manual sprayer and a clearing was made before the first application. All treatments were evaluated in quadruplicate on the OU-902 Lalín (PO-534) highway in 28 sub-areas of 150 m^2 randomly ordered into four blocks. In each of them, the biomass, frequency of each species, pH and CE were evaluated. The use of salt, vinegar or its combination as an alternative to glyphosate seems to be effective in the short term, although this study should be done over time in order to corroborate these preliminary results. After a single application, there was no secondary salinization with the use of salt.

Keywords: Acetic acid, Brine, Glyphosate, Brush.

ECOBREED: buscando variedades competitivas para el control de malas hierbas en la agricultura ecológica

VIEITES Y, HUSSAIN MI, SÁNCHEZ-MOREIRAS AM, REIGOSA MJ

Department of Plant Biology and Soil Sciences, University of Vigo, SPAIN.
yedra.vieites.alvarez@uvigo.es

Resumen: El proyecto ECOBREED tiene como objetivo aumentar la disponibilidad de semillas y variedades para la producción orgánica con un menor uso de insumos, para lo cual se plantea en el mismo el estudio de las características adecuadas con el fin de obtener una alta eficiencia en el uso de nutrientes y en la competitividad (alelopatía) frente a las malas hierbas en un cultivo acorde con los principios de la agricultura ecológica. Las actividades se centran en cuatro especies de cultivos seleccionadas en función de su potencial para aumentar la competitividad del sector orgánico: trigo común, trigo sarraceno, soja y patata. El proyecto desarrolla (a) métodos, estrategias e infraestructuras para el cultivo orgánico, (b), variedades más resistentes al estrés y más eficientes con el uso de los recursos y (c) métodos mejorados para la producción de semillas orgánicas de alta calidad. Se llevan a cabo tareas de identificación de variaciones genéticas y fenotípicas relacionadas con la búsqueda de una mayor resistencia/tolerancia abiótica y biótica, mejor adquisición de nutrientes, potencial para incrementar la competitividad y control de malas hierbas, optimización de la producción de semillas y aumento de la calidad nutricional.

Palabras clave: alelopatía, agricultura ecológica, malas hierbas, trigo, trigo sarraceno.

1. Introducción

ECOBREED es un proyecto europeo que tiene como fin seleccionar variedades y semillas que se adecúen mejor a la producción orgánica con un bajo uso de fertilizantes. Las actividades son llevadas a cabo por diferentes entidades europeas, además de un grupo de China y otro de EEUU (Fig. 1) y se centran en cuatro especies de cultivos: trigo común (*Triticum aestivum* L y *Trititcum durum* L), patata (*Solanum tuberosum* L), soja (*Glycine max (L). Merr*) y trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum Moench*). Las especies ECOBREED han sido seleccionadas por su potencial para el aumento de la competitividad del sector orgánico. El trigo común es el cultivo más importante para el consumo humano representando la mayor área de cultivos orgánicos. La patata es el cultivo orgánico más cultivado en Europa. La soja se ha incluido en ECOBREED por la

necesidad urgente de aumentar la producción de leguminosas de grano orgánico para reemplazar la proteína importada para la alimentación del ganado, y finalmente, el trigo sarraceno es un cultivo popular que cuenta con numerosos beneficios nutricionales como la ausencia de gluten.

Participant No	Participant Organisation name	Country
1(Coordinator)	Kmetijski Inštitut Slovenije (KIS)	SI
2	Universität für Bodenkultur, Wien (BOKU)	AT
3	Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha (CRI)	CZ
4	Institute of Field and Vegetable Crops (IFVC)	RS
5	Institutul National de Cercetare – Dezvoltare Agricola Fundulea (NARDI)	RO
6	Magyar Tudományos Akadémia, Agrártudományi Kutatóközpont (MTA-ATK)	HU
7	University Newcastle Upon Tyne (UNEW)	UK
8	LC Smales &Son (SMA)	UK
9	Selgen AS (SEL)	CZ
10	Geokomi Volakakis Farms (GEO)	EL
11	Tuscia University, Viterbo (UNITUS)	IT
12	Naturland e.V. (NATUR)	DE
13	Universidade de Vigo (UViGO)	ES
14	Plant Breeding and Acclimatization Institute (IHAR)	PO
15	University of Pannonia, Keszthely (UP)	HU
16	PRO-BIO Obchodni Spolecnost s.r.o (PROBIO)	CZ
17	BIOMILA spol.s.r.o. (BIOMILA)	SK
18	Narodne Pol'nohospodarske A Potravinarske Centrum (NPPC)	SK
19	RGA (RGA)	SI
20	Saatzucht Gleisdorf (SZG)	AT
21	Global Seed (GS)	RS
22	Secobra Saatzucht GmbH (SEC)	DE
23	Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs (PSOVER)	AT
24	Chinese Academy of Agricultural Science (CAAS)	CN
25	Washington State University (WSU)	US

Figura 1. Participantes del proyecto ECOBREED

ECOBREED utiliza un enfoque integrado y multidisciplinar con el fin de aumentar el número de variedades competitivas para el control de malas hierbas en la agricultura ecológica. Los objetivos específicos a abordar en ECOBREED son:

• Identificar la variación genética y fenotípica para mejorar la producción de variedades relacionadas con un mayor rendimiento agronómico, resistencia al estrés abiótico/biótico y mejor calidad nutricional. Esto se logra mediante la caracterización fenotípica de colecciones principales en entornos contrastantes y mediante el establecimiento de programas de selección asistida por marcadores (MAS).

• Evaluar variaciones genéticas con un mayor potencial de absorción de los nutrientes mediante la identificación de asociaciones de micorrizas arbusculares (AMF), eficiencia de fijación de N_2 y capacidad de mineralización del fósforo.

• Evaluar el potencial para aumentar la competitividad y el control de las malas hierbas a través de la identificación de variedades con mayor crecimiento temprano y con una actividad alelopática mejorada.

• Optimizar la producción de semillas a través de protocolos agronómicos mejorados.

• Brindar a los agricultores la oportunidad de elegir y desarrollar variedades en su propio entorno que se adapten mejor a sus necesidades y condiciones.

• Desarrollar programas de capacitación (genotipado y fenotipado mejorados) para facilitar la transferencia rápida de los trabajos realizados en el proyecto a la práctica comercial.

La Universidad de Vigo será la encargada de realizar las tareas relacionadas con la alelopatía en las diferentes variedades de trigo y trigo sarraceno, llevadas a cabo entre los meses 13-60 del proyecto.

Se evaluarán hasta 40 variedades de diferentes regiones ecogeográficas para: (a) se está valorando la exudación radicular de aleloquímicos *in vitro*, midiendo los aleloquímicos producidos y liberados, incluidos los ácidos hidroxámicos (BOA, DIBOA, DIMBOA, y APO, siendo estos los más fitotóxicos), ácidos fenólicos y flavonoides, y se evalúa su fitotoxicidad en malas hierbas y otras especies de cultivos; (b) las 20 variedades más prometedoras se utilizarán en la segunda etapa: la concentración de aleloquímicos en el suelo se evaluará en plantas adultas siguiendo el método de Weidenhamer et al. (2014), con extracción de solución del suelo mediante microtubos; y (c) se estudiará la liberación por agua de lluvia de aleloquímicos foliares.

2. Material y Métodos:

Para el estudio de los aleloquímicos exudados por las raíces se sigue el método de Wu et al. (2000). Se cogen 12 semillas de cada variedad de trigo previamente esterilizadas y se disponen en 3 filas de 4 semillas sobre la superficie del agar 0,3% en vasos de cristal autoclavados. Los vasos se cubren con film y se llevan a una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 13L/11D y una temperatura de 25 / 15 ºC respectivamente. El día 7, se colocan en la otra mitad del agar 12 semillas de *ryegrass* (*Lolium rigidum)* previamente esterilizadas y pregerminadas separadas de las del trigo por un plástico que sobresale 1 cm por encima de la superficie el agar para evitar competencia por nutrientes. A los 17 días y tras crecer 10 días juntos, se mide la longitud de las raíces y brotes de ambas especies. Ambas partes se liofilizan y se cortan 0,1 g, se le añade nitrógeno líquido y macera con 3 mL de 0,001 MHCl. Todo el macerado se transfiere a un vial para sonicarlo durante 15 min, centrifugarlo a 20 000 rpm a 10 ºC durante 15 min con el fin de recoger el sobrenadante. Este se resuspende 3 veces con 10 mL de dietil éter. Las capas de éter se combinan y se evaporan en un evaporador rotatorio hasta que quedan alrededor de 2 mL. A esta solución se le añade 1 mL de ácido *p*-clorobenzoico para acelerar el proceso de derivatización. Con el agar se realizan los mismos pasos pero con 60 mL de dietil éter.

Las muestras se analizan mediante cromatografía de gases/masas.

Las 20 variedades de semillas más prometedoras para el control de malas hierbas se utilizan para medir la liberación de aleloquímicos en el suelo en plantas adultas.

3. Resultados y Discusión

Durante los 13 primeros meses del proyecto se ha llevado a cabo la selección de diferentes variedades de semillas obteniendo un total de 66 variedades de trigo sarraceno.

Las variedades de trigo sarraceno se seleccionaron según su capacidad de mejorar la accesibilidad de fósforo para el próximo cultivo además de la baja demanda de condiciones del suelo. En la tabla 1 se muestran los países de origen de los diferentes genotipos seleccionados para el estudio de su capacidad alelopática. De todas las variedades seleccionadas (66), se eligieron 44 para valorar su capacidad alelopática teniendo en cuenta su tolerancia y resistencia a enfermedades y su capacidad de competir en el campo de cultivo.

País de origen	Número de genotipos
Austria	2
Belarus	1
Bhutan	1
Canada	1
China	1
Czech Republic	6
Former Soviet Union	9
France	1
Germany	1
Japan	7
Mexico	1
Poland	7
Russian Federation	4
Slovakia	3
Slovenia	7
Sweden	1
Ukraine	4
unknown	7
USA	2

Tabla 1. País de origen y número de genotipos de trigo sarraceno.

Las variedades de trigo sarraceno seleccionadas se usarán para evaluar su potencial en el control de malas hierbas a través de la identificación de variedades con mayor crecimiento temprano y con una actividad alelopática mejorada.

4. Agradecimientos

A la UE por la concesión del proyecto, a los miembros del proyecto ECOBREED "increasing the efficiency and competitiveness of organic crop breeding" y en particular a Dr. Heinrich Grausgruber (Universidad de Recursos Naturales y Ciencias de la Vida (BOKU) Viena) y Dagmar Janovska (Gene Bank, Praga).

Referencias

WEIDENHAMER JD, MOHNEY B, SHIDADA N et al. (2014). Spatial and Temporal Dynamics of Root Exudation: How Important is Heterogeneity in Allelopathic Interactions?. J Chem Ecol, 40:940–95

WU H, HAIG T, PRATLEY J et al. (2000). Distribution and exudation of allelochemicals in wheat *Triticum* aestivum. Journal of Chemical Ecology, Vol. 26, No. 9, 2141-2154

ECOBREED: increasing the efficiency and competitiveness of organic crop breeding

Summary: ECOBREED will improve the availability of seed and varieties suitable for organic and low- input production. Activities will focus on four crop species, selected for their potential contribution to increase competitiveness of the organic sector, i.e. common wheat, potato, soybean and common buckwheat. The project will develop (a) methods, strategies and infrastructures for organic breeding, (b) varieties with improved stress resistance, resource use efficiency and quality and (c) improved methods for the production of high quality organic seed. The objectives are to increase the availability of seeds and varieties for the organic and low-input sector, to identify traits and combinations of traits suited to organic and low-input production environment including high nutrient use efficiency and weed competitiveness/allelopathy. ECOBREED will identify genetic and phenotypic variation in morphological, abiotic/biotic tolerance/resistance and nutritional quality traits that can be used in organic breeding and it will evaluate the potential of genetic variation for enhanced nutrient acquisition and for increased weed competitiveness and control.

Keywords: allelopathy, biochemical analysis, organic agriculture, weed suppression, wheat varieties.

Ecophysiological plasticity in broad leaf weed *Rumex acetosa* under allelochemical stress

HUSSAIN MI, VIEITES Y, SÁNCHEZ-MOREIRAS AM, REIGOSA MJ

Department of Plant Biology and Soil Science, University of Vigo, E-36310, Vigo, SPAIN
mih786@gmail.com; *yedra.vieites.alvarez@uvigo.es*; *adela@uvigo.es*; *mreigosa@uvigo.es*

Abstract: Secondary metabolites such as ferulic acid (FA) and *p*-hydroxybenzoic acid (pHBA) have demonstrated inhibitory effects on germination and seedling growth of lettuce and perennial grasses. However, to date little is known about the physiological mechanisms of action of these natural compounds in broad-leaved weed, *Rumex acetosa*. The objective of this study was to determine the plasticity response of *Rumex acetosa* in terms of leaf carbon isotope composition and other physiological parameters to the interaction of plant secondary metabolites (PSM) (FA, pHBA) and the usefulness of carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}C$) as indicative of the functional performance of intrinsic water use efficiency (iWUE) at leaf level. *R. acetosa* plant were grown under greenhouse condition and subjected to PSM stress (0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 mM) for 06 days. Here we show that, FA and pHBA are potent inhibitors of $\Delta^{13}C$ that varied from 21.0‰ to 22.9‰. Higher pHBA and FA supply enhanced the N_{leaf} and retard the C_{leaf}. The CO_2 concentration from leaf to air (*C*i/*C*a) was decreased while iWUE increased. These results confirm the phytotoxicity of FA and pHBA on *R. acetosa* seedlings, and $\Delta^{13}C$, *C*i/*C*a and iWUE are suitable indicators of physiological plasticity.

Keywords: Phenolic compounds, physiological growth, natural herbicide, phytotoxicity

1. Introduction

Herbicide resistance in both grasses and broadleaf weeds is on the rise across Europe a lethal cascade that is decreasing the crop yield with an increasing number of weeds experiencing resistance to multiple herbicides (Busi et al., 2013). Blackgrass (*Alopecurus myosuroides*) is a typical example of herbicide resistance that has destroyed thousands of farms in United Kingdom and exacerbated the wheat production (approximately £0.5 billion losses) (Duke et al., 2000).

Natural products from living organisms, plants, fungi and bacteria are a huge source of environmentally friendly "bioherbicides" that can overcome the herbicide resistance problem (Hussain and Reigosa, 2011; Dayan et al., 2012). Secondary metabolites might interfere with the growth, physiological and biochemical process of target plants, but their mode of action has rarely been studies (Massalha et al., 2017). Phenolic compounds and flavonoids from *Acacia melanoxylon* flower aqueous extract were responsible to decrease seedling growth and germination of *D. glomerata*, *R. acetosa, L. perenne*, and *L. sativa* (Hussain et al., 2011). To realize the potential of two important secondary metabolites such as ferulic acid (FA), and *p*-hydroxybenzoic acid (pHBA) as a tool in integrated management of C_3 broad leaf weed *Rumex acetosa*, the present study was conducted to assess their competitive potential of

selected secondary metabolites. Moreover, important ecophysiological features such as carbon isotope composition as a functional performance of intrinsic water use efficiency (iWUE) at leaf level of *R. acetosa* plant. It is likely that selection will not be based on a single trait but will need to capture the combined effect of multiple traits (Andrew et al. 2015). Reliable applications of the non-invasive technique of isotope signatures in broad leaf weed, *Rumex acetosa* for developing herbicide-resistance model and impact of natural compounds for interfering the physiological features required the understanding of the detailed mechanisms of carbon and nitrogen isotope discrimination in leaf organic matter of this plant. Therefore, in the present work, the inhibitory impact of both phenolic compounds was assayed on the metabolism of adult weed grass, *Rumex acetosa* plants using Isotope ratio mass spectrometer, in order to establish the primary affected organ and understand the lethal impact of these molecules. The effects of FA and pHBA on $\delta^{13}C$, composition of carbon isotope ratios; $\Delta^{13}C$, carbon isotope discrimination; *C*i/*C*a, ratio of intercellular CO_2 concentration from leaf to air on Δ were assessed.

2. Material and Methods

The *Rumex acetosa* L. (cv. Belleville) seeds were surface sterilized with $NaClO_3$ (0.5%), and then rinsed with distilled water. Seeds were sown individually in plastic trays (32 x 20 x 6 cm) filled with 5 cm deep layer of perlite (500 g/tray). The seedlings were grown with 10% Hoagland solution at temperature 28/20 ^{0}C (day/night), photoperiod 09/15 h (light/dark) and relative humidity of 80%). The other growth conditions were the same as reported previously (Hussain and Reigosa, 2011). The treatment solution of FA and pHBA was prepared (concentration: 1.5, 1.0, 0.5, 0.1 mM) from the stock solution (3 mM). The treatments (100 mL/pot) were applied on alternative day's up to 6-days. The experiment was laid out in Randomized Complete Block Design (RCBD) with three replications of each treatment and a control.

The plant leaf samples collected from each treatment and control were dried and grounded into fine powder. The encapsulated leaf samples (1700-2100 µg), were subject to isotope analysis using Isotope Ratio Mass Spectrometer (Finnegan: Thermo Fisher Scientific, model MAT-253, Swerte, Germany) at the Stable Isotope facility, University of Vigo, Spain. The isotopic composition was reported as $\delta^{13}C$ (‰) having Vienna Pee Dee Belemnite (V-PDB) as international standard ($R_{standard}$) and calculated using Eq. 1.

$$\delta^{13}C_{sample} = \left(\frac{R_{sample}}{R_{standard}} - 1\right) \times 1000 \qquad (1)$$

The ^{13}C discrimination ($\Delta^{13}C$) was calculated from the measured values of $\delta^{13}C_{sample}$ using Eq. 2.

$$\Delta^{13}C = \frac{\delta^{13}C_{air} - \delta^{13}C_{sample}}{1 + (\delta^{13}C_{sample}/1000)} \qquad (2)$$

Where $\delta^{13}C_{air}$ and $\delta^{13}C_{sample}$ is the carbon isotope compositions of air and plant samples, respectively. The $\delta^{13}C_{air}$was put at −8.15‰ as reported in CDIAC (2015). The intrinsic water use efficiency was calculated as the procedure reported in Robertson et al. (2001) and Hussain and Reigosa, (2012). One-way ANOVA followed by the Dunnett test was used to evaluate the effects of FA and pHBA addition on the response variables under the glass house conditions. All procedures were carried out in SPSS Version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

3. Results and Discussion

The yield of major cereal and food crops significantly declined due to the heavy infestation of different weeds in the agriculture fields. Several weed species including broad leaf weeds such as *Rumex dentatus* has caused significant reduction in wheat yield in Pakistan (Waheed et al., 2009). Natural products from plants, fungi and bacteria can be used for the safe development of lead compounds for new bioherbicides discovery program (Macías et al., 2014). Allelochemicals released from donor plants into the environment might interfere the absorption and availability of certain nutrients for other plants. The soil environment can be modified through root exudates and litters that affect soil structure, biochemical properties, and nutrient mobilization. In this study, FA and pHBA (0.1 to 1.5 mM) produced a significant decline of 9.3 % and 9.76% in leaf C% in both cases. At lower FA concentration (1.5 mM), the N levels were maintained at approximately 1.90% that was at par with control. However, at higher concentration (1.5 mM) of FA, there was a 25.38% reduction in N% as compared to control (Table 1). In contrast pHBA showed a significant decline 28.93% in leaf N level as compared to control ($p \leq 0.05$). Li et al. (2007), demonstrated that the growth of maize intercropped with *Vicia faba* was improved due to availability of phosphorus. They found that organic acids released from the root exudates helps to increase the phosphorus supply to the maize plant. Phytotoxic and inhibitory effects of plant based natural products such as ferulic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, cinnamic acid on the germination, growth and ecophysiology traits of the other crops have been reported (Hussain et al., 2011; Hussain and Reigosa, 2017; Hussain et al., 2015). Our results indicate that increasing FA and pHBA concentration from 0.1 to 1.5 mM, allelochemicals stress produced a threefold (28.29%) decrease in leaf nitrogen isotope composition ($\delta^{15}N$) of *Rumex acetosa* and seven fold (33.82%) decrease in $\delta^{15}N$ following treatment with 1.5 mM pHBA.

Table 1. Effect of different concentrations of ferulic acid (FA) and *p*-hydroxybenzoic acid (pHBA) on carbon and nitrogen concentrations and nitrogen isotope composition (δ15N) of *Rumex acetosa*.

Treatments	Concentration (mM)	C%	N%	C/N ratio	$\delta^{15}N$
FA	Control	48.14 ± 1.9a	1.97 ± 0.31a	24.43 ± 0.6b	15.02 ± 0.4a
	1.5	44.28 ± 1.2c	1.47 ± 0.32c	30.12 ± 0.6a	10.77 ± 0.9c
	1	43.66 ± 2.5c	1.82 ± 0.63b	23.98 ± 0.5c	11.59 ± 0.9b
	0.5	46.37 ± 1.9b	1.52 ± 0.4c	30.5 ± 0.4a	10.46 ± 1.1c
	0.1	46.02 ± 5.5b	1.90 ± 0.39a	24.22 ± 0.4b	11.09 ± 3.5b
pHBA	Control	48.14 ± 1.9a	1.97 ± 0.31a	24.43 ± 0.6c	15.02 ± 0.4a
	1.5	43.61 ± 3.2c	1.40 ± 0.40d	31.15 ± 0.5a	9.94 ± 1.0d
	1	43.34 ± 4.2c	1.53 ± 0.38c	28.32 ± 0.4a	10.58 ± 1.3c
	0.5	43.96 ± 0.4c	1.65 ± 0.36b	26.64 ± 0.6b	10.21 ± 0.7c
	0.1	44.88 ± 3.5b	1.95 ± 0.68a	23.01 ± 0.4c	11.56 ± 1.3b

C%, foliage carbon concentration; N%, foliage nitrogen concentration; C/N ratio, ratio of carbon to nitrogen; $\delta^{15}N$, stable nitrogen isotope composition. The values are the means of 26 measurements (two treatments, four concentrations, three replications per treatment and control). Means followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$) according to Tukey's honestly significant difference (HSD) test.

According to literature, several abiotic stress factors (salinity, drought, allelochemicals) can either decrease (Handley et al., 1997; Robinson et al., 2000) or increase $\delta^{15}N$ (Lopes and Araus, 2006). Evans, (2001) documented that N isotopes can provide integrated information about nitrogen fluxes, assimilation pathways and allocation. It was observed that once the allelochemicals threshold level is exceeded, the physiological mechanism might break down as leaf C and N% levels begin to decrease abruptly. The relationship between tissue C% and

N% can be revealed by plotting C / N ratio as a function of external abiotic stress, like allelochemicals (Table 1). Both FA and pHBA maintained a significant reduction in C/N ratio at approximately 20 to 30 with increasing external allelochemicals concentrations up to 1.5 mM.

Plant photosynthesis discriminates against the stable ^{13}C isotope, when atmospheric CO_2 passes through stomata and during CO_2 carboxylation in RuBisCO (Farquhar and Richards, 1984). The variations in stable isotopes of C and N contain a potential wealth of information regarding phenotypic plasticity because stable isotope ratios are reliable indicators of spatially and temporally dynamic changes in environment. The $\Delta^{13}C$ varied from 21.0‰ to 22.9‰. Both FA and pHBA supply significant effect on $\Delta^{13}C$ at $p = 0.05$ (Fig.1). At higher pHBa and FA supply, the *Ci*/*Ca* significantly decreased as compared to control. Carbon isotope discrimination (Δ) usually correlates with the dry matter to transpiration ratio (transpiration efficiency) in C_3 species, but its heritability and relationship to *R. acetosa* growth are not clear. Carbon isotope composition ratio ($\delta^{13}C$) was less negative (-28.4) than the control (-30.2) in *R. acetosa* following treatment at highest level of both secondary metabolites (Fig.1). Other authors, (Barkosky and Einhellig, 2003), demonstrated that in soybean plants, $\delta^{13}C$ values were less discriminated following treatment with pHBA. It was observed that a reduction in intercellular CO_2 concentration might be due to closed stomata that led to reduced rate of WUE and subsequent higher $\Delta^{13}C$. Similarly, $\Delta^{13}C$ values in lettuce leaves were lower than control following treatment with BOA (Hussain and Reigosa, 2012).

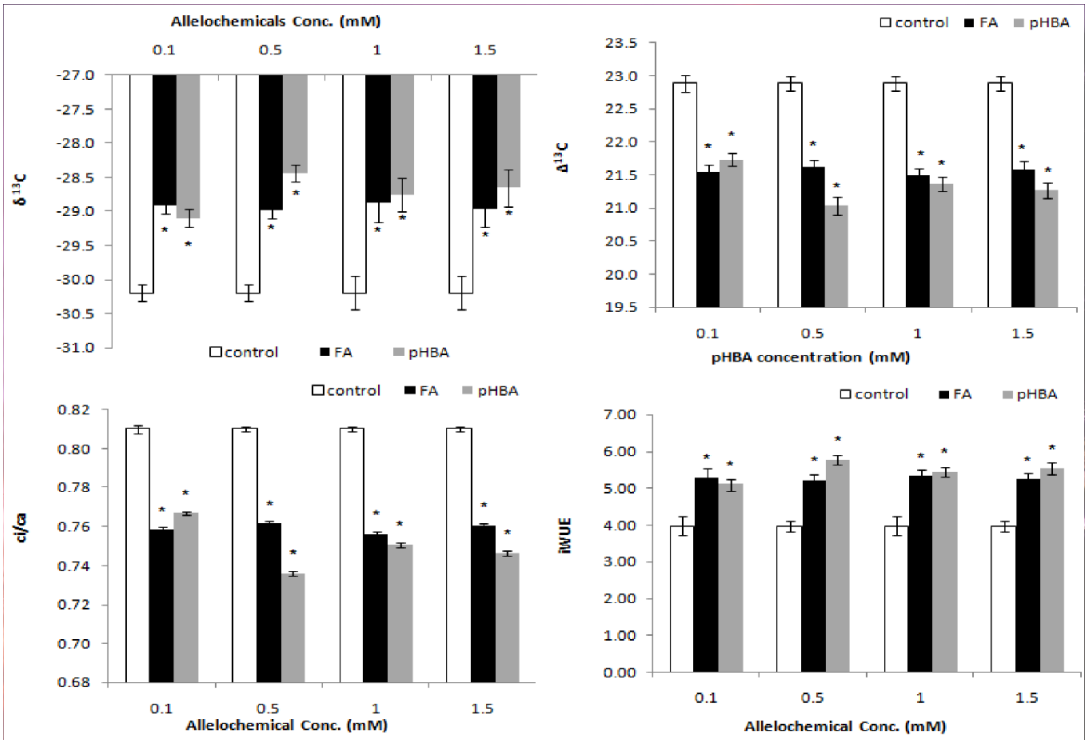


Fig. 1 Changes in carbon isotope composition ($\delta^{13}C$) (A), carbon isotopes discrimination ($\Delta^{13}C$) (B), ratio of CO_2 from leaf to air (*ci*/*ca*) (C) and intrinsic water use efficiency (iWUE) in leaves of *Rumex acetosa* following one week exposure to ferulic acid (FA) and *p*-hydroxybenzoic acid (pHBA) at 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 mM concentrations. *Asterisk indicates significant differences at $p < 0.05$ with respect to control.

However, iWUE increased at all allelochemicals concentrations. Compared to no allelochemicals supply, iWUE was three times higher and *C*i/*C*a was three times lower at all allelochemicals concentrations. Changes in concentration of FA and pHBA also led to changes in intrinsic leaf WUE and leaf $\Delta^{13}C$. The $\Delta^{13}C$ values significant reduced because the *C*i/*C*a process is inhibited at elevated level of both phenolic acids. This is coincided with unbalance supply of CO_2 from inside to outside of stomata (Hussain and Reigosa 2017). Similar results were reported from Russian wild rye (Frank and Berdahl, 2001), *Lolium perenne* (Hussain and Reigosa 2017), *Lactuca sativa* (Hussain and Reigosa, 2012). It was concluded that carbon isotope composition technique is a reliable, stable, and suitable methodologies in allelopathic research because it highlight the impedance in the $\delta^{13}C$, *Ci*/*C*a and iWUE, providing significant insight into the plant ecophysiological, and biochemical attributes, that led to better understanding of the fundamental aspects of plant stress physiology.

References

AI HAMDI B, INDERJIT, OLOFSDOTTER M & STREIBIG JC (2001) Laboratory bioassay for phytotoxicity: An example from wheat straw. *Agronomy Journal* **93**, 43-48.

BARKOSKY RR & EINHELLIG FA (2003) Allelopathic interference of plant-water relationships by para-hydroxybenzoic acid. *Botanical Bulletin of Academia Sinca* **44**, 53-58.

CDIAC. 2015. Monthly atmospheric $^{13}C/^{12}C$ isotopic ratios for 11 SIO Stations. Carbon Dioxide Information Analysis Center (CDIAC).

CHANDRAMOHAN S, CHARUDATTAN R, SONODA RM & SINGH M (2002) Field evaluation of a fungal pathogen mixture for the control of seven weed grasses. *Weed Science* **50**, 204–213.

DAYAN FE, OWEN DK & DUKE SO (2012) Rationale for a natural products approach to herbicide discovery. *Pest Management Sciences* **68**, 519–528.

EVANS RD (2001) Physiological mechanism influencing plant nitrogen isotope composition. *Trends in Plant Science* **6**, 121–126.

FARQUHAR GD & RICHARDS RA (1984) Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Functional Plant Biology* **11**, 539-552.

FARQUHAR GD, EHLERINGER JR & HUBICK KT (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **40**, 503-537.

FRANK AB & BERDAHL JD (2001) Gas exchange and water relations in diploid and tetraploid Russian wildrye. *Crop Science* **41,** 87-92.

HANDLEY LL, ROBINSON D, FORSTER BP et al. (1997) Shoot $\delta^{15}N$ correlates with genotype and salt stress in barley. *Planta* **201**,100–102.

HUSSAIN MI & REIGOSA MJ (2011) Allelochemical stress inhibits growth, leaf water relations, PSII photochemistry, non-photochemical fluorescence quenching and heat energy dissipation in three C_3 perennial species. *Journal of Experimental Botany* **62**, 4533-4545.

HUSSAIN MI & REIGOSA MJ (2012) Seedling growth, leaf water status and signature of stable carbon isotopes in C_3 perennials exposed to natural phytochemicals. *Australian Journal of Botany* **60**, 676-684.

HUSSAIN MI, REIGOSA MJ & AL-DAKHEEL AJ (2015) Biochemical, physiological and isotopic responses to natural product *p*-hydroxybenzoic acid in Cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.). *Plant Growth Regulation* **75**, 783-792.

HUSSAIN MI, GONZÁLEZ L & REIGOSA MJ (2011) Allelopathic potential of *Acacia melanoxylon* R. Br. on the germination and root growth of native species. *Weed Biology & Management* **11**, 18 -28.

HUSSAIN MI & REIGOSA MJ (2017) Evaluation of photosynthetic performance and carbon isotope discrimination in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) under allelochemicals stress. *Ecotoxicology* **26**, 613-624.

LI L, LI SM, SU JH et al. (2007) Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 11192–11196.

LOPES M & ARAUS JL (2006) Nitrogen source and water regime effects on durum wheat photosynthesis, and stable carbon and nitrogen isotope composition. *Physiologia Plantarum* **126**, 435–445.

MACÍAS FA, OLIVEROS-BASTIDAS A, MARÍN D, CHINCHILLA N, CASTELLANO D & MOLINILLO JMG (2014) Evidence for an allelopathic interaction between rye and wild oats. *Journal of Agriculture & Food Chemistry* **62**, 9450–9457.

MASSALHA H, KORENBLUM E, THOLL D & AHARONI A (2017) Small molecules below-ground: the role of specialized metabolites in the rhizosphere. *The Plant Journal* **90**, 788-807.

ROBERTSON A, OVERPECK J, RIND D et al. (2001) Hypothesized climate forcing time series for the last 500 years. *Journal of Geophysical Research* **106**, 14783-14803.

ROBINSON D, HANDLEY LL, SCRIMGEOUR CM, GORDON DC, FORSTER BP & ELLIS RP (2000) Using stable isotope natural abundances ($\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$) to integrate the stress responses of wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Koch.) genotypes. *Journal of Experimental Botany* **51**, 41–50.

WAHEED A, QURESHI R, JAKHAR GS & TAREEN H (2009) Weed community dynamics in wheat crop of District Rahim Yar Khan, Pakistan. *Pakistan* Journal of *Botany* **41,** 247-254.

Plasticidad ecofisiológica de la mala hierba *Rumex acetosa* frente al estrés aleloquímico

Resumen: Algunos metabolitos secundarios, como el ácido ferúlico (FA) y el ácido p-hidroxibenzoico (pHBA), han demostrado poseer efectos inhibitorios sobre la germinación y el crecimiento de plántulas de lechuga y gramíneas perennes. Sin embargo, poco se sabe hasta la fecha sobre los mecanismos fisiológicos de acción de estos compuestos naturales en malezas de hoja ancha, como *Rumex acetosa*. Por ello, el objetivo de este estudio fue determinar la plasticidad de *Rumex acetosa*, en base a la composición foliar de isótopos de carbono y otros parámetros fisiológicos, frente a la interacción de los metabolitos secundarios vegetales (MSV) FA y pHBA, así como la utilidad de la discriminación de los isótopos de carbono ($\Delta^{13}C$) como un buen indicador del rendimiento funcional de la eficiencia intrínseca del uso del agua (iWUE) en la hoja. Para ello, plantas de *R. acetosa* se cultivaron en condiciones de invernadero y se sometieron a estrés por MSV (0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 mM) durante 6 días. Tal y como se encontró, FA y pHBA son inhibidores potentes de $\Delta^{13}C$, ya que varía del 21.0 ‰ al 22.9 ‰. A mayores concentraciones de pHBA y FA se aumentó / disminuyó el N foliar y se aumentó el C foliar. El ratio de la concentración de CO_2 entre la hoja y el aire (Ci / Ca) disminuyó, mientras que la iWUE aumentó. Estos resultados confirman la fitotoxicidad de FA y pHBA en plántulas de *R. acetosa*, y demuestran que $\Delta^{13}C$, Ci / Ca e iWUE pueden ser indicadores adecuados de la plasticidad fisiológica.

Palabras clave: compuestos fenólicos, estado fisiológico, herbicida natural, fitotoxicidad.

Ni el número ni el peso: la medida adecuada de la abundancia de semillas para el cálculo de índices de diversidad es intermedia

BASTIDA F [1], GONZÁLEZ-ANDÚJAR JL [2]

[1] Dept. Ciencias Agroforestales, Universidad de Huelva, Huelva, España. bastida@uhu.es
[2] Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Córdoba, España. andujar@ias.csic.es

Resumen: Las medidas de diversidad (p.e. índice de Shannon, media ponderada a nivel de comunidad de un carácter funcional o CWM, etc.) se basan en la abundancia relativa de las especies. Cuando las unidades de información son las semillas como, por ejemplo, en estudios de diversidad de malas hierbas en los bancos de semillas, en las "impurezas" presentes en el grano de cereal cosechado, etc., la forma más intuitiva de medir la abundancia de una especie *i* es el peso de las semillas, i.e. el número de semillas (n_i) multiplicado por el peso medio (w_i) de una semilla ($n_i.w_i^1$), o bien el número de semillas, que puede expresarse también como $n_i.w_i^0$. Sin embargo, estas medidas sobreestiman las especies que producen semillas muy grandes (peso) o las que producen muchas semillas (número), por lo que pueden imponer fuertes limitaciones al significado de las métricas de diversidad y a su uso en análisis posteriores. En esta contribución justificamos que existe un valor del exponente de *w* (*b*, $0<b<1$) que corrige estas limitaciones y que resulta de la relación de compensación (trade-off) que se observa en las plantas entre número y peso de las semillas. Utilizamos los resultados de un trabajo publicado para concretar este valor. De esta forma, las abundancias se expresan en una "moneda común" que permite comparar directamente las especies. A modo de ejemplo, utilizando datos propios correspondientes a un estudio sobre presencia de semillas de malas hierbas en la cosecha de cereal, analizamos las consecuencias de no corregir las abundancias en un análisis de respuesta de distintos caracteres funcionales (valores CWM) a diversos factores ambientales y de manejo agrícola.

Palabras clave: abundancia relativa, compensación tamaño-peso de las semillas, medidas de diversidad, semillas de malas hierbas

1. Introducción

Las medidas de diversidad biológica consideran la abundancia (dominancia o "importancia") relativa de las especies que forman la comunidad objeto de estudio. La valoración adecuada de la diversidad, capaz de detectar diferencias sutiles entre localidades

o muestras, depende no solo de la selección correcta de un índice de diversidad y de una escala de trabajo, sino también de una medida válida de la abundancia relativa de las especies (Guo & Rundel 1997). Un caso particular, de interés en Malherbología, se presenta cuando las unidades de información son las semillas, como en estudios de diversidad de los bancos de semillas o de las "impurezas" presentes en el grano de cereal cosechado. En estos casos, la abundancia de cada especie se mide usualmente como número de semillas o como peso total de las semillas, es decir, el número de semillas multiplicado por el peso medio de una semilla. Sin embargo, las diferencias de peso individual entre las semillas de las distintas especies, incluso a nivel únicamente de las plantas anuales, suelen alcanzar varios órdenes de magnitud (Shipley & Don 1992). Además, en las plantas el número y el peso individual de las semillas tienden a mostrar compensación (Shipley & Don 1992, Será & Serý 2004). Estas características sugieren que las dos medidas de abundancia relativa pueden originar sustanciales sesgos en la valoración de la dominancia de las especies, bien en favor de las que producen muchas semillas (abundancia medida por el número) o de las que presentan semillas muy pesadas (abundancia medida por el peso total).

En esta contribución proponemos una forma de medir la abundancia relativa basada en la relación de compensación entre número y peso de las semillas. Con esta medida, que denominamos biomasa corregida, se corrigen los sesgos asociados al uso del número o el peso total de las semillas. Utilizamos datos propios de un estudio de presencia de semillas de malas hierbas en el grano de cereal recién cosechado para ilustrar la medida propuesta en comparación con las dos medidas de abundancia usuales.

2. Material y Métodos

Recurrimos al trabajo de Será y Serý (2004) que estudia la relación entre el número y el peso individual de las semillas en un conjunto de c. 500 especies de plantas herbáceas centroeuropeas que abarcan 5 órdenes de magnitud en peso individual de las semillas. Frente a otros estudios alométricos que se centran en la relación número-peso a nivel de planta o tallo individual (p.e. Shipley & Dion 1992), el citado trabajo sigue una aproximación poblacional, más conveniente para nuestro propósito. En concreto, los autores miden para cada especie el número de semillas producidas y la cobertura generada por el conjunto de plantas presentes en 1 m^2 en una población representativa, y determinan el peso medio por semilla. Finalmente, extrapolan el número de semillas producidas a la situación de cobertura 100%, denominando a esta variable Capacidad Reproductiva de la Población (*RCP*, Reproductive Capacity of Population). Un análisis de regresión lineal estándar de eje principal (sma), i.e. log(*RCP*) vs. log(*w*), mostró una correlación altamente significativa y estrecha entre ambas variables a varios niveles (especies, familias, etc.), indicando la existencia de una compensación número-peso de las semillas de la forma usual

$$RCP_i = K.w_i^{-b} \qquad \text{Ec. 1}$$

donde K es un parámetro de carga (e^a, donde a es el intercepto la regresión sma) y b ($0<b<1$) es la constante alométrica. La ecuación 1 indica que la máxima densidad de semillas que puede producir la población de una especie i escala negativamente con el peso individual de la semilla. La población de una especie de semillas grandes siempre producirá menor densidad de semillas que la de una especie de semillas más pequeñas. Nótese que solo K es dependiente de las condiciones particulares de definición de la producción de semillas (1 m^2, 100% cobertura). Por tanto, la ecuación 1 puede utilizarse para convertir las abundancias del conjunto de especies de una comunidad de semillas a una "moneda común" que posibilite establecer correctamente las relaciones de dominancia-diversidad. Para ello, basta considerar que la abundancia de una especie puede expresarse de modo más conveniente como el número de semillas presente en una muestra en relación al máximo número posible para la especie, que está condicionado por el peso individual de sus semillas. Es decir, utilizando la ecuación 1,

$$abundancia_i \propto \frac{n_i}{K.w_i^{-b}} \qquad \text{Ec. 2}$$

donde el símbolo $\propto$ indica "proporcional a" y n_i es el número de semillas de la especie i. Si admitimos que K es verdaderamente una constante, este término en la ecuación 2 resulta irrelevante a efectos de comparar las abundancias de las especies, desapareciendo al determinar la abundancia relativa de una especie i (p_i) en el conjunto de especies S (j: 1 a S) de una comunidad:

$$p_i = \frac{\frac{n_i}{K.w_i^{-b}}}{\sum_j \frac{n_j}{K.w_j^{-b}}} = \frac{n_i.w_i^b}{\sum_j n_j.w_j^b} \qquad \text{Ec. 3}$$

Por tanto, el término $n_i.w_i^b$ en la ecuación 3 representa la medida óptima de abundancia de las semillas de una especie i, que aquí denominamos biomasa corregida. En lo que sigue utilizamos el valor de b estimado para el conjunto de especies analizadas por Será y Serý (2004), b=0,653. Nótese que la solución encontrada ($n_i.w_i^{0,653}$) se sitúa entre los extremos definidos sólo por el número de semillas ($n_i.w_i^0$) y sólo por la masa de las semillas ($n_i.w_i^1$).

En la situación de equitatividad en términos de biomasa corregida, la proporción de semillas de una especie i en el conjunto de semillas de una comunidad de S especies es, a partir de la ecuación 1:

$$p_i = \frac{w_i^{-b}}{\sum_j w_j^{-b}} \qquad \text{Ec. 4}$$

3. Resultados y Discusión

A título ilustrativo, la Figura 1 muestra cómo la situación de equitatividad varía ampliamente en función de la medida de la abundancia de las semillas. La equitatividad en número supone concentrar el peso en la especie con semillas más pesadas (Fig. 1a). La equitatividad en peso concentra el número en la especie con semillas menos pesadas (Fig. 1b). La equitatividad basada en la biomasa corregida supone una situación intermedia (Fig. 1c).

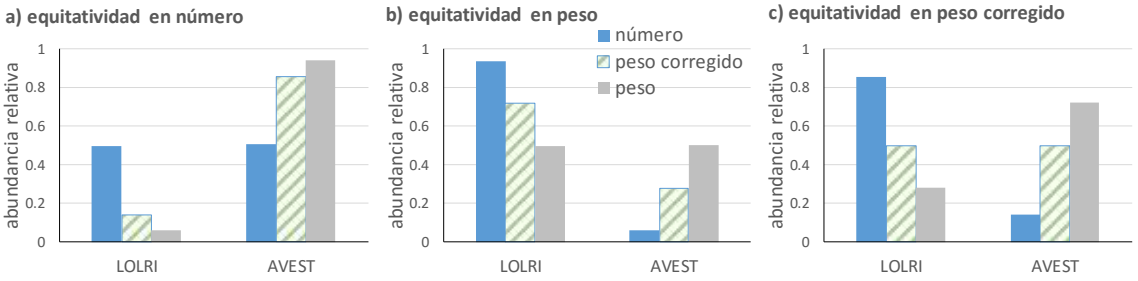


Figura 1. Diferentes conceptos de equitatividad según la medida de abundancia de las semillas: a) número, b) peso total, c) peso corregido. Se consideran dos especies de malas hierbas que muestran un peso medio de las semillas muy diferente: *Lolium rigidum* (LOLRI, 3,8 mg) y *Avena sterilis* subsp. *sterilis* (AVEST, 59,2 mg).

Utilizando datos propios de un estudio de abundancia de semillas de malas hierbas en el grano de cereal cosechado en 2017 en Andalucía occidental, basado en un muestreo de la cosecha procedente de 182 campos, analizamos cómo varía el orden de dominancia del conjunto de especies de malas hierbas registradas en función del método de medida de la abundancia. Como muestra la Tabla 1, referida a las 30 primeras especies en orden de dominancia según cada criterio, cuando se usa el peso corregido muchas especies muestran una posición intermedia respecto a los criterios de número y peso total. Sin embargo, algunas especies ganan posiciones en la escala de dominancia respecto a cualquiera de estos dos criterios.

La Tabla 2 muestra la influencia del método de medida de la abundancia en el resultado de modelos lineales que testan el efecto de distintas variables ambientales sobre los valores medios ponderados (CWM) de las comunidades de semillas acompañantes de la cosecha de cereal (CWM) en el estudio anteriormente indicado. Como se observa, los modelos resultantes no son siempre equivalentes. Las diferencias podrían haber sido más

sustanciales si las 4-5 especies claramente dominantes en el conjunto de datos analizado (Tabla 1) hubiesen mostrado tamaños de semilla más extremos.

Tabla 1. Efecto de la medida de abundancia de las semillas en el orden de dominancia de las especies. En muchos casos la medida propuesta (peso corregido) sitúa a las especies en una posición intermedia con respecto a las abundancias basadas en número o peso (ejemplos en azul). En otros casos, la posición no es intermedia (rojo). Los datos corresponden a un estudio propio no publicado sobre presencia de semillas de malas hierbas en la cosecha de cereal en Andalucía occidental. Sólo se indican las primeras 30 especies (acrónimos) en orden de dominancia según cada criterio de abundancia.

	número		peso		peso corregido
1	LOLRI	1	LOLRI	1	LOLRI
2	POLAV	2	CHRCO	2	CHRCO
3	CHRCO	3	POLAV	3	POLAV
4	PHAMI	4	CONAR	4	PHAMI
5	CENDI	5	PHAMI	5	CONAR
6	CONAR	6	AVEST	6	CENDI
7	PHABR	7	CULAM	7	CULAM
8	PAPRO	8	CENDI	8	PHABR
9	PICEC	9	PHABR	9	AVEST
10	PHAPA	10	MALPA	10	PHAPA
11	SILST	11	HELAN	11	SINAR
12	SINAR	12	PHAPA	12	PICEC
13	GALPA	13	SINAR	13	MALPA
14	CHEAL	14	LAVCR	14	LAVCR
15	SILGA	15	BETVU	15	RAPRU
16	CULAM	16	PICEC	16	CHRSE
17	ANAAR	17	RAPRU	17	SILST
18	CHRSE	18	GALTR	18	GALTR
19	MALPA	19	RAPRA	19	BETVU
20	RAPRU	20	CHRSE	20	HELAN
21	LAVCR	21	SCOSU	21	CHEAL
22	CUSCA	22	SILST	22	RAPRA
23	AVEST	23	VACHI	23	PAPRO
24	CHAMI	24	CHEAL	24	SILGA
25	PLAAF	25	ANAAR	25	ANAAR
26	GALTR	26	SILGA	26	SCOSU
27	PIPMI	27	ECHPL	27	VACHI
28	ANTCO	28	LEGNI	28	GALPA
29	DESRI	29	SORHA	29	CUSCA
30	BETVU	30	PAPRO	30	ECHPL

Tabla 2. Términos significativos de modelos lineales de regresión que testan el efecto del tamaño de la parcela, la fecha de cosecha (F), la distancia de la parcela a un hábitat no agrícola (D) y la longitud geográfica (L) sobre los valores medios ponderados (CWM), calculados según tres formas de medir la abundancia, de distintos caracteres funcionales de las semillas presentes en la cosecha de cereal en Andalucía occidental (datos no publicados). Además de las variables indicadas, todos los modelos incluyeron los dos primeros ejes de un análisis NMDS y su interacción para controlar por la composición en especies. El efecto de al menos un eje NMDS fue siempre significativo excepto cuando se indica "ns". "no": sin efectos de las variables ambientales testadas. Entre paréntesis se indica R^2.

CWM	**criterio de abundancia**		
	número	**peso**	**peso corregido**
peso semillas	no	D* (0,14)	D* (0,13)
altura plantas	F* (0,14)	no	F* (0,19)
inicio floración	F*, F:L** (0,23)	F^{ms}, F:L** (0,24)	F*, F:L** (0,25)
duración floración	no (ns)	D** (0,13)	D* (0,08)
afinidad nutrientes (Ellenberg)	no	no	no

**: 0,001<p<0,01; *: 0,01<p<0,05; ms: 0,10<p<0,05

La propuesta que hacemos requiere aceptar que el parámetro de carga *K* (Ec. 1) es verdaderamente una constante. Sin embargo, esta condición podría no cumplirse si las

comunidades que se comparan difieren en afinidades filogenéticas (Será & Serý 2004) o ecológicas (Shipley & Don 1992). Estudios sobre compensación número-peso de las semillas para la flora arvense asociada a sistemas de cultivo o entornos climáticos concretos podrían servir para definir específicamente el valor de la constante alométrica *b*.

Referencias

GUO Q & RUNDEL PW (1997) Measuring dominance and diversity in ecological communities: choosing the right variables. *Journal of Vegetation Science* **8**, 405–408.

SERÁ B & SERÝ M (2004) Number and weight of seeds and reproductive strategies of herbaceous plants. *Folia Geobotanica* **39**, 27–40.

SHIPLEY B & DION J (1992) The allometry of seed production in herbaceous Angiosperms. *The American Naturalist* **139**, 467–483.

Neither numbers nor weight: the appropriate measure of seed abundance for calculating diversity indices is in between

Summary: Diversity measures (e.g. Shannon index, community-weighted mean values of functional traits, etc.) are based on relative species abundances. When seeds are the information units as, for instance, in studying weed diversity in the soil seed bank or in the "impurities" in harvested cereal grain, the most intuitive measures of abundance of a species *i* are either the total seed weight, i.e. the number of seeds (n_i) multiplied by the mean weight (w_i) of a seed ($n_i.w_i^1$), or directly seed number, which can also be expressed as $n_i.w_i^0$. However, these measures tend to overestimate heavy-seeded species (weight) or species producing large amounts of seeds (number) and thus, they can severely limit the significance of diversity metrics or their use in subsequent analyses. In this contribution we argue that these limitations can be overcome through the use of an appropriate exponent of *w* (*b*, $0<b<1$) which takes into account the trade-off observed in plants between seed numbers and weight. We used published literature to specify this value. In this way, abundances are expressed in a "common currency" allowing direct species comparison. As an example, using an unpublished dataset on the identity and abundance of weed seeds present in recently harvested cereal grain, we analysed the consequences of not correcting seed abundances when testing responses of different functional traits (CWM values) to environmental and management factors.

Keywords: diversity measures, relative abundance, seed size-numbers trade-off, weed seeds.

Las semillas de malas hierbas acompañantes de la cosecha de cereal muestran respuesta funcional a los factores ambientales y de manejo agrícola

BARBA-RODRÍGUEZ A [1], GONZÁLEZ-ANDÚJAR JL [2], BASTIDA F [1]

[1] Dept. Ciencias Agroforestales, Universidad de Huelva, Huelva, España. bastida@uhu.es
[2] Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Córdoba, España. andujar@ias.csic.es

Resumen: Se cuantificaron e identificaron las semillas de malas hierbas presentes en muestras de 200 g de las cosechas de cereal (trigo duro, trigo blando y triticale) obtenidas en 2017 en 182 parcelas de cultivo convencional, distribuidas en 20 términos municipales de las campiñas de Huelva y del occidente de Sevilla. Se identificaron 68 especies pertenecientes a 19 familias de angiospermas. Las especies más frecuentes y abundantes fueron *Polygonum aviculare* (73%, 3558 semillas), *Phalaris minor* (47%, 1476 semillas), *Chrysanthemum coronarium* (46%, 2369 semillas) y *Lolium rigidum* (36%, 6165 semillas). La mayoría de muestras (59%) registró entre 11 y 100 semillas y el valor máximo de abundancia fue de 4215 semillas. En términos de riqueza en especies, la mayoría de muestras analizadas (43%) presentó 4-6 especies, aunque un 6% registró al menos 10. Se analizó mediante modelos lineales el efecto de los factores ambientales (clima, evaluado por la longitud geográfica) y de uso agrícola (fecha de recolección, tamaño de la parcela, distancia de la parcela a un hábitat no agrícola) en los valores medios ponderados a nivel de comunidad (CWM) de diversos caracteres con significación funcional: altura de las plantas, peso de las semillas, inicio y duración de la floración, representación de dicotiledóneas y afinidad por los nutrientes (valores indicadores de Ellenberg para el N). La mayoría de los caracteres respondió a alguno de los factores analizados, indicando que las semillas de malas hierbas que acompañan al grano cosechado llevan la firma de la respuesta funcional de las comunidades arvenses a los filtros ambientales y de manejo.

Palabras clave: cosecha de cereal, diversidad funcional, plantas segetales, semillas de malas hierbas

1. Introducción

Los estudios disponibles sobre presencia de semillas de malas hierbas en la cosecha de cereal señalan que, aún bajo las condiciones de manejo intensificado asociado al cultivo

convencional, el grano recién cosechado está acompañando de una notable abundancia y diversidad de estas semillas (Kuc et al. 2003, Domínguez-Borrero et al. 2015). Para poder incorporarse a la cosecha en la forma de semillas, las especies de malas hierbas deben reunir atributos de altura de los frutos en las plantas y de fenología de la fructificación y dispersión que posibiliten la recolección conjunta de sus semillas con el grano de cereal durante la operación de las cosechadoras. Sin embargo, este proceso de filtrado de especies y de caracteres impuesto por la operación de cosecha ocurre después de la acción de los filtros ambientales (p.e. clima) y de manejo agrícola (operaciones de cultivo, fisionomía de las parcelas, paisaje circundante) que determinan la comunidad de plantas asociada a una parcela de cultivo. Estos procesos seleccionan las especies en función de sus caracteres funcionales (Fried et al. 2012).

Este trabajo, que amplía un estudio previo sobre presencia de semillas de malas hierbas en la cosecha de cereal procedente de cultivo convencional en Andalucía occidental (Domínguez-Borrero et al. 2015), tuvo como objetivos: a) conocer la abundancia e identidad de las semillas acompañantes del grano recolectado, y b) testar la hipótesis de que las semillas presentes en la cosecha incorporan la huella funcional de respuesta de las comunidades de malas hierbas del cereal a los filtros ambientales y de manejo.

2. Material y Métodos

Se contó con 182 muestras de aproximadamente 1 kg de la cosecha de cereal del año 2017, facilitadas por la Cooperativa Campo de Tejada (Escacena del Campo, Huelva). Cada muestra procedió de una parcela. Las parcelas de origen de las muestras se distribuyen en 20 municipios de las campiñas onubense y occidental de Sevilla. Para separar las semillas del grano se siguió un método de tamizado puesto a punto con anterioridad (Domínguez-Borrero et al. 2015). En resumen, se obtuvieron submuestras de 200 g (en adelante muestras) y se tamizaron utilizando una serie de tamices dispuestos en un agitador mecánico. En cada fracción se aislaron y cuantificaron las semillas presentes y se identificaron utilizando material de herbario y descripciones en floras.

Para analizar la existencia de una huella funcional impuesta por los procesos de filtrado ambiental y de manejo, se seleccionaron diferentes caracteres funcionales de conocida respuesta a estos procesos: peso de las semillas, altura de las plantas, inicio y duración de la floración, representación de dicotiledóneas y afinidad por los nutrientes (valores indicadores de Ellenberg para el N). Los datos se obtuvieron de floras, trabajos publicados y bases de datos. En el caso de especies concretas, no recogidas en las referencias indicadas, el peso de las semillas se determinó directamente en laboratorio. Las variables de uso agrícola seleccionadas fueron el tamaño de la parcela, la distancia de la parcela a un hábitat no agrícola y la fecha de recolección. La longitud geográfica se usó como variable

de aproximación a las condiciones climáticas ya que mostró correlación alta ($|r|>0,58$) con distintas variables climáticas.

Se utilizaron modelos lineales para analizar la respuesta de cada carácter funcional (valores CWM) a las variables seleccionadas. La abundancia de las especies en las muestras se midió como peso de las semillas corregido atendiendo a la relación de compensación que existe en las plantas entre peso y número de las semillas (véase contribución a este congreso por FB y JLGA). En cada caso se definió un modelo inicial que incluyó los efectos principales e interacciones por pares de las variables indicadas, así como los dos primeros ejes de un análisis NMDS (NMDS1, NMDS2) y su interacción, para incorporar las diferencias entre muestras en composición en especies, que indican factores ambientales no considerados (p.e. suelo) o afinidades filogenéticas. Inicialmente se utilizaron modelos de mínimos cuadrados generalizados para testar diferentes estructuras de la matriz de varianzas-covarianzas con objeto de considerar la autocorrelación espacial. El modelo completo final se seleccionó de acuerdo con el Criterio de Información de Akaike corregido para muestras pequeñas (AICc). En todos los casos, el modelo no espacial ofreció el menor valor AICc, por lo que se procedió a utilizar regresión lineal. Para cada variable explicada se compararon todos los modelos posibles que incluyeron uno o más términos del modelo inicial en todas las combinaciones posibles, además de NMDS1 y NMDS2 y su interacción, seleccionándose el mejor modelo de acuerdo con el valor AICc. Este modelo solo se aceptó si entre los modelos similares ($\Delta AICc \leq 2$) no estuvo incluido un modelo con sólo términos NMDS. Los análisis se realizaron en R (R Core Team, 2017).

3. Resultados y Discusión

En el conjunto de muestras se identificaron semillas de 68 especies de malas hierbas pertenecientes a 19 familias de Angiospermas. De entre estas especies, 26 alcanzaron una frecuencia de al menos el 3% (Tabla 1). La especie más frecuente fue *Polygonum aviculare* (73% de las muestras). Otras siete especies alcanzaron una frecuencia de al menos el 25%, *Phalaris minor* (47%), *Chrysanthemum coronarium* (46%), *Lolium rigidum* (36%), *Convolvulus arvensis* (34%), *Ph. brachystachys* (27%), *Ph. paradoxa* (25%) y *Centaurea diluta* (25%) (Tabla 1). En términos de abundancia total, las especies que registraron mayor número de semillas en el conjunto de muestras fueron *L. rigidum* (6165 semillas), *P. aviculare* (3558), *C. coronarium* (2369) y *Ph. minor* (1476) (Tabla 1). En comparación con el resto de especies, estos valores estuvieron muy por encima de lo esperado en situación de equitatividad (datos no mostrados), indicando que estas cuatro especies son favorecidas por el sistema de cultivo. Se trata de malas hierbas que presentan dispersión lenta (*L. rigidum*, *C. coronarium*) o fructificación tardía (*P. aviculare*, *Ph. minor*), lo que favorece la presencia de sus semillas en la cosecha.

Tabla 1. Especies de malas hierbas representadas con frecuencia de al menos el 3% en las muestras analizadas. Se indica el acrónimo, la frecuencia de presencia y la abundancia total.

Especie	Acrónimo	Frecuencia	Abundancia (núm. total de semillas)
Polygonum aviculare L./*P. bellardii* All.	POLAV	0,73	3558
Phalaris minor Retz.	PHAMI	0,47	1476
Chrysanthemum coronarium L.	CHRCO	0,46	2369
Lolium rigidum Gaudin	LOLRI	0,36	6165
Convolvulus arvensis L.	CONAR	0,34	406
Phalaris brachystachys Link.	PHABR	0,27	273
Phalaris paradoxa L.	PHAPA	0,25	190
Centaurea diluta Aiton.	CENDI	0,25	409
Chenopodium album L.	CHEAL	0,20	134
Papaver rhoeas L.	PAPRO	0,20	272
Anagallis arvensis L.	ANAAR	0,18	93
Picris echioides L.	PICEC	0,14	256
Silene stricta L.	SILST	0,13	181
Silene gallica L.	SILGA	0,12	133
Lavatera cretica L.	LAVCR	0,09	45
Chrysanthemum segetum L.	CHRSE	0,08	92
Sinapis arvensis L.	SINAR	0,08	177
Galium tricornutum Dandy	GALTR	0,06	24
Piptatherum miliaceum (L.) Cosson	PIPMI	0,05	23
Avena sterilis L.	AVEST	0,04	35
Rapistrum rugosum (L.) All.	RAPRU	0,04	70
Glaucium corniculatum (L.) Rudolph	GLACO	0,04	7
Malva parviflora L.	MALPA	0,04	75
Vaccaria hispanica (Miller) Rauscher.	VACHI	0,04	15
Beta vulgaris L.	BETVU	0,03	16
Echium plantagineum L.	ECHPL	0,03	14

El número de especies por muestra osciló entre 0 (7 casos) y 13 (1 caso). La mayoría de las muestras (43%) registró entre 4 y 6 especies, aunque un 6% alcanzó al menos 10 especies (Figura 1a). En términos de número total de semillas por muestra, la mayoría de las muestras (59%) presentó entre 11 y 100 semillas, un 18% contuvo entre 101 y 1000 semillas y un 1% superó esta última cantidad, con un valor máximo de 4125 semillas. Sólo en un 4% de las muestras no se detectaron semillas de malas hierbas (Figura 1b).

La Tabla 2 muestra los efectos significativos de las variables ambientales y de uso agrícola sobre los caracteres funcionales analizados (valores CWM). Los modelos para la variable CWM-representación de dicotiledóneas no mostraron normalidad de errores bajo ninguna transformación por lo que no pudieron ser ajustados. Para las restantes variables, los análisis indican que al aumentar la distancia de la parcela a un hábitat no agrícola (p.e. entorno urbano, hábitat seminatural) disminuye el peso de las semillas y la duración de la floración de las comunidades de malas hierbas representadas en la cosecha, mientras que al retrasarse la fecha de recolección se produce un progresivo aumento de la representación en

la cosecha de especies de mayor altura y de inicio de floración más tardío, en este último caso con mayor intensidad hacia el este (Tabla 2).

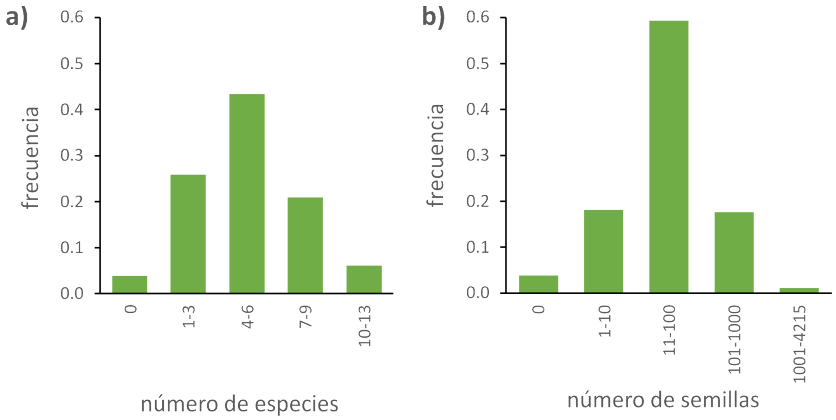


Figura 1. Distribución de frecuencia de las muestras de cosecha de cereal analizadas según: a) riqueza en especies, b) contenido en semillas de malas hierbas.

En concordancia con los resultados de nuestro estudio previo (Domínguez-Borrero et al. 2015), este trabajo confirma que el cultivo convencional de cereal en Andalucía occidental resulta en la incorporación al grano cosechado de abundantes semillas de malas hierbas, con una notoria riqueza total en especies. La fecha de recolección y el contexto paisajístico de la parcela (distancia a hábitats no agrícolas) condicionaron la representación de estas especies en la cosecha a través de un efecto selectivo de caracteres funcionales.

Tabla 2. Términos significativos de los modelos lineales seleccionados que testan el efecto de variables ambientales y de uso agrícola sobre distintos caracteres funcionales (valores CWM) de las semillas presentes en la cosecha de cereal. Todos los modelos incluyeron además los dos primeros ejes de un análisis NMDS y su interacción, para controlar por la composición en especies. El efecto de al menos un eje NMDS fue siempre significativo. Se indican los valores R^2 ajustados de cada modelo. Todas las variables fueron centradas.

término	peso semillas[(1)] (mg)	altura plantas[(1)] (cm)	inicio floración[(2)] (mes)	duración floración[(2)] (meses)	afinidad N (val. Ellenberg)
intercepto	0,70358***	0,99000***	0,33362***	0,49747***	3,25339***
área parcela (ha, raíz cuadrada)					
distancia a hábitat no agrícola (km)	-0,01804*			-0,01697*	
fecha cosecha (días)		0,00006*	0,00265*		
longitud geográfica (UTM, km)					
fecha cosecha x longitud			0,00035***		
R^2 aj.	0,13	0,19	0,25	0,08	0,07

Transformación de variables: (1) box-cox de parámetro λ=-1 (i.e. recíproco), (2) logaritmo natural; *: 0,01<p<0,05, ***: p<0,001

4. Agradecimientos

El primer autor recibió una beca de la SEMh. Agradecemos a Antonio Tomás, director técnico de la Cooperativa Campo de Tejada, su continuada colaboración.

Referencias

DOMÍNGUEZ-BORRERO MD, GARCÍA-REGAL L, GONZÁLEZ-ANDÚJAR JL & BASTIDA F (2015) Diversidad y abundancia de semillas de malas hierbas en la cosecha de cereal en la Baja Andalucía occidental. In: Actas 2015 del *XV Congreso de la Sociedad Española de Malherbología* (eds R Alarcón Roldán et al.)(19-22 octubre, Sevilla, España). 325-331. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Sevilla, España.

FRIED G, KAZAKOU E & GABA S (2012) Trajectories of weed communities explained by traits associated with species' response to management practices. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **158**, 147–155.

KUC A, CONESA JA & RECASENS J (2003) Identificación de semillas de malas hierbas en granos de trigo tras la cosecha. In: Actas 2003 del *IX Congreso de la Sociedad Española de Malherbología* (coord MT Mas & AMC Verdú)(4-6 noviembre, Barcelona, España). 123-127. UPC, Servei de Comunicació Institucional, Barcelona, España.

R CORE TEAM. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/.

The weed seeds accompanying harvested cereal grain exhibit a functional response to environmental and management factors

Summary: We quantified and identified the weed seeds present in 200 g samples of cereal grain (durum wheat, bread wheat and triticale) harvested in 2017 in 182 conventionally-managed fields distributed in 20 municipalities of the cereal areas of Huelva and Seville provinces, in south-western Spain. We identified 68 species from 19 families of flowering plants. The most frequent and abundant species were *Polygonum aviculare* (73%, 3558 seeds), *Phalaris minor* (47%, 1476 seeds), *Chrysanthemum coronarium* (46%, 2369 seeds) and *Lolium rigidum* (36%, 6165 seeds). Most of the samples (59%) exhibited 11-100 weed seeds and the highest abundance recorded was 4215 seeds. In terms of species richness, most of the analyzed samples (43%) showed 4-6 species, although 6% of the samples exhibited at least 10. Linear models were used to test for effects of environmental (climate, using geographical longitude as a proxy) and agricultural factors (harvest date, field size, distance to the nearest non-agricultural habitat) in community-weighted mean values (CWM) of different functional traits: plant height, seed weight, onset and extent of flowering, representation of forbs and nutrient affinity (Ellenberg's indicator values for N). Most of the traits were responsive to some of the analyzed factors, thus indicating that the weed seeds accompanying harvested cereal grain exhibit the fingerprint of the functional response of cereal weed communities to environmental and management filters.

Keywords: arable weeds, cereal harvest, functional diversity, weed seeds.

Análisis funcional de la comunidad arvense presente en un viñedo mediterráneo según el sistema de manejo

GUERRA JG[12], CABELLO F[2], MARTÍN JM[1], CAMPOS D[1], FERNÁNDEZ-QUINTANILLA C[1], DORADO J[1]

[1] Instituto de Ciencias Agrarias (CSIC), Madrid, España
[2] Instituto Madrileño de Inv. y Des. Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA), Madrid, España
jose.garcia.guerra@madrid.org

Resumen: Durante el periodo 2016-2018, se realizaron muestreos de la flora arvense presente en un viñedo localizado en la finca experimental del IMIDRA El Socorro (Colmenar de Oreja, Madrid). La parcela experimental tenía un diseño en bloques al azar con 4 repeticiones, que incluían 4 sistemas de manejo diferentes: *i*) Intensivo, calles labradas y líneas tratadas con herbicida; *ii*) Eco_Till, calles labradas y líneas con intercepa; *iii*) Low_input, calles con cubierta vegetal y líneas tratadas con herbicida; y *iv*) Eco_cover, calles con cubierta vegetal y líneas con labor de desbrozadora. En base a los resultados obtenidos, se han podido establecer diferentes relaciones entre factores ambientales asociados a cada sistema de manejo y la composición de la comunidad arvense, así como las características funcionales que permiten a la flora arvense adaptarse a estos factores.

Palabras clave: Viñedo, laboreo, cubierta vegetal, flora arvense, rasgos funcionales

1. Introducción

La flora arvense presente en agrosistemas está condicionada por diferentes factores que alteran su composición (Borgy et al., 2016). Entre estos factores, destaca el manejo del suelo, existiendo una fuerte relación entre prácticas como el laboreo (Armengot et al., 2016), la aplicación de herbicidas (Grundy et al., 2011) o el riego (Juárez-Escario et al., 2017) y la composición de estas comunidades arvenses. Una característica que define a los agrosistemas es que están sometidos a frecuentes perturbaciones. La capacidad de las diferentes especies vegetales para adaptarse a dichas perturbaciones viene dada por una serie de rasgos funcionales que les permiten establecerse, sobrevivir y reproducirse en cada agrosistema (Garnier & Navas, 2012). En los últimos años, son varios los autores que han estudiado la relación entre estos rasgos funcionales con diferentes prácticas agrícolas (Colbach et al., 2014). Recientemente se ha abordado desde un enfoque similar la relación entre prácticas agrícolas y malas hierbas en viña (MacLaren et al., 2019).

En 2010 se estableció un experimento en la Finca Experimental del IMIDRA "El Socorro" (Colmenar de Oreja, Madrid) para evaluar la influencia de diferentes sistemas de manejo (a partir de ahora, SM) sobre la flora arvense y la productividad del viñedo en la zona centro de España (Dorado et al., 2017). En el trabajo actual, localizado en la misma parcela experimental, examinamos la relación entre las perturbaciones asociadas a cada uno de estos SM y la flora arvense.

2. Material y Métodos

El presente estudio se llevó a cabo sobre un viñedo de 6700 m^2 variedad Tempranillo (clon 771/patrón 110R), cultivado en espaldera de formación en Cordón Royat, con un marco de plantación de 2 m × 1,1 m y riego por goteo en la línea de cultivo. El diseño experimental, de bloques al azar con 4 repeticiones, incluye 4 SM (cada SM ocupa 3 calles de 50 m en cada bloque) con los siguientes sistemas de gestión del suelo: S1) Intensivo, calles labradas (hasta tres pases de cultivador a lo largo del ciclo vegetativo del viñedo) y líneas tratadas con herbicida (glifosato); S2) Eco_Till, laboreo (cultivador) en las calles y laboreo (intercepa) en las líneas; S4) Low_input, cubierta vegetal (vegetación espontánea manejada pases de segadora) en las calles y herbicida (glifosato) en las líneas; y S5) Eco_cover, calles con cubierta vegetal (igual que en S4) y líneas con pase de desbrozadora (tournesol).

Distinguimos 8 unidades ambientales diferentes en nuestro viñedo experimental (Figura 1), que vienen definidas por el método de control de malas hierbas empleado en cada una de ellas (herbicida, laboreo y siega) y la posición (calle o línea).

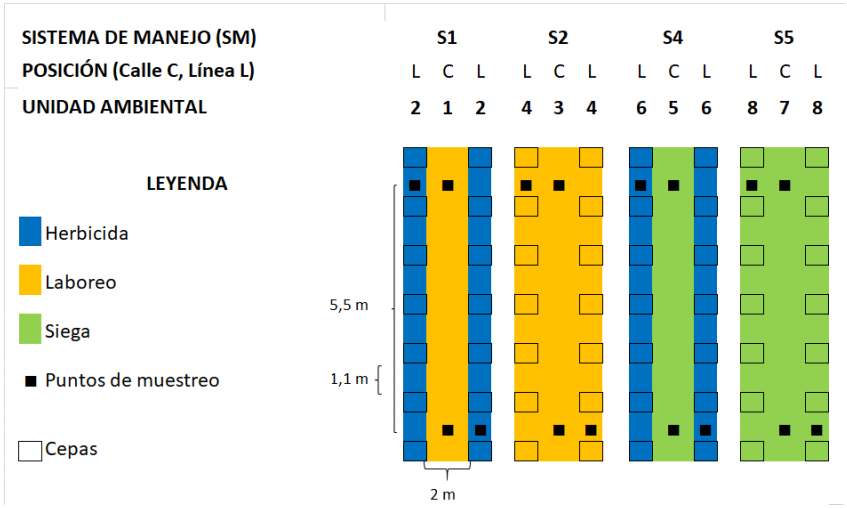


Figura 1. Esquema de los 4 sistemas de manejo y las 8 unidades ambientales definidas según la combinación entre sistemas de manejo y posición en la parcela experimental

En cada uno de los 16 subplots (4 bloques × 4 SM) se fijaron 12 puntos de muestreo (6 en calle y 6 en línea) cada 5,5 m, tal y como se representa en la Figura 1. En cada punto de muestreo (marcos de 33 × 66 cm) se identificaron las especies arvenses presentes y se estimó el porcentaje de cobertura dentro del marco para cada una de ellas así como el porcentaje de cobertura total. Los muestreos se realizaron en 2016-2018, durante la

primera quincena de mayo, coincidiendo con el momento del año en el que el viñedo presentaba mayor número de especies vegetales e inmediatamente antes de las labores anuales de control de malas hierbas.

Los datos de cobertura vegetal de cada especie, cobertura total y riqueza fueron analizados estadísticamente para cada una de las unidades ambientales definidas, analizando conjuntamente los datos de los tres años estudiados. Los datos de cobertura específica, al no ajustarse a una distribución normal, se analizaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Las variable "cobertura total" y "riqueza" se analizaron mediante el Modelo Lineal General Univariante y la prueba de comparación múltiple post hoc de Tukey. Se ha realizado una clasificación de las diferentes especies estudiadas mediante un árbol de decisiones (Vayssières et al. 2000), analizando la respuesta de la variable "porcentaje de cobertura de cada especie" ante la ausencia o presencia de perturbaciones laboreo (T), herbicida (H) o siega (S), y la posición calle (C) o línea (L). Se ha construido una tabla con diferentes características funcionales a partir de los datos extraídos de la base de datos *Plant Try DataBase* (Kattge et al., 2011)

3. Resultados y Discusión

En este estudio se han identificado un total de 54 especies vegetales, de las cuales 25 mostraron diferencias significativas según el porcentaje de cobertura ocupada en cada unidad ambiental. En la Tabla 1 se muestran aquellas especies para las que se ha encontrado una respuesta más significativa.

Los espacios manejados mediante siega (unidades ambientales 5,7 y 8) mostraron una cobertura total y una riqueza significativamente mayor que el resto, con un porcentaje de cobertura cercano al 100% en las calles segadas. Para cada una de estos 25 taxones se ha medido además la respuesta ante las distintas perturbaciones estudiadas, encontrando que la principal perturbación que configuró la comunidad arvense fue la aplicación de siega en lugar de laboreo (S+), con una respuesta positiva ante la siega en 13 de las 25 especies.

En la Tabla 2 se recogen las especies más representativas según su respuesta ante dichas perturbaciones y la posición dentro del cultivo, junto a algunos de los rasgos funcionales más importantes de cara a su adaptación a dichas unidades ambientales. Por ejemplo, las especies que se ven favorecidas por la siega (S+, i.e. *Medicago minima* L.) coinciden en su mayoría con taxones de porte pequeño, con un banco de semillas transitorio, con una duración en la mayoría de las referencias inferior a un año, siendo estas semillas por lo general de poco peso. Por el contrario, las especies favorecidas por el laboreo (T+, i.e. *Lamium amplexicaule* L.) presentan un banco de semillas persistente en la mayoría de las referencias obtenidas. En este sentido, existen referencias que indican que el laboreo favorece a taxones con banco de semillas más persistentes y capaces de germinar a mayor profundidad, en detrimento de especies con bancos de semillas más superficiales y transitorios (Ghersa & Martínez-Ghersa, 2000).

Tabla 1 Promedio para el periodo 2016-2018 (± desviación estándar σ) del porcentaje de cobertura de las especies más representativas, cobertura total y riqueza según unidades ambientales

	Unidades ambientales[1]															
Taxón	**1**		**2**		**3**		**4**		**5**		**6**		**7**		**8**	
		σ		σ		σ		σ		σ		σ		σ		σ
Astragalus hamosus	0,0a	0,0	0,1a	0,7	0,0a	0,0	0,0a	0,0	**4,8b**	7,6	2,8ab	5,0	**5,3b**	7,9	**3,4b**	6,4
Bromus madritensis	0,7a	3,0	**14,0b**	11,9	3,1a	3,5	2,9a	5,5	10,7b	17,8	**20,5c**	10,7	**15,0bc**	12,0	**13,4b**	9,9
Carduus borgeanus	0,0a	0,0	**3,2b**	7,4	0,4a	1,7	0,0a	0,0	0,0a	0,0	0,6a	2,7	0,0a	0,0	0,4a	1,7
Convolvulus arvensis	1,2ab	2,8	**3,7bc**	5,5	1,3ab	2,4	**3,6bc**	5,4	0,7a	2,3	**6,0c**	5,5	1,1ab	2,3	**4,5c**	6,8
Diplotaxis erucoides	1,2a	3,1	**5,7c**	9,2	0,7a	1,7	**3,1bc**	5,7	0,5a	1,2	0,5a	3,0	1,5a	3,4	2,4a	3,5
Fumaria officinalis	**1,0bc**	2,7	0,2ab	0,8	**1,3c**	3,2	1,0abc	2,0	0,0a	0,0	0,0a	0,0	0,0a	0,0	0,0a	0,0
Galium parisiense	0,3a	1,0	1,5a	2,8	0,2a	0,8	0,1a	0,7	**5,2bc**	7,0	3,0ab	3,7	**6,7bc**	9,4	**7,0c**	11,2
Lamium amplexicaule	**7,4d**	5,2	1,1ab	2,4	**3,3c**	3,6	**2,1bc**	2,8	0,0a	0,0	0,0a	0,1	0,0a	0,1	0,0a	0,1
Medicago minima	1,5a	2,8	3,1a	5,5	1,5a	2,7	0,2a	1,0	**48,1c**	26,9	6,6a	7,0	**41,6c**	24,2	**26,1b**	19,5
Sonchus asper	0,0a	0,1	**14,7c**	10,9	0,2a	0,8	1,4a	5,5	2,2a	5,4	**11,0bc**	9,8	1,2a	3,0	**7,5b**	8,0
Stellaria media	**3,2c**	6,6	0,0a	0,0	**1,7bc**	2,6	0,6ab	2,0	0,1ab	0,7	0,1ab	0,7	0,1ab	0,7	0,2ab	1,0
Taraxacum obovatum	0,0a	0,0	0,3a	2,2	0,0a	0,0	0,0a	0,0	1,8ab	3,5	0,6a	1,7	**2,7b**	6,0	0,7a	3,3
Veronica hederifolia	**3,6c**	4,8	0,8ab	1,6	**2,7c**	3,7	**2,2bc**	3,4	0,0a	0,1	0,2a	0,8	0,3a	1,2	0,5ab	1,9
COBERTURA TOTAL	23,0a	12,0	48,5b	19,1	18,3a	7,1	17,7a	11,0	**93,2d**	6,7	54,8b	14,0	**94,2d**	5,2	**77,9c**	11,2
RIQUEZA	3,4ab	1,4	5,0bc	1,6	4,1ab	1,6	3,2a	1,4	**7,7d**	2,6	**6,5cd**	2,4	**7,7d**	5,8	**6,6cd**	2,6

[1] *Unidades ambientales definidas en Fig. 1. En cada fila, medias con la misma letra no son significativamente diferentes (P<0,05).*

Por otro lado, las especies T+ muestran valores de área específica foliar (SLA) más altos que el promedio. Valores altos de SLA están asociados a tasas altas de crecimiento, lo que unido a que se trata de especies de floración temprana (enero-febrero), podrían conferirles una ventaja adaptativa frente a otras especies en SM con laboreo.

Especies del tipo H+L+ y L+H+ (i.e. *Sonchus asper* (L.) Hill.) mostraron una estrategia competidora-ruderal, pudiendo verse favorecidas por el aporte extra de agua y nutrientes que recibían en la línea de la viña, lo que puede explicar que se trate de especies con un porte muy elevado respecto al resto de taxones estudiados. Se espera por tanto que ejerzan una competencia muy fuerte por los recursos que podría estar condicionando el rendimiento del cultivo (Dorado et al., 2017).

Taxón	Respuesta [1]	Estrategia Grimme (GLS)	Longevidad del banco de semillas (SBL)		Peso semilla (SWT) [g]	Área específica foliar (SLA) [mm^2 mg^{-1}]	Altura (PLH) [cm]	Comienzo periodo floración (BFF)
			Transitorio (<1 año)	Persistente (> 1 año)				
Cardus borgeanus	H+	CR	-	-	3,90	13,01	150	3
Sonchus asper	H+L+	CR	0,49	*0,51*	0,28	18,06	120	2
Convolvulus arvensis	L+H+	CR	0,89	*0,11*	10,30	27,92	100	3
Diplotaxis erucoides	L+H+	-	-	-	0,20	26,37	80	1
Astragalus hamosus	S+H-	SR	*0,80*	*0,20*	2,00	15,21	30	3
Gallium parisiense	S+H+	R	1,00	*0,00*	0,14	24,43	55	4
Medicago minima	S+C+	SR	0,68	*0,32*	1,09	20,29	30	3
Taraxacum obovatum	S+	CSR	0,74	*0,26*	0,67	29,07	25	2
Stellaria media	T+C+	CR	0,29	*0,71*	0,39	39,00	20	2
Fumaria officinalis	T+	R	0,39	*0,61*	3,28	24,50	80	2
Lamium amplexicaule	T+C+	R	0,44	*0,56*	0,56	38,45	40	1
Veronica hederifolia	T+	R	0,22	*0,78*	4,06	28,81	30	1
Bromus madritensis	T-H+	CR	0,85	*0,14*	2,90	33,57	80	3

Tabla 2. Rasgos funcionales de las especies más representativas según su respuesta a las perturbaciones laboreo (T), siega (S) o herbicida (H), y su posición en la calle (C) o línea de cultivo (L).

[1] Factores para los que se han encontrado una respuesta significativa, ya sea positiva (+) o negativa (-)

En el caso particular de *Bromus madritensis* L., si bien también mostró una respuesta positiva ante el tratamiento con herbicida, se vio condicionado en mayor medida por el laboreo (T-), un fenómeno que ya ha sido observado en una especie próxima como *Bromus diandrus*, para la que el enterramiento de semillas por labor profunda puede suponer una reducción de la emergencia del 95% (Riba & Recasens, 1995).

4. Referencias

ARMENGOT L, BLANCO-MORENO JM, BARBERI P et al. (2016). Tillage as a driver of change in weed communities: a functional perspective. *Agriculture, Ecosystem & Environment*, **222,** 276-285

BORGY B, PERRONNE R, KOHLER C et al. (2016). Changes in functional diversity and intraspecific trait variability of weeds in response to crop sequences and climate. *Weed Research*, **56 (2)**, 102-113

COLBACH N, GRANGER S, GUYOT SHM et al. (2014). A trait-based approach to explain weed species response to agricultural practices in a simulation study with a cropping system model. *Agriculture, Ecosystem & Environment*, **183,** 197-204

DORADO J, CABELLO F, MARTÍN JM et al. (2017). Adaptación de la flora arvense a diferentes sistemas de gestión del suelo en un viñedo de la Comunidad de Madrid. En: *XVI Congreso SEMh* (M Royuela, A Zabalza, eds), 159–164, Edita UPN, Pamplona.

GARNIER E & NAVAS ML (2012) A trait-based approach to comparative functional plant ecology: concepts, methods and applications for agroecology. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, **32 (2)**, 365-399

GHERSA CM & MARTÍNEZ-GHERSA MA (2000) Ecological correlates of weed seed size and persistence in the soil under different tilling systems: Implications for weed management. *Field Crops Research*, **67**, 141–148.

GRUNDY AC, MEAD A, BOND W, CLARK G & BURSTON S (2011). The impact of herbicide management on long- term changes in the diversity and species composition of weed populations. *Weed Research* **51**, 187–200.

JUAREZ-ESCARIO A, CONESA JA, SOLÉ-SENAN XO (2017) Management as a driver of functional patterns and alien species prominence in weed communities of irrigated orchards in Mediterranean Areas. *Agriculture, Ecosystem & Environment* , **249**, 247-255

KATTGE J, DÍAZ S, LAVOREL S, PRENTICE IC, LEADLEY P, BÖNISCH G, GARNIER E, WESTOBY M, REICH PB, WRIGHT IJ (2011). TRY – a global database of plant traits. *Global Change Biology,* **17**, 2905– 2935.

MACLAREN C, BENNETT J & DEHNEN-SCHMUTZ K (2019). Management practices influence the competitive potential of weed communities and their value to biodiversity in South African vineyards. *Weed Research*, **59 (2)**, 93-106

RIBA F & RECASENS J (1995). Effects of cultivation regime on the size of populations of *Bromus diandrus* Roth growing as a weed in winter cereal. En: *9th European Weed Research Society Symposium*. 619-625. Budapest

VAYSSIÈRES M, PLANT R & ALLEN-DIAZ B (2000). Classification trees: An alternative non-parametric approach for predicting species distributions. Journal of Vegetation Science, **11**, 679-694

Functional analysis of the plant community present in a Mediterranean vineyard according to the management system

Summary: During the period 2016-2018, samples of the field flora present were taken in a vineyard located in the IMIDRA Experimental Field El Socorro (Colmenar de Oreja, Madrid). The experimental plot had a random block design with 4 replications, which included 4 different management systems: i) Intensive, tillage between rows and herbicide in-row; ii) Eco_Till, tillage between rows and in-row; iii) Low_input, cover crop between rows and herbicide in-row; and iv) Eco_cover, cover crop between rows and tournesol-treated in-row. Based on the results obtained, it has been possible to establish different relationships between environmental factors associated with each management system and the composition of the field flora community, as well as the functional characteristics that allow the field flora to adapt to these factors.

Keywords: Vineyard, tillage, vegetation cover, field flora, functional traits.

Efecto de la longitud de las raíces de *Solanum elaeagonifolium* Cav. en su brotación

TOMAS J[1], MARÍ AI[1], PARDO G[1], CIRUJEDA A[1]

[1]Unidad de Sanidad Vegetal. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza). Avda. Montañana 930; 50059 Zaragoza, España.
javitomas03@hotmail.com, *aimari@cita-aragon.es*, *gpardos@aragon.es*, *acirujeda@aragon.es*
[2]Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural. Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), España.
jaibar@unizar.es

Resumen: *Solanum elaeagnifolium* es una mala hierba invasora en España capaz de multiplicarse sexual y asexualmente presente de forma marginal en Aragón. Tras observar la rápida multiplicación de esta especie en una parcela labrada con un apero que fragmenta las raíces, se ha estudiado el efecto de la longitud de éstas sobre su capacidad de rebrotar. El material vegetal se recogió en una parcela en Fuentes de Ebro (Zaragoza). Se seleccionaron raíces leñosas (no recién generadas) de diámetros entre 0,5 y 1,5 cm y se cortaron en fragmentos de 1, 2, 4, 6, 8 y 10 cm de longitud. Se colocaron 2 a 4 fragmentos por maceta y 4 macetas por tratamiento. El ensayo se llevó a cabo en octubre y en noviembre de 2018. En ambos ensayos se observó un mayor número de emergencias a partir de los fragmentos más largos y una mayor longitud de las plantas emergidas; en el segundo ensayo hubo brotaciones a partir de fragmentos de 1 cm de longitud aunque solo en el 38% de ellos. Los fragmentos de longitud menores dieron lugar a mayor número de brotes por metro de raíz pero con menor desarrollo inicial. No se descarta la brotación a partir de fragmentos pequeños como 1 cm y se debe de tener en cuenta para su posterior control.

Palabras clave: rotovator, matacaballos, control mecánico, diseminación, mala hierba perenne

1. Introducción

Solanum elaeagnifolium es una especie perenne que procede del sudoeste de los Estados Unidos de América y América del Sur pero que está distribuida en otros continentes. En cuanto a zonas próximas a España, preocupa la agresividad mostrada en países del norte de África y de Oriente próximo. En España su presencia sigue reducida a zonas concretas en las costas valencianas (Carretero, 1979) y catalanas (de Bolós y Vigo, 1995). La primera cita en Aragón fue en 1996 en las cercanías de Zaragoza (Mateo y Pyke, 1997) y en el año 2004 se notificó la presencia de plantas de *Solanum elaeagnifolium* Cav. en los

alrededores de Zaragoza por parte de un aficionado botánico a un investigador del CITA. Desde entonces se está llevando una campaña conjunta entre el Centro de Sanidad y Certificación Vegetal de Aragón (CSCV) y el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) para concienciar sobre su potencial peligrosidad y conseguir su erradicación.

A pesar de la preocupación que se manifiesta en muchos países, son escasos los estudios que describen el comportamiento biológico de esta especie con el fin de poder orientar mejor su control. Se han encontrado estudios recientes sobre el efecto de los herbicidas (Qasem, 2014, Gitsopoulus et al., 2017) y estudios sobre la biología de la germinación (Stanton et al., 2012; Tanji et al., 1984) pero no sobre la reproducción asexual desde los rizomas. No obstante, se ha observado que los rodales de esta especie permanecen relativamente constantes en caso de ausencia de laboreo pero que la expansión es exponencial si se labra utilizando un rotovator, el cual fragmenta las raíces. Por ello y en la línea de lo que se ha estudiado para alguna otra especie de comportamiento parecido como es *Cirsium arvense* (Niederstrasser et al., 2007), el objetivo de este trabajo es el de conocer qué tamaño de raíces es capaz de dar lugar a nuevas plantas.

2. Material y Métodos

Los resultados que se presentan en este trabajo corresponden a dos ensayos, aunque cabe comentar que anteriormente se han llevado a cabo otros dos más de forma preliminar, no obteniendo brotaciones en ninguno de los dos casos. La falta de éxito en los dos ensayos preliminares seguramente es debida a la dificultad de manejo de esta especie en la cámara de cultivo, ya que no se disponía de la adecuada ventilación forzada y los rizomas posiblemente sufrieron de exceso de agua.

Los días 8 de octubre de 2018 y 15 de noviembre de 2018 se recolectaron manualmente raíces en una finca particular en Quinto (Zaragoza, España), en la que desde hace varios años la expansión de esta mala hierba ha ido en aumento. Esta parcela se dedica a cultivos hortícolas para consumo propio y se utiliza el rotovator como apero principal, por lo que el suelo estaba relativamente descompactado permitiendo la recolección de las mismas. Al desenterrar las plantas se encontraron dos tipos de raíces: raíces de coloración blanca de reciente formación y otras de coloración parda, generalmente posicionadas de forma horizontal y que parecen ser los órganos de reproducción principales. Se seleccionaron estas últimas, las cuales fueron lavadas en laboratorio y mantenidas a temperatura ambiente durante 18 horas envueltas con papel humedecido. En un ensayo previo se habían colocaron en la nevera y no se pudo observar brotación ninguna posteriormente. Al día siguiente las raíces se fraccionaron en segmentos de 1, 2, 4, 6, 8 y 10 cm de longitud. En este proceso se escogieron raíces diferentes para segmentos de la misma longitud, asegurando así que los fragmentos de la misma longitud procedieran de individuos diferentes descartando un posible efecto del origen de la raíz sobre la brotación.

Una vez recolectadas y lavadas, se midió la longitud y los diámetros mínimos y máximos de cada una de las raíces mediante un pie de rey digital. En el primer ensayo los valores fueron de 30±4,3 cm de longitud con diámetros mínimos y máximos de 3±0,3 y 5±0,5 mm, respectivamente. En el segundo ensayo estos valores fueron de 12±1,1 cm de longitud media y de diámetros mínimos y máximos de 0,7±0,04 y 0,4±0,02 mm, respectivamente. Como se observa, las raíces recolectadas fueron en general más cortas y más delgadas en el segundo ensayo.

Los fragmentos de raíz fueron situados a 1,5-2 cm de profundidad en macetas de 20 cm de altura y 20 cm de diámetro y capacidad de aproximadamente 6 litros y el sustrato utilizado fue una mezcla de tierra local y sustrato vegetal en proporción 80:20. Se prepararon 4 repeticiones (macetas) para cada longitud de raíz colocándose en el primer ensayo 3 fragmentos por maceta y en el segundo 4, 4, 3, 2, 2 y 2 fragmentos de 1, 2, 4, 6, 8 y 10 cm por maceta, respectivamente. Los contenedores fueron colocados al azar en una cámara climática en las instalaciones del CITA con las temperaturas de 30 y 20ºC durante 14 y 10 horas de luz y oscuridad, respectivamente. En ambos ensayos las emergencias de cada maceta fueron anotadas diariamente hasta los 55 y 32 días después del inicio del ensayo, respectivamente, cuando habían transcurrido 5 días desde la brotación de la última planta. Las macetas fueron regadas de forma manual y a demanda.

3. Resultados y Discusión

Ha resultado llamativo que, si bien las raíces fueron recolectadas en la misma parcela y el procedimiento fuese el mismo ambas veces, los resultados en ambos ensayos hayan sido muy diferentes. En general, ha habido muchas más brotaciones y se han producido de forma más rápida en el segundo ensayo (Tablas 1 y 2). En el primer ensayo no se produjeron brotaciones de fragmentos de 1 y 8 cm mientras que en el segundo se contabilizaron emergencias de todos los tamaños, aunque los brotes de 1 cm dieron lugar a menos emergencias, coincidiendo con lo observado en el primer ensayo.

En el primer ensayo los primeros fragmentos que brotaron fueron los de 10 cm mientras que en el segundo lo hicieron los de 2 y 4 cm. En el primer ensayo el tiempo necesario para brotar tendió a ser mayor para los más largos, pero esto fue debido a que se produjeron dos emergencias muy tardías en un brote de 10 cm a los 41 y 50 días después de inicio del ensayo. En el segundo ensayo se aprecia una tendencia a que los fragmentos de raíces más largos generan brotes más rápidamente, lo cual coincide con lo esperado, ya que fragmentos más largos contienen más reservas para dar lugar a nuevas plantas.

En ambos ensayos el porcentaje de brotes (calculado sobre el número de fragmentos de raíz colocados) tendió a ser mayor para fragmentos de raíz más largos y en ambos se produjo más de una brotación por fragmento para aquellos que midieron 8 o 10 cm (Tablas 1, 2). Esto es lógico, ya que la probabilidad de que haya yemas activas es mayor en brotes largos que en cortos. Si se calcula el porcentaje de brotaciones por m de raíz plantada los valores fueron bastante más bajos para el primer ensayo que para el segundo.

En este ensayo se aprecia claramente como en proporción a los m plantados, se producen más brotaciones en fragmentos de raíz más cortos. Posiblemente se active la brotación en raíces más cortas mientras que se produce una dormición de algunas yemas en raíces más largas como se ha encontrado en otras especies como *Elymus repens* (Vengris, 1962).

También en ambos ensayos la longitud media de los brotes tendió a ser mayor para plantas emergidas de fragmentos de mayor longitud. Cabe comentar que, a pesar de su rusticidad en campo, se ha observado una cierta sensibilidad de estas plantas a diferentes insectos e incluso se ha registrado la muerte de algunos de los brotes tras la presencia de pulgón que fue posteriormente tratado con insecticida.

Tabla 1. Resultados de las brotaciones de *Solanum elaeagnifolium* emergidas de los fragmentos de raíces del primer ensayo.

Tamaño fragmento (cm)	Primera emergencia (días)	Período medio de emergencia (días)	Macetas en las que ha habido brotaciones (%)	Brotes sobre el total de rizomas por maceta (%)	Brotes por m de raíz plantada (número)	Longitud media de los brotes (cm)
1	-	-	0	-	-	-
2	22	25 ± 2,5	50	17 ± 9,6	8 ± 4,8	2 ± 0,5
4	20	25 ± 3,5	25	17 ± 16,7	4 ± 4,2	4 ± 3,0
6	17	21 ± 1,4	75	50 ± 16,7	8 ± 2,8	5 ± 2,0
8	-	-	0	-	-	-
10	13	28 ± 5,0	75	58* ± 37,0	6 ± 3,7	7 ± 5,0

*se ha observado más de un brote por rizoma en una maceta.

Tabla 2. Resultados de las brotaciones de *Solanum elaeagnifolium* emergidas de los fragmentos de raíces del segundo ensayo.

Tamaño fragmento (cm)	Primera emergencia (días)	Período medio de emergencia (días)	Macetas en las que ha habido brotaciones (%)	Brotes sobre el total de rizomas por maceta (%)	Brotes por m de raíz plantada (número)	Longitud media de los brotes (cm)
1	10	23 ± 2,3	50	38 ± 23,9	38 ± 23,9	1 ± 0,2
2	7	18 ± 2,7	100	56 ± 18,8	28 ± 9,4	1 ± 0,1
4	7	20 ± 3,1	100	83 ± 9,6	21 ± 2,4	3 ± 1,1
6	10	15 ± 1,8	100	88 ± 12,5	15 ± 2,1	4 ± 0,6
8	10	19 ± 2,1	100	138* ± 12,5	17 ± 1,6	5 ± 1,3
10	10	14 ± 2,0	100	138* ± 23,9	14 ± 2,4	3 ± 0,6

*se ha observado más de un brote por rizoma en tres/dos macetas para raíces de 8/10 cm.

En un ensayo similar realizado con raíces de *Cirsium arvense* (Niederstrasser et al., 2007) se encontraron 100% de brotaciones para fragmentos de 7 y 10 cm de longitud y algunas brotaciones para fragmentos de 1 y 3 cm de longitud. Los resultados obtenidos en los presentes ensayos parecen ser, por lo tanto, bastante similares comparado con una especie con un comportamiento reproductivo parecido. No obstante, a la vista de los resultados algo irregulares creemos necesario repetir los ensayos como mínimo una tercera vez para poder confirmar la posibilidad de rebrote de plantas a partir de fragmentos de raíz tan pequeños como de 1 cm de longitud.

Desde el punto de vista de aplicación de estos resultados consideramos que el uso de aperos que fragmentan las raíces puede, por un lado, ser contraproducente ya que se ha encontrado que pueden producirse brotaciones desde fragmentos pequeños y una mayor brotación por cm de raíz; por otro lado, ya que la eficacia de estas brotaciones es menor, posiblemente sí se produzca una inactivación de algunas yemas en estos fragmentos (Vengris, 1962). Una posible estrategia de control podría ser, por lo tanto, estimular la brotación al triturar las raíces en fragmentos cortos para controlar las emergencias posteriormente. Por otro lado, también sería interesante estudiar el efecto del desecado de las raíces tras ser subidas en superficie por un cultivador para poder dar una recomendación de manejo de esta especie por medios mecánicos.

4. Agradecimientos

Agradecemos la colaboración de Saturnino en facilitar la obtención del material vegetal y a F. Arrieta y J.A. Alins en la colaboración en recolección de las plantas.

Referencias

BOLÓS de O. y VIGO J (1995) Flora dels Països Catalans. 3ª ed. Barcelona.

CARRETERO JL (1979) *Solanum elaeagnifolium* Cav. y *Cuscuta campestris* Yuncker nuevas especies para La flora española. Collect. Botánica 11: 143-154, Barcelona.

GITSOPOULUS TK, DAMALAS CA, GEORGOULAS I (2017) Chemical options for the control of silverleaf nightshade (*Solanum elaeagnifolium*). *Planta Daninha* **35**, artículo número e017162035.

MATEO, G y PYKE S. (1997) Aportaciones a la flora Cesaraugustana, IV. Flora Montiberica 5, 50-52.

NIEDERSTRASSER J, STRUCK C, GEROWITT B (2007) Establishment of *Cirsium arvense* root fragments. 7th EWRS Workshop on Physical and Cultural Weed Control, Salem, Alemania, 11-14 March 2007.

QASEM JR (2014) Silverleaf nightshade (*Solanum elaeagnifolium*) in the Jordan Valley: field survey and chemical control. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **89**, 639-646.

STANTON R, WU H, LEMERLE D (2012) Factors affecting silverleaf nightshade (*Solanum elaeagnifolium*) germination. *Weed Science* **60**, 42-47.

TANJI A, BOULET C, HAMMOUMI M (1984) Contribution à l'étude de la bilogie de *Solanum elaeagnifolium* Cav. (Solanacées), adventice des cultures dans le périmètre irriguñe du Tadla (Maroc). *Weed Research* **24**, 401-409.

VENGRIS J (1962) The effect of rhizome length and depth of planting on the mechanical and chemical control of quackgrass. Weeds 10, 71–74.

Effect of the root length of *Solanum elaeagonifolium* Cav. in the sprouting

Summary: *Solanum elaeagnfolium* is an invasive weed in Spain capable of sexual and vegetative reproduction and is marginally present in Aragón. After observing the rapid proliferation of this species in a plot ploughed with a tool which slices the roots into fragments, the effect of the length of the root fragments on the capacity of regrowth of new plants has been studied. Roots were collected in Fuentes de Ebro (Zaragoza, Spain). Woody roots (not recently generated ones) were selected with diameter between 0,5 and 1,5 cm and cut in fragments of 1, 2, 4, 6, 8 y 10 cm length. Two to 4 fragments were placed in each pot and 4 replicates were done per treatment. The trial was conducted during October and November 2018. In both trials more sprouts were observed from longer root fragments, which were also longer; in the second trial sprouts occurred from all root lengths even from 1 cm long roots, despite only in 38% of the 1 cm-long fragments. These results demonstrate a higher probability of sprouting from longer root fragments but does not exclude sprouting from small fragments.

Keywords: rotovator, silverleaf nightshade, mechanical control, dissemination, perennial weed.

Desarrollo y validación de un modelo termal para describir la emergencia de *Lolium multiflorum*

PAGNONCELLI FDB[1,2], GONZALEZ-ANDUJAR JL[2], TREZZI MM[1], SALOMÃO HM[1], HARTMANN K[1]

[1] Departament of Agronomy, UTFPR, Pato Branco, BRASIL.
fpagnoncelli@outlook.com, trezzim@gmail.com, helissalomao@gmail.com, katiachartmann@hotmail.com
[2] Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC), Córdoba, España.
andujar@ias.csic.es

Resumen: *Lolium multiflorum* es una mala hierba ampliamente diseminada por los cultivos de todo el mundo, principalmente en cultivos cerealistas, como el trigo, por ejemplo. Es una especie altamente competitiva, presentando un elevado potencial de reducción del rendimiento. La emergencia es una etapa fundamental para el establecimiento de las malezas y la capacidad de predecir este evento permitiría la adopción de estrategias de manejo más eficientes. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar y validar un modelo predictivo de la emergencia de *L. multiflorum* para los cultivos de cereales de invierno (trigo/avena), basado en el tiempo termal (TT). Se probaron los modelos de Gompertz, Logistico y Weibull con datos obtenidos en el estado de Paraná (Brasil). A través del criterio de información de Akaike corregido se seleccionó el modelo de Gompertz como el más adecuado para describir la emergencia de esta especie. Dicho modelo predice el inicio de la emergencia a los 300 TT, alcanzando el 90% de emergencia a los 590 TT. El modelo fue validado con datos independientes (R^2=0,97). En conclusión, el modelo desarrollado explica adecuadamente el patrón de emergencia de *L. multiflorum* y podría utilizarse como herramienta de ayuda en la toma de decisiones de manejo de esta especie.

Palabras clave: Tiempo termal, modelo de Gompertz, manejo de malas hierbas.

1. Introducción

Lolium multiflorum es una especie ampliamente difundida por áreas cultivadas alrededor del mundo (USDA, 2019). La especie se desarrolla desde el otoño hasta principios de la primavera y puede afectar tanto los cultivos de invierno como de verano. La reducción del rendimiento en los cultivos de trigo y maíz puede llegar hasta 60% debido a la competencia con *L. multiflorum* (Fleck, 1980, Nandula, 2014). La infestación de la especie es favorecida por la alta prolificidad y latencia de las semillas. La latencia es una estrategia importante para las malezas, que hace que las semillas germinen sólo en

condiciones específicas y en épocas del año que favorecen el desarrollo de la planta (Maia et al., 2009).

El proceso de germinación se activa únicamente cuando las semillas y el clima son adecuados. Por eso, el inicio y mantenimiento de la emergencia puede variar año tras año. Esto dificulta la adopción de estrategias de manejo, ya que en muchos casos no hay previsibilidad de los fenómenos. Sin embargo, mediante el uso de modelos matemáticos, es posible hacer deducciones sobre las condiciones climáticas en las que es más probable que las semillas germinen. Dicha información puede ser utilizada como una herramienta para ayudar en la toma de decisiones de control y optimizar el uso de estrategias de manejo (González-Andújar & Bastida, 2017).

Ya se han desarrollado diferentes modelos matemáticos para predecir la emergencia de diferentes especies de malezas (ver González-Andújar et al., 2016), todavía, no existen modelos que describan la emergencia de *L. multiflorum*. El objetivo de este trabajo fue desarrollar y validar un modelo predictivo de la emergencia de *L. multiflorum* basado en el tiempo térmico del suelo.

2. Material y Métodos

Los experimentos se realizaron en dos etapas. En la primera etapa, el flujo natural de emergencia de las plántulas de *L. multiflorum* fue monitoreado en áreas agrícolas que comúnmente tienen cultivos de trigo/avena en invierno y soja/maíz en verano, de los municipios de Mariópolis (26°19'48.0 "S 52°40'00.4 "O") y Pato Branco (26°10'32.6 "S 52°41'11.2 "O"), en la región Suroeste del Estado de Paraná, Brasil. En cada sitio, 10 cuadrados de 0.25 m² (0.5 x 0.5m) fueron colocados aleatoriamente en un área de 100m². Se han realizado conteos semanales del número de plántulas emergentes hasta que no se observaron nuevas plántulas. Durante todo el período experimental, la temperatura del suelo fue monitoreada por medio de sensores (enterrados a una profundidad de 5 cm) que realizaron la lectura y almacenaron los datos en registrador climatológico.

La segunda etapa se realizó entre los meses de julio y septiembre de 2018 en área agrícola que comúnmente es cultivada con trigo/avena en invierno y soja/maíz en verano ubicada en el municipio de Pato Branco - PR (26°10'35.9 "S 52°41'26.8 "O). Se sembraron 50 semillas de *L. multiflorum* en microparcelas de 0,25 m² (0,5 * 0,5 cm) con 16 repeticiones. Las semillas fueron cubiertas con una capa de 1 cm de suelo. El flujo de emergencia fue observado cada tres días hasta que no se observaron nuevas plántulas. El registro de la temperatura del suelo se realizó con la metodología descrita anteriormente.

El tiempo térmico acumulado (TT) en grados día se calculó como,

$$TT = \sum_{i=1}^{n}(Tmedia - Tbase) \qquad \text{(Ecuación 1)}$$

Donde ***n*** es el número de días después del inicio del control de temperatura, ***Tmedia*** es la temperatura media diaria del suelo (°C) y ***Tbase*** es la temperatura (°C) mínima a la que se produce la germinación. La temperatura base utilizada fue de 1,9 °C (Tribouillois et al., 2016).

Para describir la emergencia acumulada, se probaron los modelos Logístico, Gompertz y Weibull, comúnmente utilizados en la literatura. (González-Andújar et al., 2016).

Gompertz

$$Ei = K\ exp(-exp(-b(TT-m))) \quad \text{(Ecuación 2)}$$

Logístico

$$Ei = K\ /(1+exp(-b(TT-m))) \quad \text{(Ecuación 3)}$$

Weibull

$$Ei = K\ (1-exp(-(b(TT-m))^{c})) \quad \text{(Ecuación 4)}$$

En qué: ***Ei*** representa el porcentaje de emergencia acumulada esperada, ***K*** es la emergencia máxima estimada por el modelo, ***b*** es la tasa de incremento de la emergencia, ***m*** es el punto de inflexión en el *x*-axis y ***c*** es el factor que determina la asimetría y la curtosis de la distribución.

El modelo mas adecuado fue seleccionado utilizando el criterio de información de Akaike corregido (AICc) (Burnham et al., 2011). La validación del modelo seleccionado y generado con los datos realizados durante la primera etapa (2016) se realizó con los datos del experimento independiente obtenidos durante la segunda etapa (2018). La validación del modelo se realizó comparando los valores estimados y observados mediante el coeficiente de regresión (R^2).

Los análisis se realizaron utilizando el lenguaje R y los paquetes *"nls2"* (Grothendieck, 2019) y *"GGplot2"* (Wickham, 2016) para ajustar los parámetros de los modelos y construir gráficos, respectivamente. La bondad del ajuste de los modelos no lineales se realizó mediante el uso del RMSE y el pseudo-R^2.

3. Resultados y Discusión

La función de Gompertz mostró ser el modelo mas adecuado para representar los datos obtenidos en comparación con las funciones de Logística y Weibull (AICc = 88,66, 97,18 y 146,93, respectivamente) y fue elegida para describir la emergencia de *Lolium multiflorum*. El modelo Gompertz presentó un buen ajuste con los datos observados (R^2 = 0,98 y RMSE = 6,14). Según este modelo, la emergencia se inicia en 300 TT, llegando al 50% de la emergencia con 444 TT y al 90% con 590 TT (Fig. 1A).

El modelo de Gompertz mostró una buena predicción (R^2=0,97; Fig. 1B) de los datos independientes utilizados para su validación. A pesar de ser más simples que los modelos hidrotermales u otros tipos de modelos, los modelos basados sólo en la acumulación térmica del suelo pueden ser eficientes para describir el flujo de emergencia de las malezas (Yousefi et al., 2014). En este caso se debe a que la temperatura es el principal factor que limita la aparición de plántulas en las regiones de clima subtropical (Bradford 2002).

Los modelos predictivos del flujo de emergencia de las plantas son herramientas importantes para ayudar a la optimización de la aplicación de medidas de control y servir de submodelos en modelos de evaluación de estrategias de manejo integrado González-Andujar et al., 2010).

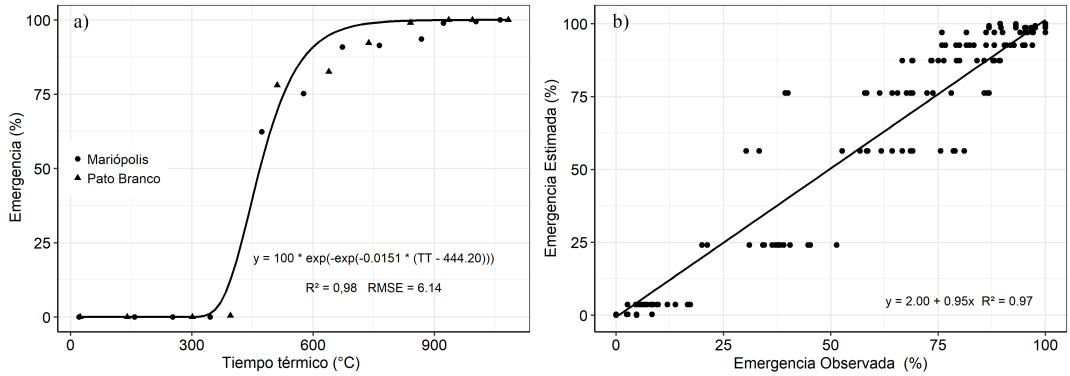


Figura 1: Emergencia acumulada (a) observada durante 2016 y validación del flujo de emergencia (b) de *L. multiflorum*, con datos recogidos durante 2018.

4. Conclusiones

El modelo de tiempo termal propuesto es robusto para ser utilizado como una herramienta predictiva para describir la emergencia de *L. multiflorum* y puede ser utilizado como una herramienta para contribuir a la optimización de las estrategias de manejo de esta especie.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen a la Coordinación para el Mejoramiento del Personal de la Educación Superior (CAPES), a la Universidad Tecnológica Federal de Paraná (UTFPR) y al Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC) por el apoyo financiero y la provisión de infraestructura para el desarrollo de la obra.

Referencias

Burnham KP, Anderson DR, Huyvaert, KP (2011) AIC model selection and multimodel inference in behavioral ecology: some background, observations, and comparisons. *Behavioral ecology and sociobiology* **65**, 23-35.

Fleck, NG (1980) Competição de azevém (*Lolium multiflorum* L.) com duas cultivares de trigo. *Planta daninha* **2**, 61-67.

Gonzalez-Andujar JL & Bastida F (2017) Herramientas de ayuda en la toma de decisiones para la aplicación eficiente de los herbicidas. *Tierras: Agricultura* **252**, 22-25.

Gonzalez-Andujar JL, Chantre GR, Morvillo C, Blanco AM, Forcella, F (2016) Predicting field weed emergence with empirical models and soft computing techniques. *Weed research* **56**, 415-423.

González-Andujar JL, Fernández-Quintanilla C, Bastida F, Calvo R, GonzálezDíaz L, Izquierdo J, Lezaun JA, Perea F, Sanchez Del Arco MJ, Urbano JM (2010) Field evaluation of a decision support system for *Avena sterilis* ssp. *ludoviciana* control in winter wheat. *Weed Research* **50**, 83–88.

Grothendieck G nls2: Non-linear regression with brute force. R package version 0.2. URL: https://CRAN.R-project.org/package=nls2. Accessed 23 may 2019.

Maia FC, Maia MDS, Bekker RM, Berton RP, Caetano LS (2009) *Lolium multiflorum* seeds in the soil: II. Longevity under natural conditions. *Revista Brasileira de Sementes* **2**, 123-128.

Nandula, VK (2014) Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. *multiflorum*) and corn (*Zea mays*) competition. *American Journal of Plant Sciences* **5**, 3914.

Tribouillois H, Dürr C, Demilly D, Wagner MH, JUSTES E (2016). Determination of germination response to temperature and water potential for a wide range of cover crop species and related functional groups. *PloS one* **11**, e0161185.

USDA, Agricultural Research Service, National Plant Germplasm System. 2019. Germplasm Resources Information Network (GRIN-Taxonomy). National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. URL: https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?id=22493. Accessed 23 May 2019.

Wickham H ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York. URL: http://moderngraphics11.pbworks.com/f/ggplot2-Book09hWickham.pdf. Accessed 23 may 2019.

Yousefi AR, Oveisi M, Gonzalez-Andujar, JL (2014). Prediction of annual weed seed emergence in garlic (*Allium sativum* L.) using soil thermal time. *Scientia Horticulturae* **168**, 189-192.

Development and validation of a thermal model to describe the *Lolium multiflorum* emergence

Summary: *Lolium multiflorum* (L) is a weed widely disseminated in crops around the world, particularly in crops with winter cereals such as wheat. This weed is highly competitive with high yield reduction potential. The emergence is a fundamental step for the establishment of weeds and the ability to predict this event would allow the adoption of more efficient management strategies. In this context, the objective of this work was

to develop and validate a predictive model of *L. multiflorum* emergence for winter cereal crops (wheat/oat) based on thermal time (TT). Gompertz, Logistic and Weibull models were fiited with data collected in the Paraná State (Brazil). Using model selection approach, the Gompertz model was selected as the most adequate to describe the emergence of this specie. This model predicts the start of the emergence at 300 TT, reaching 90% at 590 TT. The model was validated with independent data (R^2=0.97). In conclusion, the model developed adequately explains the emergence pattern of *L. multiflorum* and could be used as a tool to assist in making management decisions.

Keywords: Thermal Time, Gompertz model, weed management.

Respuesta germinativa de distintas poblaciones de *Conyza bonariensis* a temperaturas constantes

VALENCIA-GREDILLA F[1], SUPICICHE M L[2], ROYO-ESNAL A[1]

[1]Grupo de Malherbología y Ecología Vegetal. Dpto. Hortofruticultura, Botánica y Jardinería. Agrotecnio-ETSEA. Universitat de Lleida. Av. Alcalde Rovira Roure 191, 25198, Lleida.
francisco.valencia@hbj.udl.cat, aritz@hbj.udl.cat
[2]Departamento de Agronomía/CERZOS, Universidad Nacional del Sur/CONICET Bahía Blanca, Buenos Aires 8000, Argentina
laura.supiciche@uns.edu.ar

Resumen: *Conyza bonariensis* es una de las malas hierbas más problemáticas a nivel mundial. De cara a su control, el conocimiento del momento de su emergencia puede ser crucial. Sin embargo, las distintas poblaciones pueden variar en sus requerimientos de germinación. Por ello, conocer la respuesta germinativa de esta especie en función de la localidad de origen (y por ende, clima) puede ser una herramienta útil de cara a mejorar modelos de germinación/emergencia ya desarrollados. Se recolectaron cuatro poblaciones de *C. bonariensis* en localidades distantes (Lleida, Badajoz, Sevilla, en España, y Bahía Blanca, en Argentina) y se sometieron a distintas temperaturas constantes (5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35ºC) en cámaras de germinación. Los resultados muestran que las poblaciones se comportan de manera similar, pero la magnitud de su respuesta en cuanto al porcentaje de germinación difiere en las temperaturas más extremas (5, 10 y 30ºC). La temperatura a la que se obtuvieron mayores porcentajes de germinación fue a 20ºC, mientras que a 35ºC ninguna población llegó a germinar. Estos resultados denotan la existencia de diferencias entre poblaciones respecto a sus parámetros base.

Palabras clave: Control de malas hierbas, germinación, malas hierbas, manejo integrado de malas hierbas

1. Introducción

Conyza bonariensis (L.) Cronquist, es una mala hierba ampliamente distribuida que invade numerosos cultivos, en los cuales puede causar serias pérdidas de rendimiento por competencia (Bajwa *et al*., 2016, Urbano *et al*., 2007, Davis and Johnson, 2008, Trezzi *et al*., 2015). Se trata de una especie anual nativa de Sudamérica (Thebaud & Abbott, 1995), pero distribuida por toda la Península Ibérica, donde está considerada como especie invasora (Elorza *et al.,* 2014). Este carácter invasor se justifica, en parte,

por la cantidad de semillas que puede llegar a producir cada planta, llegando a las 375.500 (Kempen & Graf, 1981), y por la dispersión de las mismas a largas distancias (Savage *et al*., 2014). Por otro lado, *C. bonariensis* presenta resistencia a distintos herbicidas (Heap, 2019), por lo que su control es cada vez más complicado. En especies anuales, la supervivencia de la misma está estrechamente ligada a la emergencia de las plántulas y al reabastecimiento del banco de semillas (Forcella *et al*., 2000), por lo que es imprescindible saber el momento y la magnitud en la que este evento tiene lugar a fin de mejorar su control (Royo-Esnal *et al*., 2015). Actualmente existen modelos de emergencia para *C. bonariensis* (Zambrano-Navea *et al.,* 2013) y otros autores han publicado las temperaturas cardinales de esta especie (Karlsson & Milberg, 2007, Wu *et al.,* 2007), pero los valores aportados por estos estudios son dispares. Las variaciones entre distintas poblaciones pueden deberse a adaptaciones locales (Tozzi *et al.,* 2014, Bajwa *et al.,* 2016), por lo que resulta interesante estudiar la respuesta germinativa de distintas poblaciones de *C. bonariensis* con el objetivo de comprobar que poblaciones pertenecientes a climas diferentes pueden comportarse de forma distinta en función de la temperatura.

2. Material y Métodos

Para llevar a cabo este estudio, se recolectaron semillas de *C. bonariensis* en septiembre de 2016 en tres localidades de España (Lleida, Badajoz y Sevilla) y en noviembre de 2017 en una localidad argentina (Bahía Blanca). El ensayo de germinación se llevó a cabo en cámaras de germinación del laboratorio del Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur y CONICET (Bahía Blanca, Argentina). Se estableció un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones en el que tandas de 30 semillas de cada población se sembraron en placas Petri de 9 cm sobre papel de filtro previamente humedecido con agua destilada. Las temperaturas ensayadas fueron 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35ºC, con un fotoperiodo de 12/12 horas. Las semillas germinadas se contaban diariamente hasta 21 días o cuando no había más germinaciones. Una semilla se consideraba germinada cuando la radícula superaba 1 mm (Steinmaus *et al.,* 2000). El experimento se repitió dos veces. La representación de los porcentajes de germinación se realizó a través del programa SigmaPlot 11.0 (Systat Software, San Jose, CA).

3. Resultados y Discusión

Los mayores porcentajes de germinación se obtuvieron entre 15 y 25ºC, llegando a su máximo a 20ºC para todas las poblaciones, con valores de 99% para la población de Bahía Blanca, 98% para Lleida, 96% para Badajoz y 81% para Sevilla. (Figura 1). Los porcentajes de germinación más bajos se obtuvieron con las temperaturas más extremas, 5 y 30ºC, no llegando a germinar ninguna población a la temperatura de 35ºC. Las temperaturas de 5 y 10ºC son las que denotan mayores diferencias entre poblaciones, siendo la población de Lleida la única en superar el 25% de germinación a 5ºC, seguida por la población de Bahía Blanca, cercana al 10% y las poblaciones de Sevilla y Badajoz con porcentajes inferiores al 3%. Esta tendencia se mantiene con la temperatura

de 10ºC, con un porcentaje de germinación superior al 80% para las poblaciones de Lleida y Bahía Blanca y un porcentaje cercano al 50% para las de Badajoz y Sevilla. Las diferencias entre los porcentajes de germinación en las distintas temperaturas ensayadas demuestran que poblaciones provenientes de localidades con climas distintos se comportan de forma desigual, y por ende, pueden germinar en momentos distintos. Conocer a qué temperatura comienza a germinar una población y en qué medida lo hace, nos permite adaptar mejor la estrategia de manejo para esta especie.

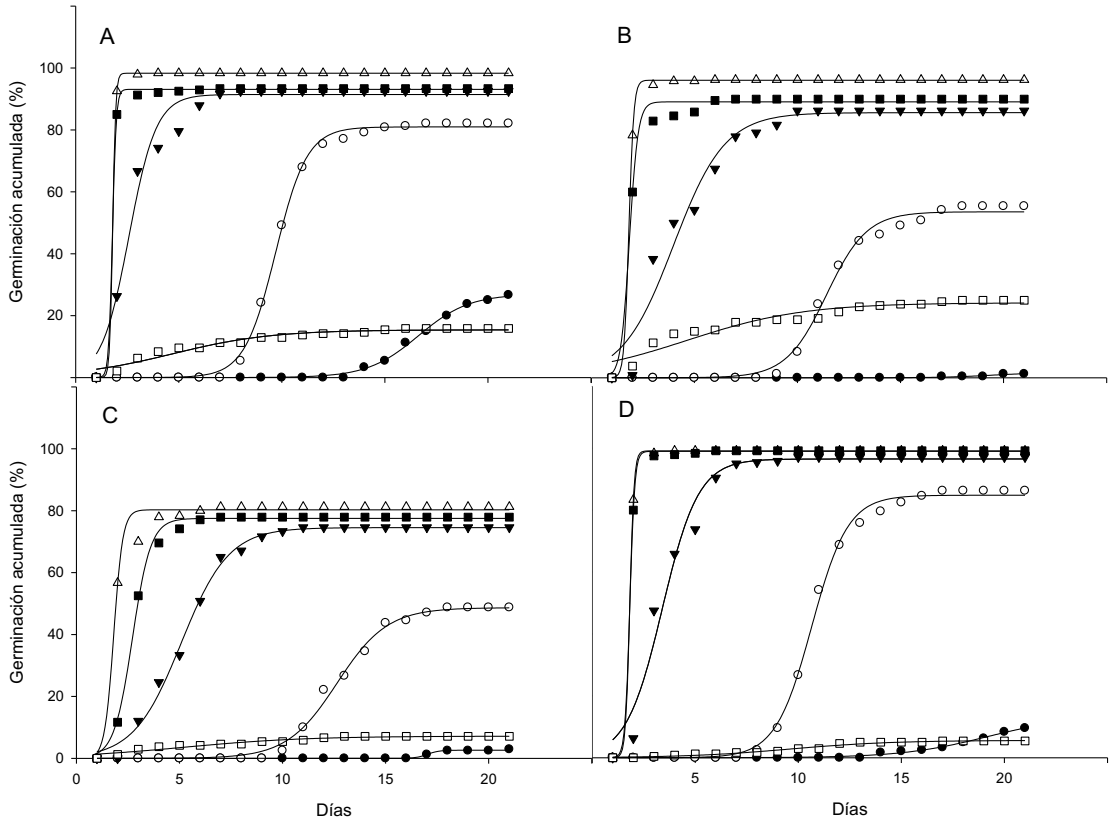


Figura 1 Evolución del porcentaje de germinación acumulada de *Conyza bonariensis* a diferentes temperaturas: 5ºC (●), 10ºC (○), 15ºC (▼), 20ºC (Δ), 25ºC (■), 30ºC (□) para las distintas poblaciones: A, Lleida; B, Badajoz; C, Sevilla; D, Bahía Blanca.

4. Agradecimientos

Este trabajo se enmarca dentro de los Proyectos del Plan Estatal - Retos de la Sociedad, Ref: AGL2017-83325-C4-2-R y AGL2014-52465-C4-2-R, financiados por el Ministerio de Industria y Competitividad. El primer autor ha contado con una beca predoctoral otorgada por la Universitat de Lleida.

Referencias

BAJWA AA, SADIA S, ALI HH, JABRAN K, PEERZADA AM, CHAUHAN BS (2016) Biology and management of two important *Conyza* weeds: a global review. *Environmental Science Pollution Research* **23**, 4694–24710.

DAVIS VM, JOHNSON WG (2008) Glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) emergence, survival, and fecundity in no-till soybean. *Weed Science* **56**, 231–236.

KEMPEN HM AND GRAF J (1981) Weed seed production. *Proceedings of the Western Society of Weed* Science **34**, 78–81.

URBANO JM, BORREGO A, TORRES V, LEON J M, JIMENEZ C, DINELLI G, BARNES J (2007) Glyphosate-resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) in Spain. *Weed Technology* **21**, 396–401.

SAVAGE D, BORGER C.P, RENTON M (2014) Orientation and speed of wind gusts causing abscission of wind-dispersed seeds influences dispersal distance. *Functional Ecology* **28**, 973-981.

THEBAUD C & ABBOTT R (1995) Characterization of invasive *Conyza* species (Asteraceae) in Europe: quantitative trait and isozyme analysis. *American Journal of Botany* **82**, 360–368.

FORCELLA F, BENECH-ARNOLD RL, SÁNCHEZ R, GHERSA CM (2000) Modeling seedling emergence. *Field Crops Research* **67**, 123–139

HEAP IM (2019) International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Available at: http://www.weedscience.org (last accessed 7 March 2019).

KARLSSON LM & MILBERG P (2007) Comparing after-ripening response and germination requirements of *Conyza canadensis* and *Conyza bonariensis* (Asteraceae) through logistic functions. *Weed Research* **47**, 433–441.

ROYO-ESNAL A, GARCÍA A, TORRA J, FORCELLA F, GUINJUAN J (2015) Describing *Polygonum aviculare* emergence in different tillage systems. *Weed Research* **55**, 387– 395.

STEINMAUS SJ, PRATHER T S, HOLT JS (2000) Estimation of base temperatures for nine weed species. *Journal of Experimental Botany* **51**, 275–286

TOZZI E, BECKIE H, WEISS R, GONZALEZ-ANDUJAR JL, STORKEY J, CICI SZH, ACKER RC (2014) Seed germination response to temperature for a range of international populations of *Conyza canadensis*. *Weed Research* **54**, 178–185.

TREZZI MM, VIDAL RA, PATEL F, MIOTTO E, DEBASTIANI F, BALBINOT AA, MOSQUEN R (2015) Impact of *Conyza bonariensis* density and establishment period on soyabean grain yield, yield components and economic threshold. *Weed Research* **55**, 34–41.

WU H, WALKER S, ROLLING MJ, YUEN DK, ROBINSON G& WERTH J (2007) Germination, persistence, and emergence of flaxleaf fleabane (*Conyza bonariensis* (L.) Cronquist). *Weed Biology and Management* **7**, 192–199.

ZAMBRANO-NAVEA C, BASTIDA F, GONZALEZ-ANDUJAR JL (2013) A hydrothermal seedling emergence model for *Conyza bonariensis*. *Weed Research* **53**, 213–220.

SANZ ELORZA M, DANA SÁNCHEZ ED, SOBRINO VESPERINAS E. (2004). *Atlas de las Plantas Alóctonas Invasoras en España*. Dirección General para la Biodiversidad. Madrid, 384 pp.

Germination behavior of different populations of *Conyza bonariensis* to constant temperatures

Summary: *Conyza bonariensis* is one of the most problematic weed species across the world. Its emergence timing is critical for a successful control. However, different populations may vary in their germination requirements. Therefore, knowledge of the germination response of this species depending on the origin (and therefore, climate) can be a useful tool in order to improve already developed germination / emergence models. Four *C. bonariensis* populations were collected from different locations (Lleida, Badajoz and Seville from Spain and Bahía Blanca from Argentina). Seeds were maintained at constant temperatures of 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 35ºC in growth chambers. Results show that all populations behaved similarly, but differences appeared at extreme temperatures (5, 10 and 30ºC). Highest germination percentages were obtained at 20ºC, while no germination was observed at 35ºC in any of the populations. Results suggest the presence of differences between populations on the threshold parameters.

Keywords: Weed control, germination, weeds, integrated weed management.

Cruzabilidad entre maíz (*Zea mays*) y teosinte (*Zea mays* ssp. *mexicana* y *Zea mays* ssp. *parviglumis*) y caracterización morfológica de los híbridos obtenidos

ARIAS-MARTIN M, ESCORIAL MC, CHUECA MC, LOUREIRO I

Dpto. Protección Vegetal. INIA. Ctra. La Coruña Km. 7,5 28040 Madrid, ESPAÑA.
arias.maria@inia.es, escorial@inia.es, chueca@inia.es, loureiro@inia.es

Resumen: Teosinte es un conjunto de especies y subespecies del género *Zea*, entre las que se encuentra el ancestro silvestre del maíz (*Zea mays* L.). En España se tuvo la primera constancia de su presencia en 2014, como mala hierba en campos de maíz de Aragón y Cataluña. El origen común entre maíz y teosinte hace posible su cruzamiento de forma espontánea. El objetivo del estudio fue determinar la capacidad de hibridación entre el maíz y dos teosintes, *Zea mays*. ssp. *mexicana* L. (Schrad) Iltis y *Zea mays* ssp. *parviglumis* Iltis & Doebley, y caracterizar morfológicamente los híbridos obtenidos. Para ello, se llevaron a cabo cruzamientos de floración libre entre teosinte como parental femenino y maíz como masculino en condiciones ambientales no controladas. En los cruces con dos muestras de *Z. m.* spp. *mexicana* se obtuvieron porcentajes de hibridación de 1,6% y 13,3%. Con *Z. m.* spp. *parviglumis* se observó una marcada asincronía temporal en la fase reproductiva con el maíz, lo que sólo permitió el cruce de una pareja de plantas, obteniéndose un porcentaje de hibridación del 6,7%. Los híbridos de *Z. m.* spp. *mexicana* y maíz fueron fértiles y tuvieron una morfología intermedia entre ambos parentales.

Palabras clave: hibridación, maíz, teosinte, *Bt*, F_1, riesgo medioambiental

1. Introducción

El teosinte es el nombre común con el que se conoce a un conjunto de especies y subespecies del género *Zea*, entre las que se encuentra el ancestro silvestre del maíz (*Zea mays* L.). Su centro de origen se encuentra en México y Mesoamérica, aunque también se ha localizado como planta exótica invasora en regiones de África, Asia oriental y tropical, Australia y sur de EE.UU. En la unión Europea (UE), se ha citado su presencia en Francia y España (EFSA, 2016). En España se tuvo la primera constancia en 2014, localizándose como mala hierba en campos de maíz de Aragón y, en menor medida, en Cataluña (Pardo *et al.,* 2014). Esta mala hierba llega a ocasionar una reducción del 28% de la cosecha de maíz, por lo que se han puesto en marcha diferentes medidas de control para contener su avance (Pardo *et al.,* 2016). El parentesco entre el maíz y el teosinte dificulta su identificación en los campos de maíz, así como su control con métodos

químicos, ya que no existen en la actualidad herbicidas selectivos. Esta semejanza hace además posible que maíz y teosinte puedan hibridar de forma espontánea (Wilkes, 1977) dificultando aún más su detección.

Por otro lado, España es el país de la UE con mayor superficie cultivada de maíz genéticamente modificado (GM), maíz que expresa la toxina Cry1Ab resistente a insectos (maíz *Bt*), concentrándose ese cultivo en la zona del Valle del Ebro (MAGRAMA, 2019). En la evaluación de riesgo medioambiental del cultivo de maíz GM en la UE no había sido considerado el riesgo de flujo de genes del maíz GM a otras plantas al no existir en la UE parientes silvestres relacionados con el maíz. Sin embargo, la detección de teosinte en esas regiones y la posibilidad de hibridación entre el maíz y el teosinte puede plantear la necesidad de revisar esta evaluación. *Zea mays*. ssp. *mexicana* L. (Schrad.) Iltis y *Zea mays* ssp. *parviglumis* Iltis & Doebley son las especies que están más estrechamente relacionadas con el maíz (Doebley, 2004). En un estudio reciente, Tritkova *et al.* (2017) describen que el teosinte encontrado en España no se agrupa en ninguno de los taxones reconocidos y podría ser de origen mixto, con *Z. m.* ssp. *mexicana* como taxón parental y una variedad de maíz cultivado no identificado.

El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad de hibridación entre maíz y estas dos especies de teosinte, y realizar la caracterización morfológica de híbridos previamente obtenidos entre *Z. m*. ssp. *mexicana* y el maíz.

2. Material y Métodos

2.1. Material vegetal. Para la realización del estudio se utilizó la variedad de maíz (*Z. mays.*) DKC6451YG, que expresa la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* (maíz *Bt*, evento MON810). Este maíz es heterocigótico para el transgen que confiere resistencia a determinados insectos plaga del maíz. El material de teosinte utilizado fueron varias entradas procedentes del banco de germoplasma del USDA: Ames 21860 y Ames 21851 de *Z. m.* ssp. *mexicana*, que se denominaron Tm4 y Tm5, respectivamente, y Ames 21785 de *Z. m.* ssp. *parviglumis*, denominada Tp1.

2.2. Realización de cruzamientos teosinte ♀ x *maíz* ♂. En los meses de marzo y abril de 2018 se sembraron plantas de *Z. m.* ssp. *mexicana* y *Z. m.* ssp. *parviglumis* en tiestos con una mezcla de tierra:mantillo:arena (1:1:1) fertilizados con NPK (12:6:12, 300 kg ha^{-1}). En el caso del maíz, para asegurar el solapamiento en la época de floración entre maíz y teosinte, se realizaron diferentes siembras seriadas a intervalos de 2 a 3 semanas desde marzo hasta julio. Cuando las plantas de maíz estaban entre V4-V6, todas las plantas se fertilizaron con urea (300 kg ha^{-1}). Los tiestos se regaron con un sistema de riego automático por goteo según la necesidad de las plantas.

En el momento de la floración de *Z. m. ssp. mexicana*, se colocaron 5 plantas de teosinte junto a 5 plantas de maíz (1:1) en el interior de un jaulón cerrado con doble visillo para su polinización libre en condiciones de competencia de polen. Puesto que la floración del teosinte es más duradera que la del maíz, una vez finalizada la producción de polen

de las plantas de maíz, éstas se retiraron y se introdujeron 5 nuevas plantas para prolongar la disponibilidad de polen. Los granos formados permanecieron en las plantas madre de *Z. m. ssp. mexicana* hasta su maduración y recolección. Los cruzamientos se realizaron dentro de jaulones situados en el exterior de las instalaciones del INIA (40º 27´ N; 3º 45´O) en condiciones ambientales no controladas. *Zea m.* ssp. *parviglumis* comenzó su floración en octubre de 2018 cuando el polen de la última siembra de maíz estaba prácticamente finalizado y sólo se consiguió solapar la floración de una planta de teosinte con una planta maíz. Debido a la gran diferencia de altura entre el tallo principal de *Z. m.* ssp. *parviglumis* (3,5 m aprox.) y el maíz (1,8 m aprox.), se seleccionó en la planta de teosinte un tallo similar en altura a la planta de maíz y se eliminó el resto de tallos para posibilitar el cruzamiento. El cruzamiento se realizó en el interior de un invernadero, pero sin control de las condiciones ambientales. Los granos formados permanecieron en las plantas madre de *Z. m.* ssp. *parviglumis* hasta su maduración y recolección.

2.3. Identificación de los híbridos. Un mínimo del 20% de las semillas recogidas de cada planta madre de teosinte se desinfectaron con una mezcla de lejía y detergente (Domestos ®) al 7% durante 10 minutos y se aclararon tres veces con agua. Las semillas se sembraron en una mezcla al 50% de tierra:mantillo:arena (1:1:1) y vermiculita, anotándose la germinación. La identificación de las plantas F_1 híbridas entre las dos especies de teosinte y maíz se realizó mediante el análisis de la presencia de toxina Cry1Ab por ELISA (AgraStrip® Cry1Ab Seed and Leaf) cuando las plantas se encontraban el estado de 3-4 hojas.

2.4. Fenología de los híbridos Z. m. ssp. *mexicana* x maíz. Se estudió la fenología de 5 plantas híbridas obtenidas en los cruzamientos realizados en 2017 entre *Z. m.* ssp. *mexicana* Tm4 como parental femenino y maíz *Bt* como parental masculino (Escorial *et al.,* 2019). En el momento de la floración, las plantas se aislaron de forma individual para evaluar su fertilidad por autofecundación. Cuando alcanzaron la madurez, se midió la altura de las plantas y el número de tallos, de inflorescencias femeninas y de semillas. Estos parámetros también se registraron para 10 plantas del parental teosinte.

3. Resultados y Discusión

La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos para el cruzamiento entre las dos muestras de *Z. m.* spp. *mexicana* y maíz. En el caso de Tm4, se recogieron un total de 272 semillas en las 5 plantas de teosinte, mientras que para Tm5 se recogieron 979 semillas. El porcentaje de germinación de las semillas fue similar en ambo casos, entre el 21-25%. Se obtuvieron un total de 9 plantas híbridas con Tm4 y 2 para Tm5, lo que corresponde a unos porcentajes estimados de hibridación del 13,3% y 1,6%, respectivamente. En el caso del cruzamiento con Tm4, esta tasa de hibridación es mayor que la obtenida por Ellstrand *et al.* (2007), que indica que la hibridación espontánea entre teosinte mexicana y maíz está por debajo del 1%. Además, esta tasa obtenida con Tm4 es similar a los valores obtenidos en ensayos realizados en 2017 (19,2%) (Eescorial *et al.,* 2019).

Tabla 1. Hibridación entre *Z. m.* ssp. *mexicana* y maíz. Se indica el número de semillas recogidas por planta, porcentaje de germinación y porcentaje de hibridación estimada.

Z. m. **spp.** ***mexicana***	**Nº Semillas por planta (media ± DE)**	**Germinación[1] (%)**	**Nº híbridos detectados (estimados)[2]**	**Hibridación estimada (%)**
Tm 4	272 (54,4 ± 22,3)	25,2	9 (18)	13,3
Tm 5	979 (195,8 ± 10,6)	21,3	2 (4)	1,6

[1] Para Tm4 se analizaron 135 semillas y para Tm5 244 semillas.
[2] La identificación de híbridos se realizó mediante detección de la proteína Cry1Ab por ELISA. El porcentaje de híbridos obtenidos se multiplicó por dos debido a que el parental de maíz era heterocigótico para el carácter dominante de producción de toxina Cry1Ab.

En el caso del cruzamiento entre *Z. m. ssp. parviglumis* x *Z. mays,* se obtuvieron 30 semillas, de las que sólo germinaron dos. El porcentaje de hibridación estimado para esta especie fue del 6,7%. Este porcentaje es menor que el encontrado en el estudio de Ellstrand *et al.* (2007), en el que se obtuvo un porcentaje de hibridación del 50%, y en el que también señalaron las mismas dificultades para conseguir los cruzamientos. Aunque no parecen existir incompatibilidades de hibridación entre las dos especies, el que no solapen en la floración en determinadas condiciones, reduciría la posibilidad de cruzamientos espontáneos. Puesto que los datos presentados proceden de un único cruzamiento en condiciones diferentes de las naturales de campo, es necesario realizar más ensayos para confirmar o rechazar estos resultados preliminares.

Las plantas híbridas obtenidas de los cruzamientos entre *Z. m.* spp. *mexicana* Tm4 y maíz presentaron entre 1 y 4 tallos con una altura media de 127 cm. El número de inflorescencias femeninas producidas fue menor que en el caso del parental silvestre, pero con un mayor número de semillas por planta (Tabla 2, Figura 1).

Tabla 2. Parámetros morfológicos (media ± DE) de plantas de teosinte (*Z. m.* spp. *mexicana*) y de plantas F_1 híbridas entre *Z. m.* spp. *mexicana* Tm4 y *Z. mays*.

Plantas	**Altura (cm)**	**Nº tallos**	**Nº inflorescencias femeninas**	**Nº semillas por planta**
Z. m.* spp. *mexicana	155 ± 6,4	3,5 ± 0,4	36,9 ± 9,9	47,7 ± 11,1
F_1 Tm4 x maíz	127 ± 6,4	2,0 ± 0,5	9,6 ± 1,2	67,8 ± 19,5



Figura 1. Morfología de las plantas de (a) teosinte (*Z. m. ssp. mexicana*) y (b) F_1 híbrida entre *Z. m. ssp. mexicana* y *Z. mays*.

La semilla F_2 recogida de las plantas híbridas tras su autofecundación fue viable, con un germinación media de 79,5% ± 6,3, similar a la citada por ELLSTRAND *et al.* (2007).

Según los resultados obtenidos, diferentes accesiones de la misma especie de teosinte pueden tener diferente cruzabilidad con el maíz. Esto puede ser debido a diversos factores entre los que se pueden encontrar variaciones genéticas, condiciones ambientales y/o la sincronización en los periodos de floración entre especies. En la actualidad se están llevando a cabo nuevos ensayos de cruzabilidad que permitirán adquirir más conocimientos sobre la posible hibridación del teosinte-maíz en nuestras condiciones.

Referencias

DOEBLEY J (2004) The genetics of maize evolution. Annual Review of Genetics. **38**, 37-59.

ELLSTRAND NC, GAENER LC, HEGDE S, GUADAGNUOLO R & BLANCAS L (2007) Spontaneous hybridization between maize and teosinte. Journal of Heredity **98**,183-187.

ESCORIAL C, CHUECA C & LOUREIRO I (2019) Hybridization between maize (*Zea mays*) and teosinte *Z. mays* ssp. *mexicana* and *Z. mays* ssp. *parviglumis*. 15th International Society for Biosafety Research, Tarragona, España.

EFSA, European Food Safety Authority (2016) Technical Report; Relevance of new scientific evidence on the occurrence of teosinte in maize fields in Spain and France for previous environmental risk assessment conclusions and risk management recommendations on the cultivation of maize events MON810, Bt11, 1507 and GA21. EFSA supporting publication 2016: EN-1094. 13 pp.

MAGRAMA (2019) Estimación superficie cultivada de maíz MON 810 por provincias. En: https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/biotecnologia/organismos-modificados-geneticamente-omg-/consejo-interministerial-de-ogms/superficie.aspx (Último acceso: 8 julio 2019).

PARDO G, CIRUJEDA A, BETRÁN E, FERNÁNDEZ-CAVADA S, FUERTES S, RODRÍGUEZ E, PERDIGUER A, AIBAR J & ZARAGOZA C (2014) El teosinte (*Zea mays*, spp.). Informaciones técnicas

gobierno de Aragón (Dirección General de Alimentación y Fomento Agroalimentario, Centro de Sanidad y Certificación Vegetal).

PARDO G, CIRUJEDA A, MARÍ AI, AIBAR J, FUERTES S & TABERNER A (2016) El teosinte: descripción, situación actual en el valle del Ebro y resultados de los primeros ensayos. Vida Rural **408**, 42-48.

TRITKOVA M, LOHN A, BINIMELIS R, CHAPELA I, OEHEN B, ZEMP N, WIDMER A & HILBECK A (2017). Teosinte in Europe - searching for the origin of a novel weed. Scientific Reports **7**, 1560.

WILKES HG (1977) Hybridization of maize and teosinte, in Mexico and Guatemala and improvement of maize. Economic Botany **31**, 254-293.

Crossability between maize (*Zea mays*) and teosinte (*Z. mays* ssp. *mexicana* and *Z. mays* ssp. *parviglumis*) and morphological characterization of the hybrids

Summary: Teosinte is a group of Zea species and subspecies, among which is the wild ancestor of maize (*Zea mays* L.). The first evidence of its presence in Spain was reported in 2014, as a weed in maize fields in Aragon and Catalonia. The common origin between maize and teosinte allows their spontaneous hybridization. The aim of this study was to assess the potential hybridization between maize and two teosintes, *Zea mays* ssp. *mexicana* L. (Schrad) Iltis and *Zea mays* ssp. *parviglumis* Iltis & Doebley, and to characterize the morphology of the obtained hybrids. For this purpose, crosses between teosinte as female parent and maize as male parent have been carried out under non-controlled environmental conditions. Hybridization rates of 1.6% and 13.3% were obtained in the experimental crosses between two different *Z. m.* spp. *mexicana* accessions and maize. In the case of the crosses with *Z. m.* spp. *parviglumis*, a significant asynchrony was observed in the reproductive phases between this species and maize, which only allowed to cross a pair of plants, in which hybrids were obtained at a 6.7% rate. The hybrids between *Z. m.* spp. *mexicana* and maize are fertile and have an intermediate morphology between parents.

Keywords: Hybridization, maize, teosinte, *Bt*, F_1, environmental risk

¿Podemos implementar métodos eficaces para controlar la invasora *Acacia melanoxylon*?

RODRÍGUEZ J, LECHUGA-LAGO Y, GUISANDE-COLLAZO A, LORENZO P, GONZÁLEZ L

[1, 2, 3, 5] Plant Ecophysiology Group, Department of Plant Biology and Soil Science, University of Vigo, 36310 Vigo, Spain.
jonatan@uvigo.es, *yaiza@uvigo.es*, *aleguisande@uvigo.es*, *luis@uvigo.es*
[4] Centre for Functional Ecology - Science for People & the Planet (CFE), Department of Life Sciences, University of Coimbra, Calçada Martim de Freitas, 3000-456 Coimbra, Portugal.
paulalorenzo@uc.pt

Resumen: La invasión de plantas exóticas altera los ecosistemas autóctonos al reducir la biodiversidad y producir un impacto severo en los servicios ecosistémicos. El árbol leguminoso *Acacia melanoxylon* está invadiendo actualmente sistemas agroforestales, alterando la dinámica de los ecosistemas en el noroeste de la península ibérica. Es necesario establecer estrategias de manejo apropiadas para controlar la propagación de esta especie y recuperar los hábitats agroforestales invadidos. En el presente estudio, comparamos diferentes métodos de control que consistieron en (i) cortar el árbol, (ii) cortar y aplicar herbicida (Triclopyr al 1%, inmediatamente después de cortar) sobre el tocón y (iii) descortezar, combinándolos todos con la retirada o no de la hojarasca superficial en un intento de evaluar la capacidad de regeneración de la flora. Determinamos la capacidad de rebrote y el estado de los árboles de acacia, mediante controles visuales en cada individuo, a lo largo de ocho meses después de aplicar los tratamientos. Nuestros resultados mostraron que la aplicación del herbicida en el tocón tras el corte evita el rebrote y el descortezado produce clorosis y defoliación. Ambos tratamientos fueron muy efectivos y causaron daños irreversibles a los árboles. La retirada de la hojarasca redujo el incremento en diámetro en los árboles cortados; en cambio, no favoreció la recuperación de las especies de plantas nativas durante el estudio. En general, sugerimos la aplicación localizada del herbicida en el tocón y el descortezado como métodos eficaces y más amigables con el medio para controlar la invasora *A. melanoxylon,* pudiendo ayudar a los agentes implicados a definir estrategias de manejo efectivas para reducir la propagación de esta especie.

Palabras clave: Invasiones biológicas, herbicida en el tocón, descortezado, retirada de hojarasca

1. Introducción

Acacia melanoxylon R. Br. es uno de los árboles exóticos más extendidos en el noroeste de la península ibérica (Hernández et al. 2014). Esta especie es nociva para los sistemas agroforestales, no solo por su capacidad competitiva sino también por su capacidad de transformar los hábitats, alterando el funcionamiento normal de los ecosistemas (Souza-Alonso et al. 2017). Su capacidad invasiva está bien documentada; forma densas masas monoespecíficas que impiden el paso de la luz, reduce la diversidad de plantas nativas en el sotobosque, y altera de forma severa los servicios ecosistémicos, resultando en una gran pérdida de biodiversidad (Bejarano 2015; Hernández et al. 2014; Vicente et al. 2013). *Acacia melanoxylon* se introdujo en Europa durante la primera mitad del XIX para su uso en silvicultura, estabilización del suelo y jardinería (Castroviejo et al. 1999), y actualmente podemos encontrarla en áreas forestales y/o márgenes de las carreteras (observación personal). En los últimos años, el aumento de su distribución ha sido imparable (Hernández et al. 2014); por ello, es extremadamente necesario implementar nuevas estratégicas de manejo efectivas para controlar la expansión y recuperar los hábitats agroforestales invadidos. En este trabajo nos centramos en evaluar la efectividad de varios métodos de control que consistieron en: (i) cortar el árbol, (ii) cortar y aplicar herbicida sobre el tocón (Triclopyr al 1%, inmediatamente después de cortar) y (iii) descortezar; combinándolos todos ellos con retirar o sin retirar la hojarasca. Para poder alcanzar nuestro objetivo, tuvimos en cuenta su gran capacidad de rebrote y el efecto de la hojarasca sobre la germinación de las plantas nativas (Souza-Alonso et al. 2017).

2. Materiales y Métodos

Este trabajo se desarrolló en los montes de Couso, Concello de Gondomar (42°05'47.2"N, 8°44'47.6"W; Galicia, España), en una parcela de 5000m^2, desde septiembre de 2017 hasta mayo de 2018. Dentro de esta parcela, se seleccionaron un total de 80 árboles de *A. melanoxylon* con diámetros comprendidos entre 5 – 15 cm, que fueron etiquetados y atribuidos aleatoriamente a cada tratamiento, con un total de 10 individuos por cada uno de los tratamientos. El primer tratamiento (corte), consistió en cortar el árbol con una sierra de mano a unos 10 cm de la base. El segundo (corte + herbicida), consistió también en cortar el árbol del mismo modo, pero aplicando herbicida (Triclopyr al 1%) inmediatamente sobre el tocón tras el corte. El tercero de los tratamientos (descortezado), se llevó a cabo mediante la retirada de la corteza desde una altura aproximada de 100-120 cm hasta la base del árbol, retirando la corteza hasta 10 cm por debajo del suelo (parte que se enlaza con la raíz). Finalmente, para aquellos individuos que actuaron como control no se les aplicó tratamiento. Todos estos tratamientos fueron combinados con retirada o no retirada de la hojarasca, en un área alrededor de cada individuo de al menos 50 cm. Para el seguimiento, se realizaron mediciones tanto iniciales como finales del diámetro en la base del árbol (a unos 10 cm del suelo) y vegetación predominante circundante para evaluar las posibles variaciones

producidas por la aplicación de los distintos tratamientos. Además, también evaluamos el número de rebrotes y el estado fisiológico de los árboles de acacia, mediante controles visuales por cada uno de los individuos.

3. Resultados y Discusión

Nuestros resultados mostraron que la aplicación del herbicida en el tocón tras el corte evita el rebrote; mientras que el descortezado produce clorosis y defoliación, deteniendo totalmente su crecimiento (Fig. 1). Además, la retirada de la hojarasca redujo el incremento en diámetro en los individuos cortados sin y con aplicación de herbicida ($\chi^2_{1,40}$ = 0.15625, p=0.001; Fig. 1A). Sin embargo, no afectó a aquellos individuos de acacia que mantuvieron el tronco (tratamientos control y descortezado; Fig. 1B), ni tampoco favoreció a la recuperación de las especies nativas durante el estudio (datos no presentados). En cambio, nuestros resultados mostraron que prácticamente no incrementa el diámetro en aquellos individuos que fueron descortezados ($\chi^2_{1,40}$ = 1.35056, p=0.001; Fig. 1B).

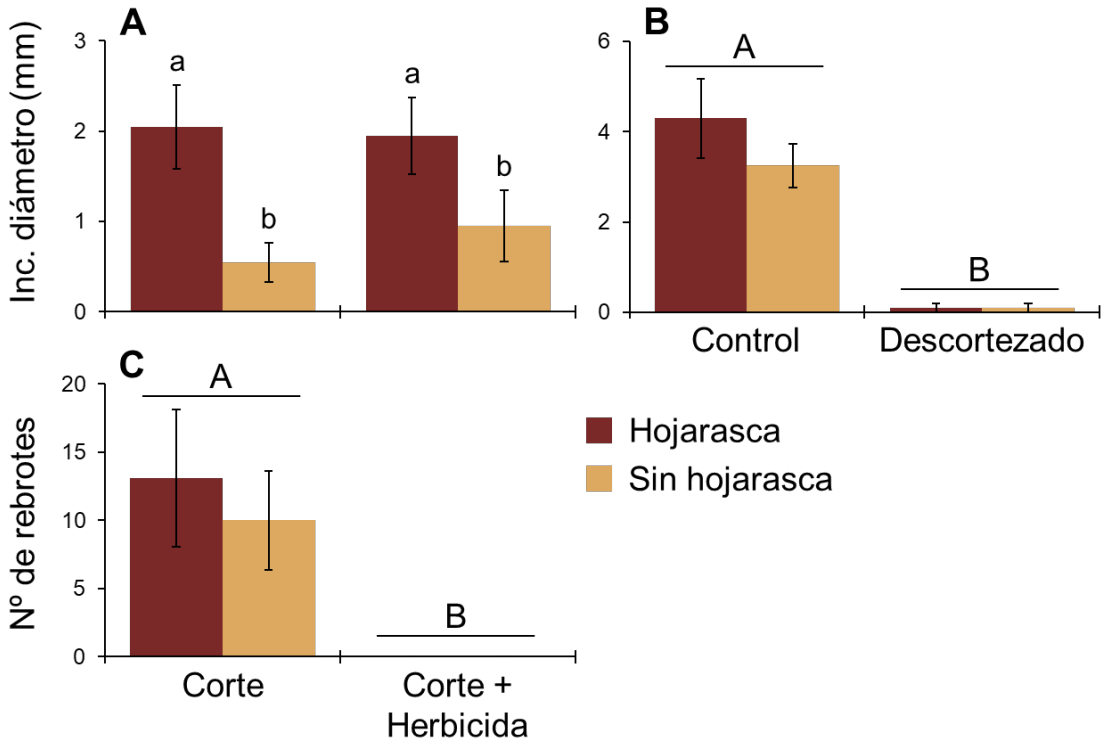


Figura 1. Efecto de los métodos de manejo (corte, corte + herbicida, descortezado y control) sobre el incremento en diámetro (A y B) y el número de rebrotes (C), teniendo en cuenta la presencia o ausencia de hojarasca en el suelo. Se muestran los valores medios ± error estándar, n = 10. Letras diferentes indican significación estadística en un nivel de $p \leq 0.05$ utilizando modelos lineales generalizados (GLMs).

Souza-Alonso et al., (2013) demostraron (para la especie *Acacia dealbata*) que la aplicación de herbicida en el tocón tras el corte evita completamente el rebrote. Nuestros resultados sugieren lo mismo para *A. melanoxylon*, demostrando que este

método es totalmente efectivo para evitar el rebrote de los individuos ($\chi^2_{1,40}$ = 1334.03, *p*=0.001; Fig. 1C). El descortezado también resultó ser un método eficaz para evitar el rebrote de los individuos, donde no se registraron rebrotes al igual que ocurrió con los árboles control. Además, cabe destacar que el uso de sólo corte es totalmente desaconsejable, ya que favorece de forma considerable la alta aparición de rebrotes (entre 10-13 rebrotes de media por cada individuo) sin importar la retirada o no de hojarasca (Fig. 1C).

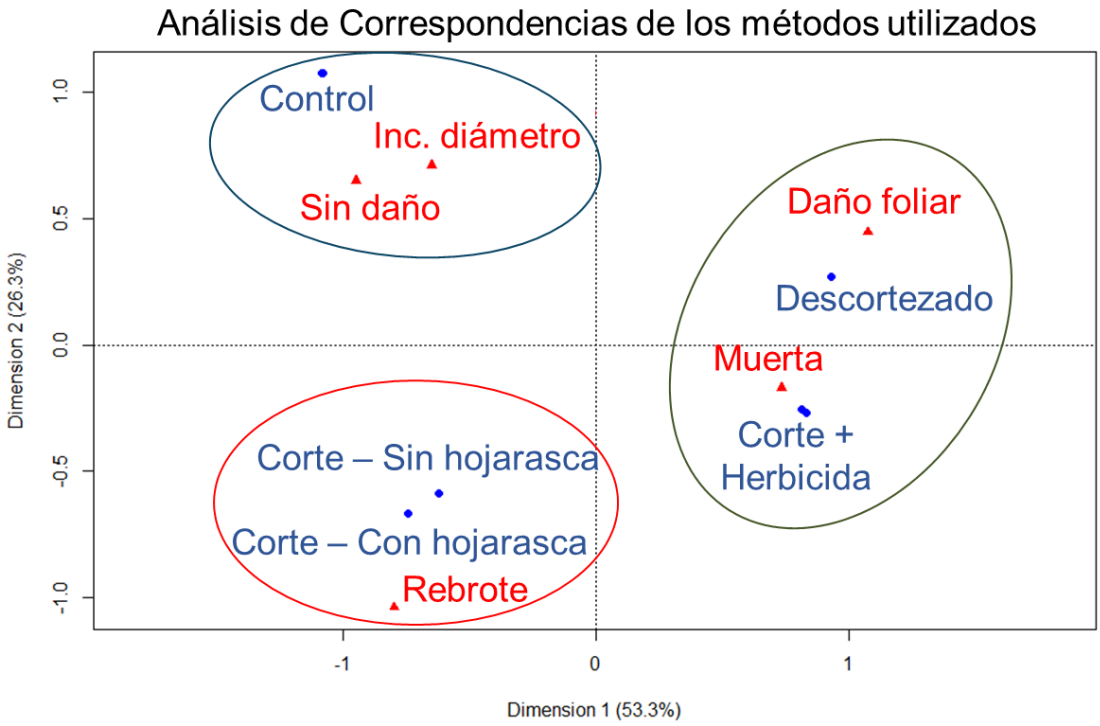


Figura 2. Análisis de correspondencias en donde se relacionan todos los métodos empleados (en azul) en conjunto con los parámetros fisiológicos y morfológicos (en rojo) que se utilizaron para comprobar la efectividad de cada uno de los tratamientos. Inc. diámetro = incremento en diámetro.

De forma general, la aplicación del herbicida en el tocón y el descortezado son métodos útiles para controlar la invasora *A. melanoxylon*. Ambos tratamientos fueron muy efectivos y causaron daños irreversibles a los árboles (Fig. 2). Sin embargo, durante la duración de nuestro estudio, la retirada de hojarasca no favoreció la germinación y aparición de plantas autóctonas. Este hecho, podría estar relacionado con el período de seguimiento del efecto de los distintos tratamientos, el cual coincidió fundamental con el otoño e invierno, épocas poco favorables para la germinación y establecimiento de plantas en esta latitud. Comparando los dos tratamientos más eficaces, es sorprendente que en tan solo ocho meses las acacias descortezadas hayan detenido casi completamente su crecimiento, y su estado fisiológico resultara gravemente comprometido. Este tratamiento presenta aspectos muy positivos, ya que es un método mecánico amigable con el medio ambiente y tiene la ventaja de que el tronco permanece en su sitio. Esto favorece la formación de sombra, controlando la germinación de nuevas acacias y reduciendo el crecimiento de las que permanezcan (Jennings et al.,

2003). Sin embargo, hay que tener en cuenta que este método puede tener un riesgo añadido, ya que los troncos muertos que no han sido retirados pueden ser susceptibles de colapsar y derrumbarse en cualquier momento, incrementándose el riesgo cuanto más grande sea el tamaño del árbol.

4. Agradecimientos

Agradecemos a la Asociación de Custodia del Territorio VerdeVal y a la Comunidad de Montes de Couso, Gondomar (Pontevedra, Galicia) su autorización y colaboración en el desarrollo del estudio. Este trabajo se ha desarrollado en el marco del "Centro de Investigaciones Agroambientales y Alimentarias (CIA)" y actual Agrupación Estratégica del Sistema Universitario de Galicia "Clúster de Investigación y Transferencia Agroalimentaria del Campus del Agua (CITACA)" de la Universidad de Vigo (España), que cuenta con el respaldo económico de la Xunta de Galicia (ED431E2018/07). JR recibió el apoyo de un contrato de investigación del "Plan de mellora do Centro de Investigacións Agroalimentarias CIA3 do Campus de Ourense, Universidade de Vigo". PL recibió una beca-contrato de la Fundação para a Ciência e Tenologia (FCT) y el Fondo Social Europeo (SFRH/BPD/88504/2012; IT057-18-7248).

Referencias

BEJARANO JHS (2015) Evaluación de la regeneración de *Acacia decurrens*, *Acacia melanoxylon* y *Ulex europaeus* en áreas en proceso de restauración ecológica. *Luna Azul* **34**:66-80.

CASTROVIEJO S, TALAVERA S, AEDO C et al. (1999) Flora Ibérica: plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid, Madrid.

HERNÁNDEZ L, MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ J, CAÑELLAS I, DE LA CUEVA AV (2014) Assessing spatio-temporal rates, patterns and determinants of biological invasions in forest ecosystems. The case of *Acacia* species in NW Spain. *Forest Ecology Management* **329**:206–213.

JENNINGS SM, WILKINSON GR, UNWIN GL (2003). Response of blackwood (*Acacia melanoxylon*) regeneration to silvicultural removal of competition in regrowth eucalypt forests of north-west Tasmania, Australia. *Forest Ecology Management* **177**:75-83.

SOUZA-ALONSO P, LORENZO P, RUBIDO-BARÁ M, GONZÁLEZ L (2013) Effectiveness of management strategies in *Acacia dealbata* Link invasion, native vegetation and soil microbial community responses. *Forest Ecology Management* **304**:464–472.

SOUZA-ALONSO P, RODRÍGUEZ J, GONZÁLEZ L, LORENZO P (2017) Here to stay. Recent advances and perspectives about *Acacia* invasion in Mediterranean areas. *Annals of Forest Science* **74**:55.

VICENTE JR, FERNANDES RF, RANDIN CF et al. (2013). Will climate change drive alien invasive plants into areas of high protection value? An improved model-based regional assessment to prioritise the management of invasions. *Journal of Environmental Management* 131:185-195.

Can we implement useful methods for controlling the invasive *Acacia melanoxylon*?

Summary: Non-native plant invasions modify native ecosystems by reducing biodiversity and producing a severe impact on ecosystem services. The leguminous tree *Acacia melanoxylon* is currently invading native agroforestry systems disrupting the normal ecosystem functioning in NW Iberian Peninsula. It is necessary to recover the invaded agroforestry habitats for establishing appropriate management strategies to control the spread of this species. Here, we evaluated different control methods consisted of (i) cutting the tree, (ii) cutting and applying herbicide (Triclopyr 1%, immediately after cutting) on the cut-stump and (iii) debarking, combined all of them with or without removing the litter. We assessed the sprouting, diameter increment and performance of acacia trees by visual-spot checks during eight months after the application of the treatments. Our results showed that cut-stump plus herbicide prevents sprouting and debarking produced chlorosis and defoliation. Both treatments were very effective and caused irreversible damages to the trees. Litter removal reduced the diameter increment of cut acacia trees but not favoured the recovering of native plant species during the study. Overall, we suggest the application of cut-stump plus herbicide and debarking as useful and more eco-friendly methods to control the invasive *A. melanoxylon*, which may help stakeholders to define effective management strategies for reducing the spread of this species.

Keywords: Biological invasions, cut-stump herbicide, debarking, litter removal

Control y capacidad de rebrote de *Ailanthus altissima*

SOLER J[1a], SOLER L[1], IZQUIERDO J[1], VILAMÚ J[2]
[1]Departament d'Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia, UPC. Campus Baix Llobregat. Ed. D4. 08860 Castelldefels, [a]
soleraaa@hotmail.com
[2] Servei de Medi Natural. Parc Natural de la Serra de Collserola. Ctra. de l'Església, 92, 08017 Barcelona

Resumen: El ailanto (Ailanthus altissima) es una especie exótica invasora cuya presencia en espacios naturales dificulta el desarrollo de la vegetación autóctona por lo que es necesario tomar medidas para su erradicación consistentes en conocer su capacidad de rebrote y la eficacia de diferentes herbicidas. En otoño, el corte de árboles de diámetro < 3 cm y pintura de la superficie del tocón con Triclopir (48%) diluido al 20 y 40% provocó la muerte de todos los individuos, aunque brotes conectados a los mismos no se vieron afectado. Los tratamientos con Triclopir (48%) y Clopiralida (72%) realizados en otoño diluidos al 50 y 80% realizaron un control del 100% y 96% respectivamente de los árboles. En primavera, ambos productos diluidos entre un 10 y un 80% mostraron mayor control a menor dilución. Inyecciones con vinagre, un detergente doméstico y el tensioactivo Lauril éter sulfato sódico realizadas por separado a tocones de árboles cortados no mostraron ningún control sobre los mismos. En un ensayo paralelo se observó que fragmentos de rizoma de 5 cm de longitud y 3-4 mm de diámetro generaron brotes y fragmentos de 7 cm y 7-8 mm de diámetro generaron brotes y también raíces, en condiciones ambientales naturales.

Palabras clave: *Ailanthus*, inyección al tronco, triclopir, clopiralida, vinagre, detergente, tensioactivo, rizoma.

1. Introducción

El ailanto es una especie exótica invasora regulada tanto a nivel europeo, (Europa, R 2016/1141) como español (España RD 630/2013) que se localiza principalmente a lo largo de vías de comunicación (Constán Nava, 2013) y en zonas alteradas por el hombre. Se halla también naturalizado de forma abundante en el Parque Natural de la Sierra de Collserola en Barcelona, dónde sus técnicos llevan años combatiéndolo con diferentes estrategias. Actualmente se usa la técnica de inyección al tronco con Glifosato 36%, pero debido a la próxima prohibición de este herbicida en Europa es necesario disponer de productos eficaces alternativos para su control. En un estudio previo se observó que Triclopir y Clopiralida inyectados en la base del tronco provocaban la muerte de todos los individuos inyectados (Soler *et al*., 2017). Sin

embargo, la técnica de inyección no es posible si los árboles son muy jóvenes, ya que no se pueden hacer agujeros en el tronco si el diámetro es muy pequeño. Una alternativa sería cortar y extender el producto con un pincel sobre el tocón. Por otro lado, se sabe que el ailanto tiene una elevada capacidad de rebrote a partir de sus rizomas (Inverso & Bellani, 1991) por lo que es también interesante conocer el tamaño mínimo de un rizoma a partir de la cual éste puede rebrotar, para optimizar la gestión de sus restos vegetales.
Los objetivos de este trabajo son 1) determinar la efectividad de Triclopir aplicado con pincel en árboles de diámetro inferior a 3 cm en otoño, 2) determinar la dosis mínima efectiva de Triclopir y Clopiralida, inyectados en árboles de diámetro superior a 10 cm en otoño y en primavera, 4) determinar la eficacia de productos alternativos no tóxicos como vinagre, detergente y un tensoactivo en árboles de diámetro inferior a 10 cm en verano y 5) evaluar la capacidad de rebrote de fragmentos de rizoma.

2. Material y Métodos

2.1 Ensayos con control químico.

Los ensayos se realizaban en zonas con ailanto del Parque. En el ensayo del pincel, se cortaban los árboles seleccionados a unos 0,5 m de altura y se extendía el producto con un pincel por la superficie del tocón, mojándolo bien. En los ensayos de inyección al tronco, se realizaban agujeros alrededor del tronco a pocos cm del suelo y se introducía el producto con una jeringa hasta llenar cada agujero. Solo en el ensayo E4 se tomaron los datos por repeticiones. Para el resto se anotaron los datos sin distinguir las repeticiones, considerándolas una única repetición.

E1. Técnica del pincel e inyección en otoño: Se cortaron árboles pequeños (< 3 cm de diámetro) y se perforaba o pintaba, la superficie del corte con Triclopir 48% (Garlon 4) diluido al 20% y 40%. En la concentración del 20% se hicieron 3 repeticiones y en la del 40% fueron 4, constando cada repetición de 17 árboles. Con el pincel se aplicaba 1 ml por árbol y 1,5 ml con la inyección de una broca de 5 mm. El ensayo se realizó el día 14/11/2016 y se miró la brotación de los árboles en abril, mayo y junio.

E2. Técnica de la inyección en otoño: Se realizaron 4 tratamientos en árboles de perímetro >10 cm. Productos: Triclopir 48% (Garlon 4) diluido al 25% y 50% y Clopiralida 72% (Lontrel 72) diluida al 50% y 80% inyectados al tocón, con 4 repeticiones de 17 individuos cada una. En cada individuo se inyectaron unos 5 ml usando una broca de 8 mm. El ensayo se realizó los días 15-16/11/16 y se miró la brotación de los árboles en abril, mayo y junio.

E3. Técnica de la inyección en primavera: Se realizaron 8 tratamientos. Productos: Triclopir 48% (Garlon 4) y Clopiralida 72% (Lontrel 72) diluidos al 10%, 20%, 40% y 80% inyectados al tocón, con 4 repeticiones de 15 árboles cada una. En cada individuo se inyectaron unos 5 ml usando una broca de 8 mm. El ensayo se realizó el día 12/04/17. Se hizo un seguimiento mensual del estado de los árboles hasta junio.

E4. Técnica de la inyección con productos alternativos: Se realizaron 3 tratamientos. Productos: 1) detergente comercial (Fairy ultra), 2) vinagre comercial, y 3) tensoactivo (Lauril éter sulfato sódico; Texapon N 40 IS) inyectados al tocón directamente sin diluir. Para cada tratamiento había 3 repeticiones de 10 árboles cada una, más una parcela de control. En la parcela control se realizaron agujeros sin inyectar nada. En cada individuo se inyectaron unos 6 ml usando una broca de 10 mm el día 11/06/18. Se hizo un seguimiento del estado de los árboles a los 15 días y 1, 2 y 4 meses posteriores.

2.2 Ensayos con fragmentos de rizoma

Se realizaron dos ensayos con fragmentos de rizoma recolectados febrero de 2018 procedentes de 5 árboles diferentes que ya habían perdido todas las hojas, por lo que habrían acumulado las reservas máximas. En el ensayo (**R1**) se tomaron trozos de rizoma de 3-4 mm de diámetro y diferentes longitudes (2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 cm). Para cada longitud había 5 repeticiones. En el ensayo (**R2**) se tomaron las mismas longitudes y repeticiones, pero con rizomas de diámetros de 7-8 mm. En total había 70 muestras. Todos los fragmentos de rizoma se enterraron 2 cm en macetas de plástico de 4 L, rellenos con tierra del Parque. Cada semana se regaban las macetas con agua de la red pública y se anotaba el número de hojas y longitud de los brotes que aparecían. El seguimiento finalizó a las 23 semanas, cuando se consideró que ninguna muestra más seria capaz de generar brotes. Los fragmentos no se desenterraron hasta el fin del ensayo para evitar romper posibles raíces o brotes.

3 Resultados y Discusión

3.1 Ensayos para control químico

E1: Murieron todos los brotes tratados. Ejemplares situados muy cerca y que provenían del mismo pie no mostraron afectación. Estos favorables resultados validan la utilización de la técnica de corte + aplicación de herbicida con pincel, en árboles de diámetros que no permiten el uso del taladro para inyectar el herbicida.

E2: Las aplicaciones al 50% de ambos herbicidas presentaron un control total (**Fig. 1**). Se confirman los resultados de Soler *et al*. (2017) aunque Venegas & Pérez (2009) indican que no obtuvieron control aplicando Triclopir 48% sin diluir.

E3: Parece que se obtuvo un mejor control a mayor concentración de herbicida. Aparentemente, Clopiralida pareció ser efectiva en inyecciones en otoño y primavera. Respecto a Triclopir, a dosis similar, parece que se obtuvo menor control que en las inyecciones de otoño del ensayo 2, aunque en primavera presentó un control total a una dosis del 80% (**Fig. 2**). A partir de los resultados de los ensayos 2 y 3 se desprende que la materia activa Clopiralida diluida al 40% se podría considerar una alternativa eficaz al Glifosato para el control del ailanto.

E4: No se observó mortalidad con ningún tratamiento; incluso los árboles inyectados con detergente mostraron una mayor brotación que los testigos. La baja efectividad del vinagre comercial probablemente fue debida a su falta de movilidad dentro de la planta y aunque algunos estudios muestran la efectividad del vinagre (contenido en ácido acético: 12,5%) como desecante en aplicaciones foliares (Lorena *et al*., 2017) parece que su nulo transporte por la planta y la baja concentración de ácido acético (%) del producto comercial no lo han hecho eficaz. Respecto al tensioactivo Lauril éter sulfato sódico (SLES), se esperaba que bajara la presión osmótica del tocón y lo secara (comentario personal Jordi Pons). Además, el SLES está presente como surfactante en formulaciones de Glufosinato (Song *et al*., 2011) y un producto parecido, el Lauril sulfato sódico (SLS), se intenta registrar como producto fitosanitario en producción ecológica en Estados Unidos (Vento, 2004). Con relación al detergente, se esperaba un mejor resultado que el SLES ya que además de tensoactivos, incorpora dos productos biocidas según su etiqueta, pero quizás también su falta de transporte dentro de la planta ha influido, ya que su acción es entonces muy local. Para confirmar estos malos resultados sería necesario realizar ensayos adicionales (**Fig. 3**).

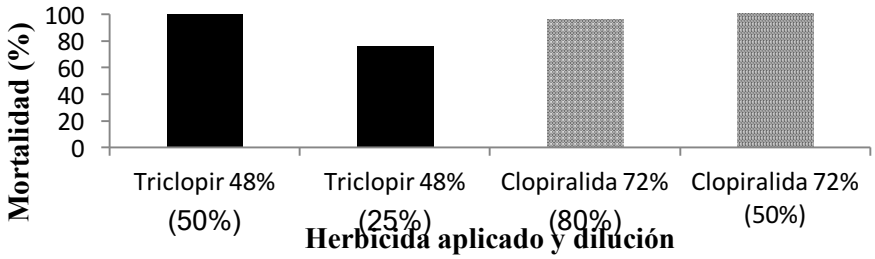


Fig. 1. Mortalidad de ailanto en junio por herbicidas aplicados en noviembre (árboles Θ > 10 cm).

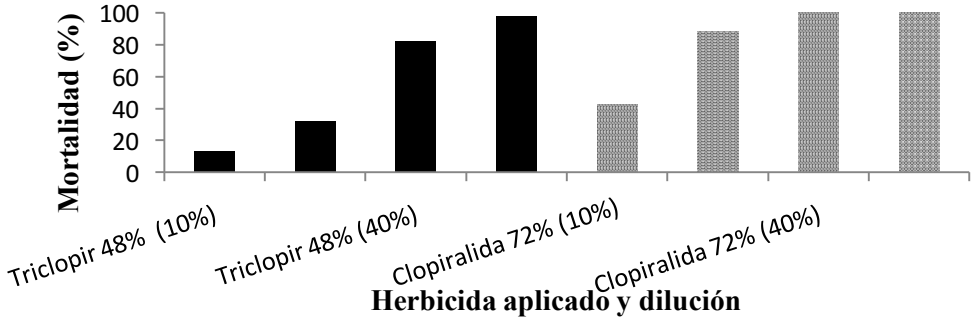


Fig. 2. Mortalidad de ailanto en junio según herbicida aplicado en abril (árboles Θ > 10 cm)

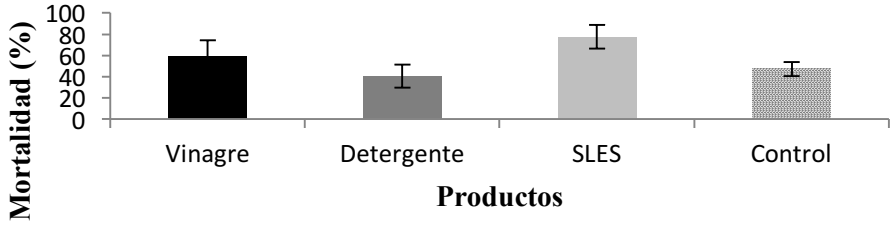


Fig. 3. Mortalidad de ailanto a los 4 meses, según producto aplicado sin diluir en junio (árboles Θ < 10 cm). SLES: Lauril éter sulfato sódico.

3.2 Ensayos con fragmentos de rizoma

En el ensayo **R1**, un fragmento de 50 mm y otro de 80 mm de longitud generaron un brote a las 13 y 11 semanas que sobrevivieron 1 y 4 semanas respectivamente. En el ensayo **R2**, todas las longitudes generaron brotes excepto las de 20 mm (**Fig. 4**). Los fragmentos de 60 mm de longitud emitieron el mayor porcentaje de brotes (**Tabla 1**), los cuales, junto con los brotes generados por los fragmentos de 80 mm de longitud, permanecieron activos y vivos un máximo de 6 semanas. Al finalizar el seguimiento (23 semanas), sólo un fragmento de 70 mm tenía un brote establecido, con 2,3 cm de longitud y raíces de 3 cm. Probablemente la mayoría de brotes se generaron a expensas de las reservas del rizoma y murieron al no poder enraizar al acabar éstas. Se observó que rizomas de mayores tamaños tenían mayores longitudes de brote y mayor número de hojas. Soler *et al*. (2017) también observaron la aparición de brotes en fragmentos de 4 mm de longitud y 3-4 mm de diámetro pero no se comprobó su enraizamiento.

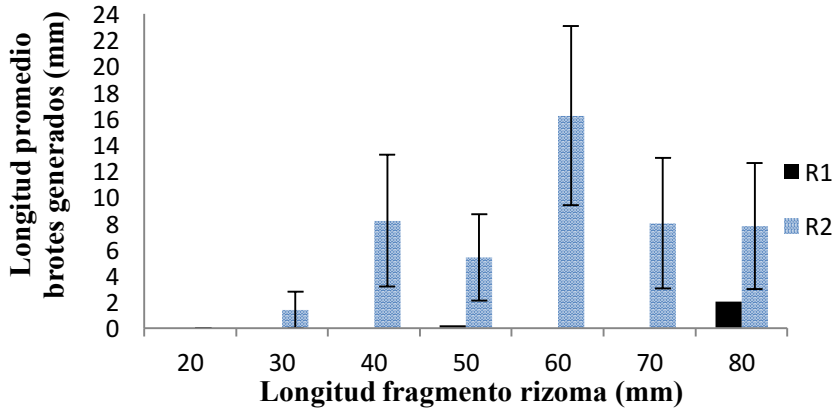


Fig. 4. Promedio de la longitud máxima alcanzada de los brotes generados en función de la longitud del rizoma. R1 (3-4 mm de diámetro) y R2 (7-8 mm de diámetro).

Tabla 1. Porcentaje de rizomas brotados y promedio de hojas generadas.

Diámetro rizoma (mm)	Longitud rizoma (mm)	Rizomas brotados (%)	Promedio núm. de hojas
3-4	20	0	0
	30	0	0
	40	0	0
	50	20	0
	60	0	0
	70	0	0
	80	20	0
7-8	20	0	0
	30	20	0
	40	40	1,8
	50	40	1,2
	60	60	3,4
	70	40	2,8
	80	40	3,6

Referencias

CONSTÁN NAVA, S (2013) Ecología de la especie invasora *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle: bases para su control y erradicación en espacios naturales protegidos. *Ecosistemas* **22**, 83-85.

INVERSO A & BELLANI L (1991) Origin and development of *Ailanthus glandulosa* desf. root suckers. *Giornale Botanico Italiano* **125**, 39–45.

SOLER J, IZQUIERDO J, VILAMÚ J (2017) Control de *Ailanthus altissima* en un ecosistema Natural. 2017 *XVI Congreso de la Sociedad Española de Malherbología* (ed Mercedes Royuela Hernando y Ana Zabalza Aznárez) (25-27 Octubre, Pamplona-Iruña, España). 251-256. Pamplona-Iruña, España.

SONG HY, KIM YH, SEOK SJ et al. (2011) Cellular toxicity of surfactants used as herbicide additives. *Journal of Korean Medical Science* **27**, 3–9.

LORENA S, CARLOS J Y GONZALO E (2017) Vinagre triple 12,5%: Herbicida natural en siembra directa de maíz (*Zea mays*) orgánico. *Espamciencia* **8**, 13-21.

VENEGAS J.T & PÉREZ P.C (2009) Análisis y optimización de técnicas de eliminación de especies vegetales invasoras en medios forestales de Andalucía. *V Congreso Forestal Español* (ed S.E.C.F Junta de Castilla y León)(21-25 Setiembre, Avila, España) Avila, España.

VENTO RICHARD A (2004) "Petition for Inclusion on the National List of a Substance to Be Used in Organic Production." National List Petition. Orange, VA: St Gabriel Laboratories. http://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/S%20Lauryl.pdf.

Control and resprout capacity of the Tree of Heaven (*Ailanthus altissima*)

Summary: Tree of heaven (Ailanthus altissima) is considered a non-native invasive species in Spain. Chemical control tests have been done using the stem injection technique. In autumn, with two doses of Triclopyr (48%) in diameters smaller than 3 cm, the death of all treated individuals was observed, although outbreaks connected to them were not affected; Two doses of C*lopyralid* (72%) carried out a control of 100% and 96% respectively. In the spring, with four doses of Triclopyr (48%) and C*lopyralid* (72%) separately, greater control was obtained at a higher concentration. Injections to cut stumps with vinegar, detergent and a surfactant showed no control over the treated individuals. Rhizome fragments of 5 cm length and a diameter of 3-4 mm were able to sprout. Fragments of 7 cm length and a diameter of 7-8 mm generated shoots and roots.

Keywords: *Ailanthus,*stem injection,triclopyr,clopyralid,vinegar,detergent,surfactant, rhizome.

ÍNDICE DE AUTORES

A	AIBAR J	67, 132, 183, 290, 308
	ALCÁNTARA C	84, 90
	ÁLVAREZ-IGLESIAS L	260
	ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ S	51
	AMARO I	33
	ANDRADE E	177
	ANDÚJAR D	114
	ARANITI F	51
	ARBONÉS A	45
	ARIAS-MARTIN M	396
B	BAQUERO R	290
	BARBA-RODRÍGUEZ A	367
	BARCO ANTOÑANZAS M	39, 195
	BARRIUSO J	308
	BARROSO J	254
	BASTIDA F	361, 367
	BENGOCHEA-GUEVARA JM	114
C	CABEIRAS-FREIJANES L	213
	CABELLO F	373
	CABRERA C	102, 231, 237, 314
	CALHA IM	177
	CAMPOS D	373
	CANABAL-ABALO A	296
	CHAMBER E	150
	CHUECA MC	27, 171, 396
	CIRUJEDA A	67, 108, 132, 138, 165, 290, 379
	CIVIT J	231
	CLARAMUNT J	73
	CONSOLA S	156
	CONTRERAS JM	278
	CORDERO F	150
	COSTAS-GIL A	201
D	DE CASTRO AI	231
	DE LUCA FABRA V	207

DE PRADO R 21
DEL MONTE JP 78
DÍAZ-VIZCAÍNO EA 326, 332
DORADO J 120, 243, 302, 314, 373
E ESCORIAL MC 27, 150, 171, 396
F FERNÁNDEZ JL 150
FERNANDEZ LABRADA M 344
FÉRNANDEZ U 57
FERNÁNDEZ-QUINTANILLA C 120, 243, 302, 314, 373
FERRIOL M 272
G GANDÍA ML 78
GARNICA I 144, 165, 284
GERHARDS R 114
GIL-MONREAL M 39, 195
GÓMEZ DE BARREDA D 57, 207
GÓMEZ MI 138
GÓMEZ-REGIFE Y 126, 338
GONZÁLEZ L 402
GONZÁLEZ-ANDÚJAR JL 284, 361, 367, 385
GOÑI J 144
GORZOLKA K 39
GRAÑA E 201
GUERRA JG 314, 373
GUISANDE-COLLAZO A 402
H HARTMANN K 385
HERNAIZ P 243
HORNOS Z 27, 171
HUSSAIN MI 350, 355
I IBAÑEZ C 165
IGLESIAS-RODRÍGUEZ J 96, 296, 320
ILLERA VIVES M 344
IZQUIERDO J 150, 408
J JIMÉNEZ-BRENES FM 231
JIMÉNEZ-RUIZ J 278
L LAGO-DOPICO A 213
LECHUGA-LAGO Y 402
LEDO D 201
LEZÁUN JA 144, 150, 284
LIMA F 120
LIN Z 63
LLENES JM 156
LLORENS JA 57
LÓPEZ MOSQUERA ME 344
LÓPEZ-GONZÁLEZ D 51, 201, 213
LÓPEZ-GRANADOS F 231
LORENZO P 402
LOUREIRO I 27, 171, 396
LUNA IM 302
M MANSANET PEREA C 344

MARÍ AI 67, 108, 132, 138, 150, 165, 290, 379
MARTÍN JM 373
MARTÍNEZ DESCALZO J 207
MARTÍNEZ P 272
MARTÍNEZ Y 108, 138
MARTÍNEZ-GUANTER J 114
MAS MT 73, 266
MENDES A 177
MENENDEZ J 21
MICO M 73
MONTULL JM 45, 156, 189
MORALES I 266
MUÑOZ M 219
MUÑOZ-TRIVIÑO M 63
MURILLO S 132

N
NOWACK M 63

O
OSCA JM 57
OSUNA MD 33, 165

P
PAGNONCELLI FDB 385
PALMERIN JA 33
PARAMIO JA 150
PARDO G 67, 108, 132, 138, 165, 290, 379
PARDO-MURAS M 96, 320
PASCUAL GIRÓN A 308
PATIÑO-ROPERO MJ 278
PEDRAZA V 284
PEDROL N 96, 260, 296, 320
PEÑA JM 120, 243, 302
PETEINATOS G 114
PORTUGAL J 177
PUIG CG 96, 296, 320

Q
QUILES JM 33

R
RAMS S 84, 90
REBOLLO-VALERA M 126, 338
RECASENS J 45, 102, 231, 249, 296, 314
REGUEIRA-MARCOS L 213
REIGOSA MJ 51, 201, 213, 350, 355
REVILLA P 260
RIBEIRO A 114
RIGUEIRO A 326, 332
ROCHE TORRES A 207
RODRÍGUEZ J 402
ROJANO-DELGADO A 21
ROMANO Y 33, 165
ROMERO FRANCO R 344
ROYO-ESNAL A 150, 189, 231, 237, 249, 391
ROYUELA M 39, 195

S
SAAVEDRA M 84, 90, 150
SALA A 102

	SALAMONE A	219
	SALAS M	21, 189
	SALOMÃO HM	385
	SÁNCHEZ-MOREIRAS AM	51, 57, 201, 213, 219, 225, 350, 355
	SANDÍN-ESPAÑA P	278
	SANTIAGO R	260
	SANTÍN-MONTANYÁ MI	78, 278
	SCHEEL D	39
	SEGURA A	144
	SEVILLA-MORÁN B	278
	SOLANO A	183
	SOLANS JR	102
	SOLER J	408
	SOLER L	408
	SOUSA-ORTEGA C	126, 150, 338
	SOUTO C	296
	SUPICICHE M L	391
T	TABERNER A	156, 189
	TEIJEIRA M	51
	TENORIO JL	78
	TOMAS J	379
	TORRA J	21, 150, 189
	TORRES L	326, 332
	TORRES N	57, 219, 225
	TORRES-SÁNCHEZ J	231
	TREZZI MM	385
U	URBANO JM	126, 150, 338
V	VALENCIA-GREDILLA F	102, 231, 249, 296, 314, 391
	VARELA CASAL N	344
	VARGAS M	150
	VERDEGUER M	57, 207, 213, 219, 225, 272
	VERDÚ AMC	73, 266
	VIEITES Y	350, 355
	VILAMÚ J	408
W	WUEST SB	254
Z	ZABALZA A	39, 195
	ZULET-GONZALEZ A	39, 195

www.semh2019.gal

ORGANIZAN

PATROCINAN