

Biomasa alelopática: aprovechando recursos agroforestales como herbicidas naturales

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

Departamento de Biología Vegetal e Ciencia do Solo, Facultade de Biología, 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 físico-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 físico-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 Research* **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