

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 957 062**

21 Número de solicitud: 202200044

51 Int. Cl.:

A01N 65/28 (2009.01)

A01N 65/20 (2009.01)

A01N 65/22 (2009.01)

A01P 13/02 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

27.05.2022

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.01.2024

Fecha de concesión:

13.05.2024

45 Fecha de publicación de la concesión:

21.05.2024

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE VIGO (100.0%)
Campus Universitario de Vigo s/n
36310 Vigo (Pontevedra) ES**

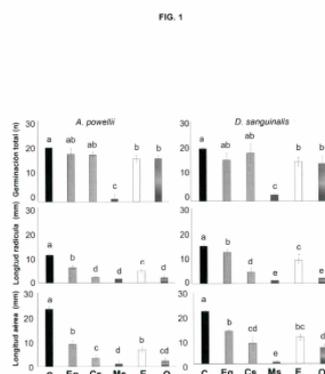
72 Inventor/es:

**PEDROL BONJOCH, Nuria;
PARDO MURAS, Maria y
GONZALEZ PUIG, Carolina**

54 Título: **Composición herbicida que comprende biomasa de eucalipto, retama y mastranzo**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a composiciones con efecto herbicida a base de biomasa de eucalipto, retama y mastranzo, tanto en forma triturada como en forma de pellets. Este producto tiene utilidad en el sector agrícola y en aquellos otros sectores donde sea necesario un control de la flora arvensis. Las composiciones tienen efecto sobre la germinación y el crecimiento de especies arvensis, sin afectar a los cultivos, siendo una alternativa ecológica y sostenible a los herbicidas de síntesis y/o una nueva herramienta de control en manejo integrado de malas hierbas.



ES 2 957 062 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

Composición herbicida que comprende biomasa de eucalipto, retama y mastranzo

5 **Campo de la invención**

La presente invención se enmarca dentro de la agricultura, más específicamente dentro de la producción vegetal, en la inhibición de la germinación y crecimiento de la flora arvense mediante el uso de composiciones que comprenden biomasa agroforestal triturada o en forma de pellet.

Antecedentes de la invención

La gestión integral y eficiente de los recursos agroforestales debe proporcionar insumos que permitan el autoabastecimiento para la producción vegetal y la conservación de la fertilidad del suelo. En agricultura revegetación y conservación de espacios, la transición hacia sistemas más sostenibles requiere insumos naturales que sustituyan al menos parcialmente a los abonos y fitosanitarios de síntesis química empleados en la actualidad. En la medida de lo posible, la gestión debe basar su eficiencia en el reciclado de nutrientes dentro del sistema y en el aporte de insumos producidos a partir de biomasa agroforestal renovable

Las consideraciones medioambientales han tenido un peso creciente en las formulaciones de la Política Agrícola Común (PAC) que marca como uno de sus principales objetivos el manejo sostenible de los recursos naturales, lo que será de obligado cumplimiento en la nueva PAC 2023-2027. En este marco, la agricultura ecológica se muestra cada vez más como una de las opciones productivas más sustentables (Reganold and Wachter, 2016. Nature Plants 2, 15221), asegurando la estabilidad a largo plazo de los cuatro pilares de la sostenibilidad: producción, ambiente, economía y bienestar.

El control de la flora arvense (flora indeseada, flora adventicia, malezas, o "malas hierbas") en campos de cultivo e invernaderos de producción agrícola, viveros, huertos urbanos, espacios protegidos, parques y jardines, vías públicas, espacios verdes urbanos y periurbanos, vegetación de taludes, baldíos, escombreras, y bordes y medianas de caminos y vías, deberá tender cada vez más al uso de herramientas de manejo integrado, reduciendo al máximo el uso de herbicidas de síntesis.

El control químico basado en el uso de herbicidas de síntesis, que afectan de forma selectiva a la flora arvense del cultivo, es en la actualidad el método más empleado por su rentabilidad a priori. En el año 2017 se registró en la UE un consumo de pesticidas de 360.000 toneladas, donde España se situaba a la cabeza de la lista con el 19,5%, por delante de Francia (18,7%), Italia (13,8%) y Alemania (12,3%). Concretamente, en el grupo de herbicidas, el sector agropecuario español es el tercero de la Unión Europea con más uso. Entre los inconvenientes asociados al uso de estos herbicidas destaca su potencial toxicidad, incluso a concentraciones muy bajas. Su uso masivo ha incrementado la contaminación del suelo y del agua, con el consiguiente deterioro de los ecosistemas naturales, agroecosistemas y ecosistemas urbanos, ya que algunos principios activos se incorporan a las cadenas tróficas representando un riesgo directo para la salud animal y humana (OMS 2017).

En los últimos años el abuso de herbicidas ha producido un incremento de ecotipos de especies arvenses resistente. La aparición de estas malezas resistentes está vinculada al uso repetido de herbicidas con el mismo modo de acción (MOA) y sobre un mismo cultivo (Holt, 1992. Weed Technol. 6: 615-620). El problema es acuciante, ya que desde 1980 no se han

5 introducido nuevos MOAs y, de los 31 sitios de acción de los herbicidas conocidos las especies de flora arvense han desarrollado resistencias a 21 de ellos (Heap, 2021, The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. www.weedscience.com). La falta de nuevos MOAs junto con el aumento exponencial de malezas resistentes amenaza con que casi todos los herbicidas existentes sean inutilizables en 2050 (Westwood *et al.* 2018. *Weed Sci.* 66: 275-285).

10 En la actualidad, la producción ecológica en la UE está regulada por el reglamento (UE) 2018/848 donde se prohíbe el uso de pesticidas de síntesis. Por el momento, la normativa europea no contempla ni un solo producto fitosanitario o sustancia activa autorizada como herbicida en agricultura ecológica (Anexo I del Reglamento CE 2021/1165) Es por eso que en los sistemas de producción ecológica el control de malezas se considera el mayor problema agronómico.

15 Por todo lo anterior, existe una demanda creciente de nuevos productos y métodos para el control de malezas más efectivos, económicos, saludables, y respetuosos con el medio ambiente, y con potencial de certificación en agricultura ecológica.

20 Una alternativa a los herbicidas sintéticos tiene que ver con el fenómeno de la alelopatía que tiene lugar en algunas plantas. La alelopatía puede definirse como el efecto positivo o negativo que ejerce una planta sobre otra(s) y que está mediado por la producción y liberación al medio de compuestos aleloquímicos. Estos compuestos pueden ser de naturaleza volátil (VOC) o solubles en agua (Rice, 1984. *Allelopathy*, 2nd ed. Academic Press, Orlando. pp: 189). Los compuestos aleloquímicos se pueden encontrar en cualquier órgano de la planta y son liberados al medio por diferentes vías: lavado o lixiviado, exudación a través de las raíces, volatilización o descomposición de la propia planta. En el medio pueden inhibir la germinación y en el crecimiento de otras plantas (Ferguson *et al.* 2003. Institute of Food and Agricultural Sciences, EDIS) o afectar a su morfogénesis mediante la interrupción de procesos fisiológicos como la fotosíntesis, la respiración, las relaciones hídricas o el equilibrio hormonal (Tigre *et al.* 2012. Institute of Food and Agricultural Sciences, EDIS). Los compuestos aleloquímicos son útiles en la búsqueda de nuevos herbicidas naturales dado que (i) tienen MOAs distintos a los de los herbicidas de síntesis; (ii) tienen una mayor interacción específica con la flora arvense y plagas por su diversidad estructural natural; (iii) ocasionan menor impacto ambiental, ya que suelen tener una vida media corta y son más biodegradables; y (iv) tienen mayor actividad a menor concentración en comparación con los principios activos herbicidas disponibles en la actualidad (Soltys *et al.* 2013. *Herbicides-Current research and case studies in use*. Intech. pp 517-542).

40 Para la obtención de composiciones herbicidas que comprendan estos compuestos, una estrategia consiste en extraer los aleloquímicos a partir de material vegetal y tratar el cultivo con el extracto resultante. La eficacia de los extractos está limitada por su velocidad de volatilización, adsorción, degradación o transformación microbiana. Debido a la composición del suelo, la mayoría de los compuestos aislados que son efectivos en el laboratorio como herbicidas, en el campo tienen poca o nula efectividad (Kobayasi 2004. *Weed Biology and Management* 4:1-7) Por lo tanto, la supuesta actividad herbicida *in vitro* no es trasladable a un banco de semillas real de malas hierbas en el suelo agrícola, cuya germinación y establecimiento se extiende en el tiempo.

50 El problema que se pretende resolver es el de proporcionar una composición herbicida sostenible, duradera, selectiva y efectiva que pueda usarse en cultivo ecológico, a partir de recursos naturales existentes en el agroecosistema.

Se ha descrito el uso potencial de biomasa de eucalipto, matorral y mastranzo como herbicidas (Puig *et al.*, 2019. Crop Protection 121: 57-65; Pardo-Muras *et al.*, 2020. Plants 9: 203; Iglesias-Rodriguez, 2016. *Mentha suaveolens* Ehrh. for weed control: from *in vitro* evidences to application in greenhouse vegetable production. MSc Thesis. Universidad de Vigo, ES 2719451 B2). Sin embargo, son necesarias nuevas composiciones que sean efectivas frente a un número mayor de especies de flora arvense, y que tengan una mayor duración en el campo, abarcando todo el periodo de emergencia de la flora arvense del banco de semillas del suelo. Tanto la composición como el formato de las composiciones son importantes porque van a ser relevantes en el efecto y duración de estas composiciones en el suelo.

La presente invención resuelve este problema proporcionando nuevas composiciones herbicidas con una selectividad y efectividad mejorada, lo que supone un avance inédito tanto en agricultura como en el aprovechamiento de recursos naturales. Las composiciones descritas son aptas en agricultura ecológica y espacios protegidos, y además son adecuadas como herramienta de manejo integrado. Favorecen el reciclaje de nutrientes en el sistema agroforestal y reducen la dependencia de insumos externos, tanto de herbicidas de síntesis como de combustibles para control mecánico. La aplicación de biomasa al suelo puede aportar servicios ecosistémicos como el incremento de fertilidad de los suelos por la incorporación de materia orgánica, el aporte de nitrógeno por la introducción de una leguminosa en la composición, la captura de carbono, y la correspondiente disminución de emisión neta de gases de efecto invernadero.

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere al control de la flora arvense (flora indeseada, flora adventicia, malezas, o "malas hierbas") en campos de cultivo e invernaderos de producción agrícola, viveros, huertos urbanos, espacios protegidos, parques y jardines, vías públicas, espacios verdes urbanos y periurbanos, vegetación de taludes, baldíos, escombreras, y bordes y medianas de caminos y vías.

En una primera realización, la invención se refiere a una composición herbicida que comprende biomasa de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill), biomasa de retama (*Cytisus scoparius* (L.) Link) y biomasa de mastranzo (*Mentha suaveolens* Ehrh.).

En una segunda realización, la invención se refiere a una composición herbicida que comprende entre 50 y 100% p/p de biomasa de eucalipto, entre 0 y 40% p/p de biomasa de retama y entre 0 y 20% p/p de biomasa de mastranzo, respecto al peso total de la composición.

En una tercera realización, la invención se refiere a una composición herbicida que comprende entre 60 y 90% p/p de biomasa de eucalipto, entre 5 y 30% p/p de biomasa de retama y entre 5 y 10% p/p de biomasa de mastranzo, respecto al peso total de la composición.

En una cuarta realización, la invención se refiere a una composición herbicida que comprende entre 60 y 75% p/p de biomasa de eucalipto, entre 20 y 30% p/p de biomasa de retama y entre 5 y 10% p/p de biomasa de mastranzo, respecto al peso total de la composición.

En una quinta realización, la invención se refiere a una composición herbicida que comprende 65% p / p de biomasa de eucalipto, 25% p/p de biomasa de retama y 10% p/p de biomasa de mastranzo, respecto al peso total de la composición.

En una sexta realización, la invención se refiere la composición herbicida de las realizaciones anteriores, en forma de pellet.

5 En una séptima realización, la invención se refiere al uso de la composición herbicida de cualquiera de las realizaciones anteriores en la inhibición de la germinación y/o del crecimiento de especies arvenses.

10 En una octava realización, la invención se refiere a un método para inhibir la germinación y/o el crecimiento de especies arvenses que comprende administrar en un suelo cualquiera de las composiciones de las realizaciones anteriores

Breve descripción de las figuras

15 **Figura 1.** Efecto de las interacciones entre compuestos volátiles y solubles liberados de los filodios de *Eucalyptus globulus* (Eg), ramas floridas de *Cytisus scoparius* (Cs) y *Mentha suaveolens* (Ms), y la mezcla de las tres especies a la proporción 65:25:10 (efecto observado, O), así como la suma de los efectos de cada especie por separado en la mezcla (efecto esperado, E) sobre la germinación y el crecimiento temprano de las especies arvenses *Amaranthus powellii* y *Digitaria sanguinalis* en suelo agrícola. Las barras representan los valores medios \pm DE. Los valores medios etiquetados con letras distintas son significativamente diferentes a $P \leq 0.05$ (LSD post-hoc o prueba T2 de Tamhane para comparación múltiple de medias). C es el control del ensayo.

25 **Figura 2.** Efecto de *Eucalyptus globulus* (65%), *Cytisus scoparius* (25%) y *Mentha suaveolens* (10%) por separado, el efecto esperado de su combinación (suma de efectos) y el efecto observado de las tres especies en la mezcla; sobre la longitud radicular de la especie arvense *Amaranthus powellii*.

30 **Figura 3.** Evolución de la densidad de arvenses dicotiledóneas (A) y monocotiledóneas (B) durante el ensayo (15, 30 , 45 y 60 DTI). Las barras representan los valores medios \pm DE. Los valores medios etiquetados con letras distintas son significativamente diferentes a $P \leq 0.05$ (LSD post-hoc o prueba T2 de Tamhane). Primera columna: control, segunda columna: escarda, tercera columna: mastranzo, cuarta columna: mezcla.

35 **Figura 4.** Cosecha final de judía (A) y de nabo (B). Las barras representan los valores medios \pm DE. El asterisco denota que es significativamente diferente a $P \leq 0.05$ (LSD post- hoc o prueba T2 de Tamhane para comparación múltiple de medias). Primera columna: control, segunda columna: escarda, tercera columna: mastranzo, cuarta columna: mezcla.

40 **Figura 5.** Emergencia de arvenses ($n^0.m^{-2}$) en las parcelas tratadas con pellets de eucalipto y eucalipto triturado frente a las parcelas sin tratamiento (control), a los 30 días tras la incorporación (DTI). Las barras representan el valor medio \pm DE. Letras distintas indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre tratamientos (LSD post-hoc o prueba T2 de Tamhane para comparación múltiple de medias).

45 **Figura 6.** Estado de la parcela con eucalipto triturado y con pellets a los 5 meses tras la Incorporación, así como de la parcela control.

50 **Figura 7.** Conteos de emergencia de la especie arvense más abundante: *Digitaria sanguinalis*, y del total de malezas dicotiledóneas y monocotiledóneas ($n^0.m^{-2}$) en las parcelas tratadas con pellets de eucalipto (línea discontinua) y sin pellets (línea continua) a lo largo de 70 días tras la incorporación (DTI). Con una flecha se representa la necesidad de escarda por la infestación

en las parcelas sin pellets a los 42 días. Los símbolos representan los valores medios de las cuatro réplicas \pm D.E. Los asteriscos denotan diferencias significativas en relación con las parcelas sin pellets * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; no significativo $P > 0.05$ (Prueba t para muestras independientes).

5

Figura 8. Biomasa total de la especie arvense *Digitaria sanguinalis*, y del total de malezas dicotiledóneas y monocotiledóneas ($\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$) en las parcelas tratadas con pellets de eucalipto (columnas gris claro) y sin pellets (columnas gris oscuro) a los 42 y 150 días tras la incorporación (DTI). Con flechas se representa la necesidad de escarda por la infestación en las parcelas sin pellets (42 y 92 DTI) y con pellets (70 DTI). Las barras representan los valores medios \pm DE. Los asteriscos denotan diferencias significativas en relación con las parcelas sin pellets * $P \leq 0.05$; no significativo $P > 0.05$ (Prueba t para muestras independientes).

10

Figura 9. Efecto fitotóxico de los extractos acuosos de mezclas a distintas proporciones de eucalipto, retama, y mastranzo (Mezclas 1 a 7) sobre la germinación, crecimiento temprano e índice de vigor de las especies arvenses *Amaranthus powellii*, *Digitaria sanguinalis* y *Conyza canadensis*. Las barras representan los valores medios porcentuados con respecto al control (% r.c.) \pm DE. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada mezcla y el control (línea discontinua) * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; n.s. no significativo $P > 0.05$ (Prueba t para muestras independientes). Letras distintas representan diferencias significativas entre las distintas mezclas (LSD post hoc o prueba T2 de Tamhane para comparación múltiple de medias).

15

20

Figura 10. Efecto fitotóxico de los extractos acuosos de mezclas a distintas proporciones de eucalipto, retama, y mastranzo sobre la germinación (mezclas 1 a 7) crecimiento temprano e índice de vigor de la especie arvense *Digitaria sanguinalis*. Las barras representan los valores medios porcentuados con respecto al control (% r.c.) \pm DE. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre cada mezcla y el control (línea discontinua) * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; n.s. no significativo $P > 0.05$ (Prueba t para muestras independientes)

25

30

Figura 11. Emergencia de malezas a lo largo de los 12 días tras la incorporación (DTI) de los pellets de mezcla en el suelo en un experimento de macetas. Los símbolos representan valores medios de cuatro réplicas \pm DE. Los asteriscos denotan diferencias significativas en la relación con el control (sin pellets) ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ (prueba t para muestras independientes).

35

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe composiciones con actividad herbicida frente a especies arvenses y un nuevo formato de dichas composiciones que mejora su aprovechamiento, favorece la eficacia, facilita la aplicación, y prolonga el efecto herbicida de las composiciones en suelos de cultivo.

40

El uso de biomasa con potencial herbicida disponible en el agroecosistema para el control de malezas permite un uso eficiente de los recursos agroforestales, facilitando el reciclado de nutrientes. En los sistemas agroforestales de la Península Ibérica, existe una enorme variedad de plantas silvestres, biomasa y coproductos forestales de naturaleza alelopática que tienen potencial para convertirse en herramientas apropiadas para el control de malezas.

45

En una primera realización, la invención se refiere a una composición que comprende biomasa de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill), biomasa de retama (*Cytisus scoparius* (L.) Link) y biomasa de mastranzo (*Mentha suaveolens* Ehrh.).

50

La especie *Eucalyptus globulus* Labill. (eucalipto) es la especie leñosa más extendida por el ser humano. En Europa aparece en el S y O, Mediterráneo, Azores e Irlanda, y también se extiende por la mayor parte de América. Se conoce que la biomasa de *E. globulus* libera compuestos aleloquímicos al suelo (Puig *et al.*, 2018. *J Chem Ecol*, 44(7-8), 658-670) con eficacia herbicida (Puig *et al.*, 2019. *Crop Protection*, 121, 57-65).

Se ha descrito la fitotoxicidad de la especie *Cytisus scoparius* (L.) Link (retama) lo que sugiere que podría usarse para el control de malezas cuando se incorpora al suelo como abono verde (Pardo-Muras *et al.*, 2020. *Plants*, 9(2), 203).

El género *Mentha* Incluye especies aromáticas apreciadas por sus propiedades medicinales. Un número discreto de estudios han sugerido el potencial fitotóxico de algunas especies del género (Campiglia *et al.*, 2007. *Italian Journal of Agronomy* 2:171-175; Maia *et al.*, 2011. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s 13:253-25). El mastranzo (*Mentha suaveolens* Ehrh.) está ampliamente distribuido en los ecosistemas agroforestales atlánticos y existen indicios de su potencial herbicida (Iglesias-Rodríguez 2016. *Mentha suaveolens* Ehrh. for weed control: from in vitro evidences to application in greenhouse vegetable production. MSc Thesis. Universidad de Vigo).

Hasta la presente invención se desconocía el efecto en el suelo que tiene la combinación de la biomasa de estas especies, dado que la interacción entre diferentes aleloquímicos podría generar efectos tan dispares como sinergia, adición o antagonismo. Estos efectos no se pueden predecir, y menos la concentración necesaria de una especie determinada. Además, la especificidad de las especies frente a las que pueden actuar puede ser diferente, por lo que una combinación específica de biomasa alelopática para uso como herbicida no es obvia, dado que son necesarios datos experimentales que demuestren su actividad y selectividad.

En una realización más preferida, la composición comprende entre 50 y 100% p/p de biomasa de eucalipto (preferiblemente entre 60 y 90% p/p, más preferiblemente entre 60 y 75 % p/p) entre 0 y 40% p/p de biomasa de retama (preferiblemente entre 5 y 30% p/p. más preferiblemente entre 20 y 30% p/p) y entre 0 y 20% p/p de biomasa de mastranzo (preferiblemente entre 5 y 10 % p/p). En una realización más preferida, la composición comprende entre 60 - 75% p/p de biomasa de eucalipto, entre 20 - 30 % p/p de biomasa de retama y 5-10 % p/p de biomasa de mastranzo. Una realización particular de esta invención se refiere a una composición que comprende 65% p/p de biomasa de eucalipto, 25% p/p de biomasa de retama y 10% p/p biomasa de mastranzo, respecto al peso total de la composición.

Los ingredientes de la composición de la invención son preferiblemente residuos forestales: ramas finas y follaje de eucalipto, y ramas verdes y follaje de retama, y follaje de mastranzo La producción de la composición de la invención supone que estos residuos y excedentes de biomasa derivados de diversas actividades del sector agroforestal sean reconducidos, una estrategia de economía circular, a un nuevo aprovechamiento industrial.

Las composiciones que se ajustan a las proporciones indicadas anteriormente son capaces de inhibir la germinación de granos y semillas y reducir el crecimiento de plántulas de especies arvenses, tanto mono como dicotiledóneas. Ejemplos de especies arvenses son *Abutilon theophrasti*, *Adonis annua*, *A. microcarpa*, *Alisma plantago-aquatica*, *Alopecurus myosuroides*, *Althaea hirsuta*, *Amaranthus blitoides*, *A. hybridus*, *A. powellii*, *A. retroflexus*, *Ammannia robusta*, *Anacyclus clavatus*, *Avena barbata*, *A. fatua*, *A. sterilis*, *Bassia scoparia*, *Bromus catharticus*, *B. diandrus*, *B. madritensis*, *B. rubens*, *Calendula arvensis*, *Calystegia sepulum*, *Cardaria draba*, *Caucalis platycarpus*, *Chaenorhinum minus*, *Chenopodium album*, *C. vulvaria*, *Convolvulus arvensis*, *Conyza bonariensis*, *C. canadensis*, *Coronilla scorpioides*, *Cuscuta*

epithymum, *Cyperus difformis*, *C. rotundus*, *Datura stramonium*, *Digitaria sanguinalis*, *Diplotaxis erucoides*, *Echinochloa crus-galli*, *Echium plantagineum*, *Erodium ciconium*, *E. cicutarium*, *E. malacoides*, *Eruca vesicaria*, *Euphorbia helioscopia*, *E. peplus*, *E. serrata*, *Fallopia convolvulus*, *Fumaria capreolata*, *F. officinalis*, *Galium aparine*, *G. tricornutum*, *Galinsoga parviflora*,
 5 *Geranium dissectum*, *G. molle*, *G. rotundifolium*, *Glaucium corniculatum*, *Heliotropium europaeum*, *Heteranthera reniformis*, *Holcus mollis*, *Hypocoum procumbens*, *Kickxia spuria*,
Lactuca serriola, *Lamium amplexicaule*, *L. purpureum*, *Lathyrus aphaca*, *Leptochloa fascicularis*, *Lindernia dubia*, *Lolium rigidum*, *Malcolmia africana*, *Malva sylvestris*, *Mercurialis annua*, *Nigella damascena*, *Oxalis corniculata*, *O. latifolia*, *O. pes-caprae*, *Panicum capillare*,
 10 *Papaver dubium*, *P. rhoeas*, *Paspalum dilatatum*, *P. distichum*, *Persicaria maculosa*, *Phalaris brachystachys*, *P. minor*, *P. paradoxa*, *Picris echioides*, *Plantago lanceolata*, *P. major*, *P. media*, *Platycapnos spicata*, *Poa annua*, *Polygonum aviculare*, *Portulaca oleracea*, *Potentilla reptans*,
Raphanus raphanistrum, *Rapistrum rugosum*, *Reseda phyteuma*. *Roemeria hybrida*,
 15 *Rumex acetosa*, *R. crispus*, *R. obtusifolius*, *Scandix pecten-veneris*, *Scirpus maritimus*, *S. mucronatus*, *S. supinus*, *Senecio vulgaris*, *Setaria pumila*, *S. verticillata*, *S. viridis*, *Sherardia arvensis*,
Silene vulgaris, *Sinapis arvensis*, *Sisymbrium irio*, *Solanum nigrum*, *Sonchus oleraceus*, *Sorghum halepense*, *Stellaria media*, *Taraxacum gr. officinale*, *Torilis arvensis*, *T. nodosa*, *Trifolium repens*,
Veronica hederifolia, *V. persica*, *Vicia sativa*, *Viola arvensis*, *Vulpia alopecuroides*, *V. ciliata*, *Xanthium echinatum*, *X. spinosum*. En una realización más preferida, las
 20 especies arvenses se seleccionan del grupo que comprende *Amaranthus powellii*, *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album*, - *Convolvulus arvensis*, *Conyza canadensis*, *Digitaria sanguinalis*, *Echinochloa crus-galli*, *Echium plantagineum*, *Galinsoga parviflora*, *Lolium rigidum*,
Mercurialis ambigua, *Oxalis corniculata*, *Polygonum persicaria*, *Portulaca oleracea*, *Sinapis arvensis*, *Stellaria media*, *Solanum nigrum*, y *Sonchus sp.*

25 La composición de la invención tiene efecto sobre la germinación y el crecimiento temprano de especies arvenses, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, afectando por ejemplo a la elongación de la radícula y/o al crecimiento de la parte aérea, lo que disminuye el vigor y viabilidad de la plántula.

30 Se ha comprobado que el efecto de la mezcla de especies es superior a la suma de los efectos de las tres por separado. Esto demuestra las interacciones sinérgicas entre los compuestos de las tres, efecto impredecible.

35 La composición de la invención puede estar en forma de biomasa seca, triturada o en forma de pellet.

40 En una realización de la invención, la composición está preferiblemente en forma de pellet (biomasa densificada). El pelletizado en procesos industriales y agrícolas es conocido, pero en el contexto de la presente invención, este formato permite optimizar el procesado de la biomasa alelopática, combinar la biomasa de las distintas especies, su almacenamiento, transporte y aplicación en el campo. Además, se ha comprobado que el efecto herbicida en suelo de la composición en forma de pellet tiene un tiempo de biodegradación muy extenso, de hasta cinco meses, lo que permite que su actividad se prolongue en el tiempo y se incremente
 45 la rentabilidad del material. Además, el formato de densificado en pellets permite la mezcla de varias de las especies con actividad herbicida selectiva. Por lo tanto, el proceso de pelletizado de la composición de la invención tiene un nuevo efecto inesperado e impredecible, más allá de los beneficios relativos al transporte, a la aplicación o al almacenamiento.

50 Otra realización de la invención se refiere, por lo tanto, a una composición en forma de pellet que comprende entre 50 y 100% p/p de biomasa de eucalipto, entre 0 y 40% p/p de biomasa de retama y entre 0 y 20% p/p de biomasa de mastranzo. En una realización más preferida, la

- composición en forma de pellet comprende entre 60 - 90 % p/p de biomasa de eucalipto, entre, 5-35% p/p de biomasa de retama y 5-10 % p/p biomasa de mastranzo. En una realización todavía más preferida, la composición en forma de pellet comprende entre 60-75% p/p de biomasa de eucalipto, entre 20 - 30% p/p de biomasa de retama y 5 -10% p/p de biomasa de mastranzo. Una realización particular de esta invención se refiere a una composición en forma de pellet que consiste en 65% p/p de biomasa de eucalipto, 25 % p/p de biomasa de retama y 10% p/p de biomasa de mastranzo. En otra realización preferida, la composición en forma de pellet es 100% de biomasa de eucalipto.
- 5
- 10 Los rangos de cada ingrediente indicados anteriormente en la composición en forma de pellet tienen la ventaja de no necesitar ningún compuesto adicional para la compactación del pellet, como un aglutinante, manteniendo su integridad y prolongando su estabilidad.
- Otra realización de la invención se refiere al uso de la composición de las realizaciones anteriores, en forma triturada o en pellet, para la inhibición de la germinación y/o del crecimiento de malas hierbas o especies arvenses, tanto mono- como dicotiledóneas. Ejemplos de especies arvenses son las indicadas anteriormente. En una realización preferida, se seleccionan las especies arvenses que inhibe la composición *Amaranthus powellii*, *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album*, *Convolvulus arvensis*, *Conyza canadensis*, *Digitaria sanguinalis*, *Echinochloa crus-galli*, *Echium plantagineum*, *Galinsoga parviflora*, *Lolium rigidum*, *Mercurialis ambigua*, *Oxalis corniculata*, *Polygonum persicaria*, *Portulaca oleracea*, *Sinapis arvensis*, *Stellaria media*, *Solanum nigrum*, y *Sonchus sp*.
- 15
- 20
- 25 Las composiciones descritas en la presente invención son capaces de reducir la germinación de especies arvenses entre un 20 y un 95%.
- Las composiciones descritas en la presente invención son capaces de reducir la biomasa de especies arvenses entre un 40 y un 80%.
- 30 La invención se refiere también a un método para inhibir la germinación y/o el crecimiento de especies arvenses que comprende administrar en un suelo cualquiera de las composiciones de las realizaciones anteriores. La administración de la composición puede ser de cualquier forma conocida por el experto en el sector, por ejemplo, y sin limitarse, mediante *mulching* (mantillo o acolchado), en cultivos en pre-emergencia o post-emergencia sobre las plántulas de malezas ya germinadas, de forma superficial o incorporada, de forma manual o automatizada, etc. El procedimiento comprendería (a) secado de la biomasa, opcionalmente (b) mezclado homogéneo y peletizado de la biomasa, (c) esparcimiento de la composición sobre el suelo, preferiblemente mediante volteo manual o mecánico, y(d) incorporación de la composición al suelo o dejar en superficie.
- 35
- 40
- La biomasa presente en la composición de la invención tiene propiedades alelopáticas y actividad herbicida cuando se aplica al suelo agrícola. Esta biomasa, combinada de forma adecuada y debidamente procesada para optimizar su efecto y su manejo, puede convertirse en un nuevo recurso para el control de malezas, económico y ambientalmente adecuado. Además, las sustancias alelopáticas presentes en la composición producen un notable efecto debido a complejas interacciones sinérgicas; es decir, nuevos y múltiples MOAS poco susceptibles de generar resistencias, lo que la convierte en adecuada para agricultura ecológica y espacios protegidos, y también como herramienta de manejo integrado.
- 45
- 50 El uso de la composición herbicida de la invención favorece el reciclaje de nutrientes en el sistema agroforestal y reduce la dependencia de insumos externos, tanto de herbicidas de síntesis como de combustibles para control mecánico con maquinaria agrícola, con la

correspondiente disminución de emisión neta de gases de efecto invernadero. Además, la aplicación de biomasa al suelo aporta servicios ecosistémicos como el incremento de fertilidad de los suelos por la incorporación de materia orgánica, el aporte de nitrógeno, y el secuestro de carbono.

5

Los principios bioactivos naturales presentes en la composición herbicida de la invención son metabolitos secundarios vegetales (aceites esenciales, ácidos fenólicos, y flavonoides) inocuos o beneficiosos para la salud humana a las dosis herbicidas efectivas: han sido ampliamente utilizados y testada su seguridad (a las concentraciones activas de la composición) o están autorizados para su uso en medicina humana, veterinaria, cosmética, y alimentación.

10

La composición herbicida de la invención se basa en potentes sinergias intra- e interespecíficas que se producen entre los principios bioactivos naturales de distintas clases químicas contenidos en la biomasa de las especies alelopáticas seleccionadas (Tablas 1 y 2). De este modo, la eficacia herbicida radica en las interacciones fitotóxicas que se producen en el cóctel de aleloquímicos a bajísimas concentraciones individuales (del orden de centésimas de ppm de cada compuesto volátil liberado en los poros del suelo, y de unidades a centésimas de $\mu\text{mol/L}$. de cada compuesto fenólico en el agua del suelo) que la composición va liberando secuencialmente una vez aplicado. Las cantidades máximas liberables al agroecosistema por la composición, en un lapso de semanas a meses, están muy por debajo del umbral de fitotoxicidad de cada principio activo por separado, por lo que el producto es respetuoso con el medio ambiente y su uso reduce los efectos colaterales indeseados de los herbicidas de síntesis cuyas dosis efectivas de uno o pocos principios activos son mucho más elevadas, y se liberan de una vez tras su aplicación.

15

La composición herbicida de la invención es acorde con los principios de control de plagas en agricultura ecológica, las buenas prácticas en agricultura, y la estrategia de manejo integrado de malas hierbas (IWM) demandada por la PAC y las políticas medioambientales comunitarias (objetivo principal de la European Weed Research Society (EWRS) y las sociedades científicas estatales que aglutina). La composición de la invención no llega a erradicar las malas hierbas, sino que mantiene sus poblaciones a niveles estables no competitivos con el cultivo, a través de la reducción paulatina del banco de semillas del suelo agrícola. Se preservan así los muchos servicios ecosistémicos que proveen las especies arvenses (p. ej., cobertura y aireación del suelo, protección contra la erosión y evaporación, materia orgánica, atracción de polinizadores, protección del cultivo contra enfermedades y plagas, alimento y cobijo de micro y macrofauna auxiliares), y se mantiene la diversidad específica y de tipos funcionales del agroecosistema que garantizan su estabilidad y resiliencia, y con ello una producción sostenible.

20

En cuanto a la protección de la biodiversidad en los agroecosistemas, las especies de plantas alelopáticas cuya biomasa compone la composición de la invención, son abundantes y altamente productivas, y no son especies protegidas ni vulnerables. Por otro lado, las características de la composición en cuanto a su modo de acción múltiple, su baja susceptibilidad de generar resistencias, y la inocuidad para un importante número de cultivos permitiría su uso en variedades comerciales convencionales sin resistencia inducida a los herbicidas de síntesis (no modificadas genéticamente), así como en cultivares tradicionales y locales.

25

El uso de la composición herbicida de la invención alivia el consumo de herbicidas de síntesis en agricultura convencional e integrada. El procesado de la biomasa puede completarse con energía renovable, reduciéndose la huella de carbono derivada de su proceso de producción (p, e) picado, molido, mezclado y densificado con energía fotovoltaica). El solicitante ha

30

35

40

45

50

- comprobado, en ensayos de invernadero y campo, que ya la primera aplicación de la composición reduce a la mitad la necesidad de escarda manual de las malas hierbas, con lo que su uso alivia notablemente el trabajo con maquinaria agrícola (dependiente de combustibles fósiles) para el control mecánico. Por otro lado, la incorporación de residuos vegetales al suelo agrícola (y que de otro modo serían desechados o incinerados, con la correspondiente emisión de gases de efecto invernadero) proporciona materia orgánica y productos metabolizables que estimulan la actividad microbiana y mejoran su estructura, de modo que el uso de la composición contribuye al secuestro de carbono.
- Finalmente, la composición herbicida de la invención cumple con el principio DNSH ("*Do not significant harm principle*") y contribuye a alcanzar los siguientes objetivos medioambientales: (i) la protección de los recursos hídricos, (ii) la economía circular, (iii) la prevención de la contaminación, y (iv) la protección y recuperación de la biodiversidad en los agroecosistemas. Además, obtendría un coeficiente del 100% (anexo VI del Reglamento (UE) 2021/241) en aspectos relevantes de estos otros objetivos: (v) mitigación del cambio climático, y (vi) la adaptación al cambio climático.

EJEMPLOS

- Ejemplo 1: Sinergia de compuestos en la mezcla de biomasa alelopática: efectividad de compuestos alelopáticos en la mezcla de especies frente a las especies por separado*

El objetivo de este bioensayo fue comparar el efecto herbicida de cada una de las especies individuales (*Eucalyptus globulus*, *Cytisus scoparius* y *Mentha suaveolens*) con la mezcla de las 3 especies a la proporción 65:25:10.

Los filodios de *E. globulus* y las ramas floridas de *C. scoparius* y *M. suaveolens* fueron recogidos en fresco y secados a temperatura ambiente y oscuridad. Posteriormente fueron triturados para su uso.

El suelo agrícola empleado fue recogido de un campo de cultivo localizado en Vigo (Galicia) que se había dedicado a producción hortícola durante 15 años y luego se dejó en barbecho durante los cuatro últimos años. El suelo se tamizó a través de malla de 2 mm para eliminar los desechos y los restos vegetales.

Se emplearon dos especies de malezas agrícolas, *Amaranthus powelli* y *Digitaria sanguinalis* como especies diana dicotiledónea y monocotiledónea, respectivamente. Estas semillas fueron recogidas en estado de maduración en los campos de ensayo de la Misión Biológica de Galicia (Pontevedra, España)

A fin de simular las potenciales interacciones entre los compuestos volátiles y los compuestos solubles en agua liberados de los filodios de eucalipto, ramas floridas de retama, ramas floridas de mastranzo, o la mezcla de las tres especies a la proporción (65:25:10), se llevó a cabo el siguiente ensayo.

Para la preparación de los extractos acuosos se siguió el protocolo descrito en Puig *et al.* 2013. Weed Science, 61(1), 154-161; Pardo-Muras *et al.* 2020. South African Journal of Botany, 133, 201-211.). Para estudiar el efecto en la germinación, 20 semillas de cada una de las especies de malezas diana fueron incubadas sobre 30 gramos de suelo agrícola humedecido con 15 ml de extracto acuoso en botes herméticos de 1L. Además, un gramo de peso seco de cada una de las especies vegetales o de la mezcla de todas ellas fue envuelto en gasa estéril de algodón y se dispuso colgando de la tapa. El tratamiento control consistió en semillas incubadas sobre

suelo agrícola humedecido con agua destilada y una gasa de algodón colgante que contenía trozos de pajitas de plástico (como material inerte) en un volumen similar al del material vegetal.

5 Para ver el crecimiento temprano, se utilizaron 7 semillas pre-germinadas (longitud de radícula entre 1 y 3 mm; Mayer y Poljakoff-Mayber, 1963. The Germination of Seeds. 1st ed. Oxford: Pergamon Press. pp. 244) en las mismas condiciones que para el bioensayo de germinación. Se midieron la longitud de la raíz y de la parte aérea de las semillas pre-germinadas después de 48 h.

10 Los ensayos se llevaron a cabo bajo condiciones *in vitro*, 33 /20 °C y fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para cada tratamiento y especie de maleza diana se realizaron tres réplicas.

15 La **Figura 1** muestra el resultado del ensayo. La biomasa de mastranzo (Ms) por si sola libera compuestos volátiles y fenólicos capaces de inhibir casi por completo la germinación de ambas malezas, mostrando su intenso potencial bioherbicida. El eucalipto (Eg) y la retama (Cs) por separado no tuvieron efecto significativo sobre la germinación de las malas hierbas ensayadas, pero si fueron efectivas cuando estaban mezcladas, inhibiendo la germinación de *A. powellii* un 20%, y la de *D. sanguinalis* un 29%. El crecimiento de *A. powellii* se vio reducida por los metabolitos secundarios liberados de la biomasa de retama, de la mezcla, y de mastranzo entre un 82% y 96% y en menor medida por la biomasa de eucalipto (hasta un 61%). En el caso de *D. sanguinalis*, la biomasa de mastranzo redujo más del 90 % el crecimiento, seguido por la biomasa de la mezcla hasta un 86%. Mientras que las biomasas de retama y eucalipto redujeron el crecimiento de la parte aérea de *D. sanguinalis* un 61% y 38%, respectivamente.

Para ambas malas hierbas el efecto de la mezcla fue superior a la suma de los efectos de las tres especies por separado. El eucalipto redujo un 47% la longitud radicular de *A. powellii*, la retama la redujo un 81% y el mastranzo un 86%; mientras que la mezcla (efecto observado, O) redujo la longitud radicular de *A. powellii* un 83%. No obstante, si se tiene en cuenta el porcentaje de participación de cada una de las especies en la mezcla (65:25:10), se esperaría que el 65% de eucalipto redujera un 30% la longitud radicular de *A. powellii*, el 25% de retama la redujera un 20% y el 10% de mastranzo lo hiciera un 9%. Por tanto, si el efecto de la mezcla fuera aditivo, se esperaría que la mezcla redujera un 59% la longitud radicular, mientras que el efecto de las tres especies en la mezcla (efecto observado, O) produjo una reducción del 83% (**Figura 2**). Esto demuestra las interacciones sinérgicas entre los compuestos tanto volátiles como solubles liberados de las tres especies vegetales, haciendo que el efecto de cada especie en la mezcla sea mayor, aunque los compuestos de cada especie actúen a menor concentración.

40 También se analizó la presencia de aleloquímicos solubles presentes en la biomasa de cada especie y en la mezcla de las tres. El resultado se muestra en la **Tabla 1**.

45

50

Tabla 1. Aleloquímicos solubles presentes en la biomasa de eucalipto, retama, mastranzo y la mezcla de las tres especies.

	Eucalipto	Retama	Mastranzo	Mezcla
	<i>Ácidos fenólicos</i>			
5	Gálico	+		+
	Protocatéquico	+	+	+
	pOHbenzoico	+	+	+
	pOHbenzaldehyd o	+		
10	Vainíllico		+	+
	Cafeico	+	+	+
	Siríngico		+	
	p-Cumárico	+	+	+
	Ferúlico	+	+	+
15	Rosmarínico		+	+
	<i>Flavonoides</i>			
	Ácido elágico	+		+
	Rutina	+		+
20	Luteolina		+	
	Apigenina		+	
	Quercetina	+		
	Elagitanino 1	+		+
	Elagitanino 2	+		+
25	Prunetina		+	
	Nº TOTAL	9	5	10
			10	13

30 Ejemplo 2: Ensayo con la mezcla bioherbicida de eucalipto, retama y mastranzo (65:25:10) en invernadero de producción hortícola

A continuación, se estudió el efecto herbicida de la mezcla de biomasa alelopática en comparación con la biomasa de mastranzo, que tiene el mayor potencial fitotóxico de las tres especies.

Este ensayo se llevó a cabo en un invernadero de producción hortícola en Pazos de Borbén (Galicia). Se preparó el terreno mediante el uso de un cultivador rotativo, y se aplicó compost como fertilizante.

Se dividió el terreno en 16 parcelas de 2.25m² cada una, que se distribuyeron aleatoriamente para acoger los tratamientos del ensayo: en cuatro parcelas se incorporó al suelo biomasa seca y triturada de *M. suaveolens* 1% (p/p) (Puig *et al.* 2013. *Weed Science* 61(1), 154 - 161), cuatro parcelas se destinaron al tratamiento de escarda manual, en otras cuatro se incorporó la mezcla bioherbicida (eucalipto: retama: mastranzo 65:25:10) al 1% y las cuatro restantes se dejaron sin tratamiento como control del ensayo. En cada parcela se plantaron plántones de judía (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Amethyst) separadas entre sí 20 cm, y la semilla de nabo (*Brassica rapa* L.) se sembró a razón de 4 g * m²

Las malas hierbas espontáneas emergidas en cada parcela se muestrearon cada 15 días durante los dos meses siguientes al inicio del ensayo. El muestreo se realizó con ayuda de cuadrantes. Se lanzaron tres cuadrantes por cada parcela. La flora arvense encerrada en cada cuadrante se cortó a ras de suelo, se guardaron y se almacenaron a 4 °C. Posteriormente se

llevó a cabo la caracterización botánica de las muestras, la clasificación en grupos principales (monocotiledóneas o dicotiledóneas) y el conteo de plántulas de cada grupo. Las plantas separadas se secaron en la estufa a 70 °C durante 72 h, y se pesaron para determinar su biomasa seca (g).

5 La escarda se llevó a cabo en dos ocasiones en las parcelas denominadas "escarda", tras el primer (15 días tras la incorporación del tratamiento, DTI) y el segundo muestreo (30 DTI) de malezas. Las parcelas con mastranzo y mezcla sólo precisaron escarda a los 30 DTI.

10 La **Figura 3** muestra cómo ambos tratamientos (tercera y cuarta columna respectivamente) controlaron la emergencia de las especies de malezas tanto dicotiledóneas (A) como monocotiledóneas (B), reduciendo el número de plántulas más de un 90% con respecto al control (primera columna) a los 60 días tras el inicio del ensayo. Cabe destacar que, a pesar del intenso potencial alelopático del mastranzo demostrado en ensayos previos, la mezcla
15 resultó igualmente efectiva, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos.

La **Figura 4** muestra cómo la producción de los cultivos de judía (A) y nabo (B) no se vieron afectados por los abonos herbicidas, de hecho, la mezcla de especies tendió a estimular la
20 producción de nabo (cuarta columna). Primera columna: control, segunda columna: escarda, tercera columna: mastranzo, cuarta columna: mezcla.

Estos resultados confirman que la mezcla de eucalipto, retama y mastranzo tiene más capacidad herbicida frente a malezas que cualquiera de las especies por separado o el efecto
25 aditivo de las mismas, y además no solo no afecta al crecimiento de cultivos de interés, sino que además promueve su crecimiento. Estos resultados son sorprendentes e impredecibles teniendo en cuenta las divulgaciones del estado del arte. Las concentraciones de cada especie no son relevantes dado que, incluso añadiendo mastranzo en mucha menor cantidad, el efecto inhibitorio es muy significativo.

30 *Ejemplo 3: Procesado de biomasa en pellets*

Para la obtención de pellets de biomasa, el material vegetal fresco se secó a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, se trituró hasta obtener fragmentos de entre 3-5 cm.
35 El material triturado se molió hasta obtener un tamaño de partícula igual o menor a 5 mm. Luego se homogeneizó y humedeció hasta obtener una humedad en torno al 20% ± 5%

El material homogeneizado se peletizó en una peletizadora eléctrica con un motor de 380 V, potencia de 7,5 kW, rodillos fijos, y matriz de 6 mm. El pellet resultante presentó una densidad
40 de 1.100 kg/m³

Se analizó la composición de los pellets de cada especie. Se observó que los pellets de eucalipto presentaban un contenido medio en C y N del 46% y 1.1% respectivamente, y unos valores medios de PO⁴⁻, K⁺, Mg²⁺ y Ca²⁺ de 1.66, 1.19, 1.45 y 10.64 mg*g⁻¹ respectivamente.
45 Los pellets de mezcla de eucalipto: retama: mastranzo (65:25:10) presentaron un contenido medio en C y N del 45.6% y 1.5%, respectivamente y unos valores medios de PO⁴⁻, K⁺, Mg²⁺ y Ca²⁺ de 1.16, 3.17, 1.41 y 9.26 mg*g⁻¹ respectivamente.

Además, se analizó la presencia de aleloquímicos, tanto solubles como volátiles, presentes en
50 los pellets con biomasa de eucalipto y en los pellets con la mezcla de las tres especies. El resultado se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Aleloquímicos solubles y volátiles presentes en los pellets de eucalipto y pellets de mezcla.

	Pellet eucalipto	Pellet mezcla
5		
	<i>Compuestos solubles</i>	
		+
		+
		+
		+
10		+
		+
	<i>Compuestos volátiles</i>	
	+	+
	+	
15	+	+
		+
	+	+
		+
		+
20	+	+
		+
	+	+
	+	+
	9	14
25		

Ejemplo 4: Pellets de eucalipto vs material triturado: evidencia de mayor efectividad y duración del efecto herbicida de los pellets.

30

Además del control de malezas en los cultivos, otro de los trabajos agrícolas más demandantes de mano de obra es la escarda y retirada de malas hierbas que invaden pasos, pasillos, y borduras de las parcelas de cultivo. El objetivo de este bioensayo fue comparar el efecto desherbante a largo plazo de dosis mayores de eucalipto triturado o en forma de pellets aportados superficialmente al suelo, frente a un control (sin eucalipto).

35

40

El experimento de campo se llevó a cabo en As Eiras (Galicia). El terreno llevaba más de 20 años en barbecho, colonizado por vegetación espontánea. Los filodios y ramas finas de eucalipto (*E. globulus*) fueron recogidos en fresco y secados a temperatura ambiente y oscuridad. Para el material vegetal en forma de pellets se siguió el protocolo de pelletizado descrito en el Ejemplo 3.

45

Se desbrozaron y araron superficialmente parcelas de 1.25m² a las que se aportaron 5,8 kg de follaje de eucalipto, o bien triturado o bien en forma de pellets, que se mezcló someramente con el suelo. Esto correspondió a una dosis del 4% (p/p) que se ensayó para monitorizar la eficacia en el mantenimiento del desherbado de las parcelas y la duración del efecto desherbante, frente a parcelas control sin tratamiento.

50

A los 30 días tras la incorporación (DTI) se contó la emergencia de especies arvenses dicotiledóneas, por triplicado para cada tratamiento. A los 90 DTI se cosechó la biomasa de las malas hierbas para su caracterización botánica y clasificación en grupos principales según

Pedrol *et al.* 2010. Soil and Tillage Research, 110(1), 134-142), y luego en especies. Cada uno de los grupos obtenidos se secó a 70 °C durante 72 h y se utilizó para determinar la biomasa total de malezas.

5 En la **Figura 5** se observa que un mes tras la incorporación del material vegetal, el eucalipto triturado controló aproximadamente un 65% la emergencia y establecimiento de las malas hierbas dicotiledóneas, mientras que los pellets redujeron más de un 96 % el número de malas hierbas (ANOVA, $P \leq 0,01$).

10 Los pellets de eucalipto redujeron significativamente con respecto al control la densidad 5 (96,9%) y biomasa (92%) de especies dicotiledóneas, como *Echium plantagineum* o *Sonchus sp.* (con eliminación total en este tratamiento) (Tabla 3). El triturado tuvo efectos aparentes en la densidad (65, 6%) y la biomasa (64%) de malezas dicotiledóneas, pero en este último caso sin diferencias estadísticas con respecto al control (Tabla 3).

15 Tabla 3. Efectos de pellets de eucalipto y de biomasa triturada incorporados superficialmente al suelo, sobre el establecimiento y crecimiento de flora arvense 90 días tras la incorporación (DTI). Los valores representan la densidad (número) y biomasa (gramos) por m^2

Variable	Sig	Control	Pellets	Triturado
Número de especies	*	5.3 a	2.0 b	4.3 a
Densidad de arvenses dicotiledóneas ($n^{\circ} \cdot m^{-2}$)	**	170.7 a	5.3 b	58.7 b
25 Biomasa de arvenses dicotiledóneas ($g \cdot m^{-2}$)	*	213,3 a	16.8 b	75.9 ab
Biomasa total de flora arvense ($g \cdot m^{-2}$)	*	329,3 a	148.5 b	162.1 b

30 Sig.: los asteriscos denotan diferencias significativas entre tratamientos: *, $P \leq 0.05$, **, $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; n.s., no significativo (ANOVA o Prueba H de Kruskal-Wallis). Para cada variable, letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD post-hoc o prueba T2 de Tamhane para comparación múltiple de medias).

35 A los 3 meses de ensayo, sólo el tratamiento con pellets mostró una reducción del número y biomasa de malezas dicotiledóneas. Se demostró así que los pellets presentan un efecto herbicida más duradero en comparación con el material vegetal triturado. Un año después, los efectos desherbantes de los pellets todavía eran visualmente notorios. La **Figura 6** muestra el estado de la parcela con eucalipto triturado y con pellets a los 5 meses tras la incorporación, así como de la parcela control.

Ejemplo 5: Ensayo con pellets de eucalipto: evidencia herbicida en campo

45 El objetivo de este ensayo fue evaluar el efecto herbicida de los pellets de eucalipto incorporados al suelo en un campo hortícola en condiciones de producción real.

50 El experimento de campo se llevó a cabo durante la temporada de cultivo de tomate de huerta en Ponte Sampaio (Pontevedra). La parcela tenía un amplio historial de producción hortícola, estando en barbecho los tres años anteriores al ensayo.

Se distribuyeron aleatoriamente parcelas de 1m² con pellets de eucalipto obtenidos según el Ejemplo 3, o sin pellets (parcelas control), con cuatro repeticiones por tratamiento. En las parcelas tratadas con pellets, se esparcieron homogéneamente 1,3 kg de pellets de eucalipto, y con la ayuda de una azada se mezclaron con el suelo de los primeros 10 cm. Se utilizaron plantones para huerto de dos cultivares de tomate ('pera' y 'corazón de buey').

Los muestreos de malezas se realizaron a los 10, 21, 31, 42, 70, 92 y 150 días tras la incorporación (DTI) mediante lanzamiento al azar de cuadros de 25cm x 25cm en cada parcela, excluyendo los márgenes para evitar efectos de borde. La flora arvense incluida en el cuadro se arrancó de raíz y se llevó al laboratorio para su caracterización botánica y clasificación en grupos principales (mono o dicotiledóneas) y en especies, obteniendo el número de diferentes especies de malezas por parcela. Cada uno de los grupos obtenidos se secó a 70 °C durante 72 h y se utilizó para determinar la biomasa total de malezas y la contribución de cada grupo botánico a la biomasa total.

Las especies arvenses de las parcelas (con o sin pellets) se escardaron manualmente cuando se consideró necesario, para evitar la competencia con el cultivo.

La **Figura 7** muestra cómo *Digitaria sanguinalis* fue la especie arvense más abundante en las parcelas, pero también cabe destacar la presencia de *Cyperus* sp., *Amaranthus* sp., y *Portulaca oleracea*. El efecto herbicida de los pellets de eucalipto (línea discontinua) fue estadísticamente significativo desde el primer muestreo (10 DTI). Al mes y medio de la aplicación del tratamiento (42 DTI), se observó que los pellets habían controlado significativamente con respecto a las parcelas control (línea continua) la emergencia de *D. sanguinalis* (31%) y de la flora arvense dicotiledóneas (70%) Setenta días tras la incorporación, el efecto de los pellets sobre el número de malezas fue muy significativo con respecto al control previo a la escarda ($P \leq 0.001$), viéndose reducido el número de *D. sanguinalis* un 71% y de malezas dicotiledóneas y monocotiledóneas un 90% y 66%. respectivamente.

A los 42 DTI, los pellets redujeron la biomasa total de *D. sanguinalis* un 55% y de malezas dicotiledóneas y monocotiledóneas un 89% y 57%, respectivamente (**Figura 8**, columnas gris oscuro: sin pellets; columnas gris claro: con pellets). Por tanto, en las primeras seis semanas de cultivo fue necesario realizar una escarda manual de las parcelas sin pellets, pero no de las parcelas con pellets, las cuales no necesitaron escarda hasta un mes más tarde (70DTI) . Las parcelas sin pellets necesitaron una segunda escarda a los 3 meses tras el inicio del experimento (92 DTI). Como se observa en la figura, tras 5 meses desde la incorporación (150 DTI) los pellets de eucalipto seguían controlando la flora arvense dicotiledónea con reducciones de más del 80% con respecto a las parcelas sin pellets.

La biomasa de las especies monocotiledóneas fue algo superior, ocupando en parte el espacio dejado por las dicotiledóneas. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre tratamientos en la biomasa acumulada de malezas al finalizar el ensayo (150 DTI) a pesar de que las parcelas sin pellets necesitaron dos escardas manuales. Esto sugiere la mitad de infestación de malas hierbas y de trabajos de escarda como resultado de una sola aplicación inicial de pellets.

Con este ensayo se demostró que el herbicida a base de pellets de eucalipto controla la emergencia de las malas hierbas del banco de semillas del suelo, reduciendo la necesidad de escarda manual. En las parcelas sin pellets, tras la primera escarda las malas hierbas volvieron a emerger, y se precisó una segunda escarda para lograr la cosecha de tomates Es probable que el uso de los pellets durante sucesivos ciclos de cultivo reduzca progresivamente el banco de semillas del suelo, hasta llegar a agotarlo, de modo que se pueda prescindir de la escarda manual.

Ejemplo 6: Mezclas de biomasa de especies alelopáticas: selección de proporciones efectivas y mezcla óptima

5 El objetivo de este ensayo fue establecer la proporción idónea de biomasa de cada una de las tres especies alelopáticas en la mezcla, y establecer rangos para cada una. Las mezclas de especies propuestas son proporcionales a la abundancia de cada especie en el agroecosistema atlántico, y seleccionadas según su especificidad para el control de distintas malas hierbas.

10 Los rangos de proporciones de partida de cada ingrediente en las mezclas de biomasa alelopática propuestas son consistentes con la abundancia de cada especie en el agroecosistema atlántico y potencial alelopático:

15 - El eucalipto es el ingrediente más abundante en el agroecosistema atlántico. La biomasa de filodios y ramas finas mantiene propiedades bioherbidas todo el año. La retama es abundante en la naturaleza, siendo una especie nativa del matorral atlántico. Tiene efectos bioherbidas sobre especies que el eucalipto no controla (*Convolvulus arvensis* y *Portulaca oleracea*), aunque su mayor potencial alelopático coincide en estado de floración, en primavera.

20 - El mastranzo tiene efectos bioherbidas muy intensos, siendo la especie más fitotóxica. Sin embargo, en comparación con el eucalipto y la retama, la disponibilidad de biomasa en el agroecosistema es limitada, así como su rendimiento en materia seca.

25 Filodios de *E. globulus* y las ramas floridas de *C. scoparius* y *M. suaveolens* fueron recogidos en fresco y secados a temperatura ambiente y oscuridad. Posteriormente fueron triturados para su uso.

Se emplearon tres especies de malezas agrícolas *D. sanguinalis* L. (monocotiledónea), *A. powellii* L. y *C. canadensis* L. (dicotiledóneas) como especies diana.

30 Se realizaron 7 mezclas a distintas proporciones de *E. globulus*, *C. scoparius* y *M. suaveolens* (E:C:M) mezcla 1 (65:25:10), mezcla 2 (60:25:15), mezcla 3 (70:25:5), mezcla 4 (60:35:5), mezcla 5 (75:20:5), mezcla 6 (80:10:10), mezcla 7 (90:5:5).

35 Para la preparación de los extractos acuosos, el material vegetal seco de cada especie mezclado a la proporción correspondiente fue sumergido en agua destilada a una relación peso seco/volumen de agua destilada de $16.7\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Puig *et al.* 2013. *Weed Science*, 61(1), 154-161.; Pardo-Muras *et al.* 2020. *South African Journal of Botany*, 133, 201 – 211). Los matraces se mantuvieron en agitación orbital y en oscuridad a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente se filtraron al vacío por papel Whatman n°2.

40 Para *A. powellii*, se dispusieron 25 semillas en placas de 5,5 cm de diámetro con papel de filtro humedecido con 1,5 mL de extracto acuoso de cada mezcla o agua destilada (control). Se realizaron cuatro réplicas para cada tratamiento. Mientras que para *D. sanguinalis* y *C. canadensis*, se emplearon placas de 6 pocillos. En cada pocillo se dispusieron un total de 10 semillas sobre el papel de filtro humedecido con 600 μL del extracto, o agua destilada. Se llevaron a cabo 6 réplicas por tratamiento.

50

Las placas fueron incubadas a 33/20 °C y fotoperiodo de 12h de luz y 12h de oscuridad Tras 72, 96 y 120 h de incubación para *C. canadensis*, *D. sanguinalis* y *A. powellii* respectivamente, se contó el número de semillas germinadas y se midió su longitud radicular y de la parte aérea. Además, se calculó el Índice de vigor (IV) a partir de la fórmula definida por Anupama *et al.* 2014. Asian Journal of Science and Technology, Vol. 5, pp. 412-416:

$$IV = \text{porcentaje de germinación (\%)} \times \text{longitud total plántula (mm)}$$

Todas las mezclas 1 a 7 inhibieron la germinación y redujeron el crecimiento temprano de las tres malas hierbas de forma significativa con respecto al control (**Figura 9**). Por otro lado, las mezclas presentaron efectos fitotóxicos estadísticamente indistinguibles entre sí.

Teniendo en cuenta que una de las especies de malas hierbas de verano más problemáticas y abundantes en los campos de cultivo es *D. sanguinalis*, se analizó el efecto de la mezcla en esta mala hierba en detalle. La **Figura 10** muestra que las mezclas 1, 2, 3 y 6 inhibieron significativamente la germinación de *D. sanguinalis* entre un 20 y un 28% con respecto al control. Aunque todas las mezclas afectaron negativamente a la longitud de radícula, las mezclas 1 y 6 fueron las que presentaron mayores porcentajes de reducción (80 %). Por otro lado, la mezcla 1 (65:25:10) fue la que más redujo el crecimiento de la parte aérea (88 %), lo que se tradujo en una mayor reducción del índice de vigor de *D. sanguinalis*.

Con este experimento se demostró que todas las mezclas fueron fitotóxicas frente a la germinación y crecimiento temprano de las malas hierbas estudiadas.

Ejemplo 7: Actividad herbicida de los pellets de mezcla de biomasa alelopática en un cultivo

El objetivo de este ensayo fue corroborar el efecto herbicida de los pellets de la mezcla eucalipto: retama: mastranzo en un cultivo de judía.

El suelo agrícola empleado fue recogido de un campo de cultivo localizado en Vigo (Galicia). El campo se había dedicado a producción hortícola durante 15 años y luego se dejó en barbecho durante los cuatro últimos años. El suelo se tamizó a través de malla de 2 mm para eliminar los desechos y los restos vegetales.

Los filodios de eucalipto y las ramas en flor de retama y mastranzo fueron recogidos en fresco y secados a temperatura ambiente y oscuridad. Una vez seco el material vegetal, se siguió el protocolo de peletizado descrito en el ejemplo 3: procesado de la biomasa en pellets. Los pellets de la mezcla eucalipto: retama: mastranzo se realizaron a la proporción (65:25:10).

El ensayo en maceta fue llevado a cabo bajo condiciones de invernadero (luz natural, $T \leq 26^\circ\text{C}$). Las macetas de plástico de 20 cm de diámetro (5L) se llenaron con el suelo agrícola y los pellets fueron mezclados con el suelo de los primeros 10 cm en superficie. La dosis empleada fue del 1% (proporción de peso seco de material vegetal por peso seco de suelo), equivalente a 41 gr de pellets en cada maceta. El tratamiento control consistió en suelo agrícola mezclado con pajitas de plástico que imitan el efecto de ahuecado del mismo volumen de los pellets incorporados en el suelo (Wuest *et al.* 2000. Soil Tillage Res. 55:175-182). Cada tratamiento fue replicado 4 veces. Las macetas fueron regadas a la máxima capacidad de campo. Posteriormente, se sembró a 2 cm de profundidad 3 semillas equidistantes de judía (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Efequinca), y 24 mg de semillas de cada una de las siguientes malas hierbas: *A. powellii*, *P. oleracea*, *S. nigrum*, y *E. crus-galli* (6 g*m⁻² Puig *et al.* 2013 Weed Science, 61(1) 154-161; Pardo-Muras *et al.* 2020. Plants 9: 203).

5 Cada dos días se registró la emergencia de las malezas y de las plántulas de judía hasta que las macetas control (sin pellets) estuvieron atestadas (12 días después de la incorporación). Treinta días después de la incorporación se contó el número final de plántulas. La flora arvense se cosechó cortando las especies a nivel del suelo; fueron identificadas y separadas por especie. A continuación, cada grupo se secó a 70 °C durante 72 h para obtener la biomasa aérea por especies (g peso seco). Las plantas de judía fueron procesadas como se describió para la flora arvense indicado anteriormente.

10 Se demostró que la mezcla de biomasa alelopática es peletizable sin necesidad de aglutinante. Principalmente se debe a que los filodios y ramas finas de eucalipto tienen un alto contenido en aceite esencial y lignina que actúan como aglutinantes naturales, manteniendo el pellet compacto. Esto corrobora la necesidad de su presencia mayoritaria en la mezcla, además de su potencial herbicida y disponibilidad de biomasa en el agroecosistema.

15 Los pellets de la mezcla redujeron la emergencia de especies arvenses desde el día 4 tras la incorporación, siendo el día 12 un 52% menor en relación con el control (sin pellets) ($P \leq 0,01$; Figura 11, línea continua sin pellets, línea discontinua con pellets de mezcla).

20 Treinta días tras la incorporación de los pellets de mezcla, los datos revelaron una reducción del 50% del número total de plántulas por maceta en relación con el control (sin pellets). El uso de pellets de mezcla controló la germinación de malezas de hoja ancha o dicotiledóneas (p.ej., *A. powellii*, *P. oleracea* y *S. nigrum*) entre un 52 y 84% y la flora arvense de hoja estrecha o monocotiledóneas (p.ej., *E. crus-galli*) hasta un 24% (Tabla 4).

25 **Tabla 4.** Efectos de los pellets de mezcla de biomasa alelopática incorporados superficialmente al suelo, sobre el establecimiento y crecimiento de malas hierbas 30 días tras la incorporación (DTI). Los valores representan el porcentaje de reducción con respecto a las macetas control (sin pellets).

	Reducción (%)	Sig.
Efectos generales (% r.c.)		
Densidad de plántulas de malas hierbas	50.0	***
Densidad de malas hierbas monocotiledóneas	20.2	*
Densidad de malas hierbas dicotiledóneas	66.6	***
Efectos específicos (% r.c.)		
Densidades por especie de mala hierba		
<i>Amaranthus powellii</i>	51.8	**
<i>Echinochloa crus-galli</i>	23.6	*
<i>Portulaca oleracea</i>	69.4	**
<i>Solanum nigrum</i>	84.3	**

30 Sig. los asteriscos denotan diferencias significativas en relación con el control (sin pellets) un signo, $P \leq 0.05$ dos signos, $P \leq 0.01$; tres signos, $P \leq 0,001$; n.s., no significativo (prueba t para muestras independientes).

35 El uso de los pellets de mezcla resultó inocuo para el cultivo de judía, cuya biomasa aérea no sufrió reducciones significativas con respecto al control sin pellets.

REIVINDICACIONES

1. Una composición herbicida caracterizada por que comprende biomasa de eucalipto (*Eucalyptus globulus Labill*) y retama (*Cytisus scoparius* (L.) Link) y mastranzo (*Mentha suaveolens* Ehrh.).
5
2. La composición herbicida de la reivindicación 1, caracterizada por que comprende entre 40 y 100% p/p de biomasa de eucalipto, entre 0 y 40% p/p de biomasa de retama y entre 0 y 20% p/p de biomasa de mastranzo, respecto al peso total de la composición.
- 10 3. La composición herbicida de la reivindicación 2, caracterizada por que comprende entre 60 y 90% p/p de biomasa de eucalipto, entre 5 y 30% p/p de biomasa de retama y entre 5 y 10% p/p de biomasa de mastranzo, respecto al peso total de la composición.
- 15 4. La composición herbicida de la reivindicación 3, caracterizada por que comprende entre 60 y 75% p/p de biomasa de eucalipto, entre 20 y 35% p/p de biomasa de retama y entre 5 y 10% p/p de biomasa de mastranzo, respecto al peso total de la composición.
- 20 5. La composición herbicida de la reivindicación 4, caracterizada por que comprende 65% p/p de biomasa de eucalipto, 25 % p/p de biomasa de relama y 10% p/p de biomasa de mastranzo, respecto al peso total de la composición.
- 25 6. La composición herbicida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5. caracterizada por que está en forma triturada o en forma de pellet.
7. La composición herbicida de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada por que la composición es en forma de pellet
8. Uso de la composición herbicida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la inhibición de la germinación y/o del crecimiento de especies arvenses.
- 30 9. Procedimiento para la inhibición de la germinación y/o del crecimiento de especies arvenses que comprende administrar al suelo biomasa triturada o pellets que consisten en la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

FIG. 1

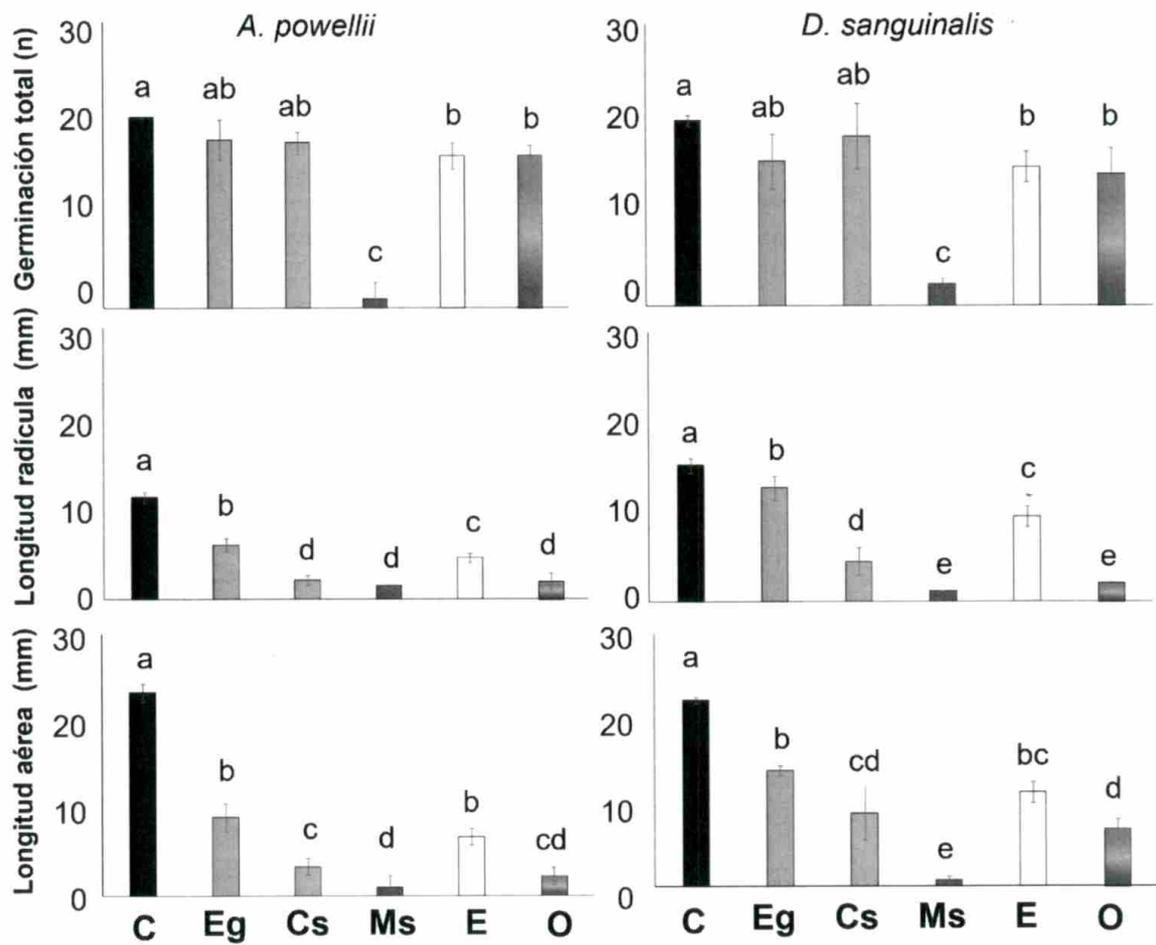


FIG. 2

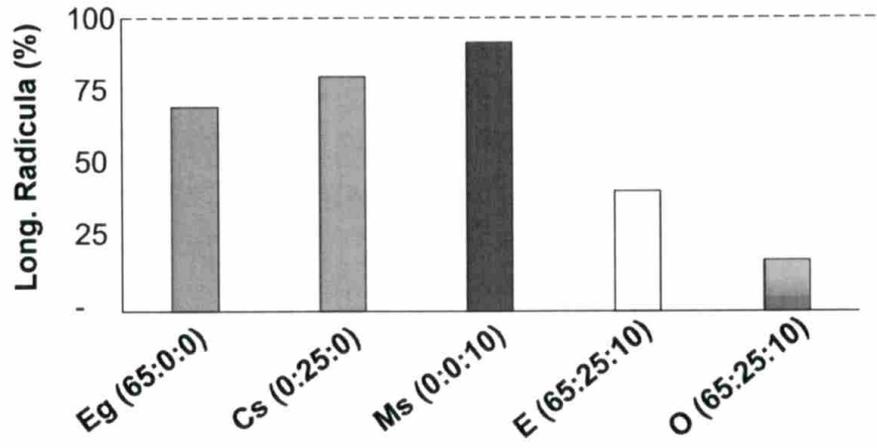


FIG. 3

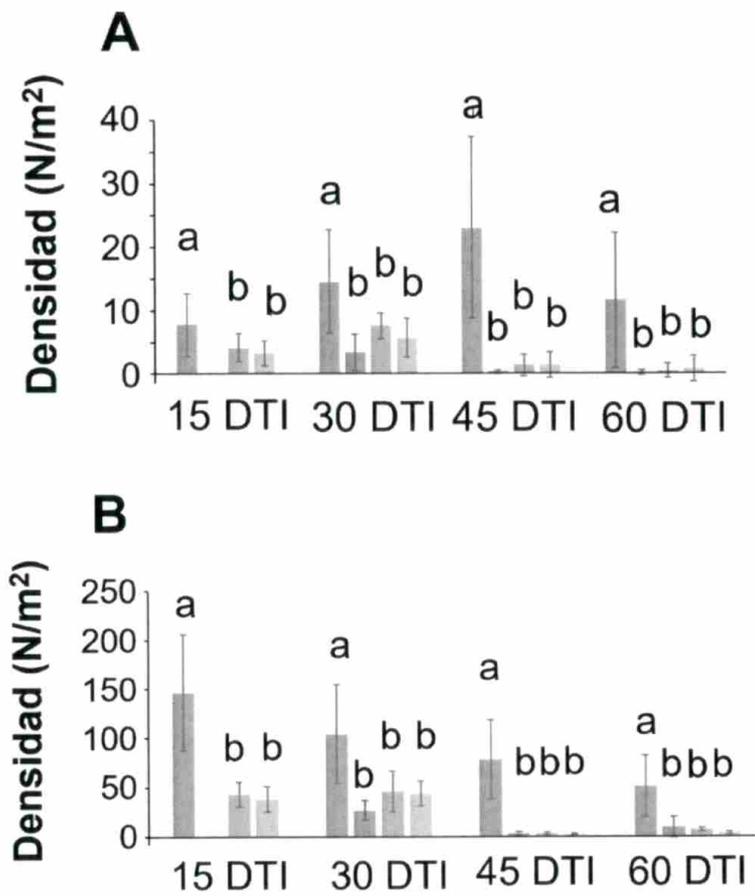


FIG. 4

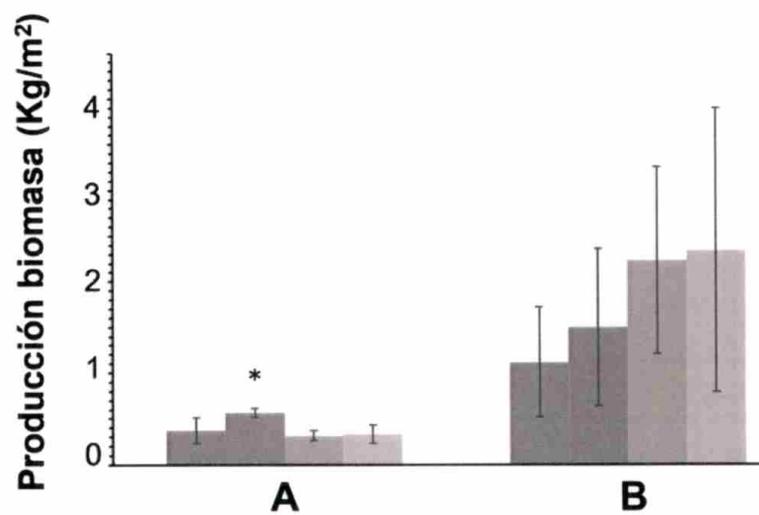


FIG. 5

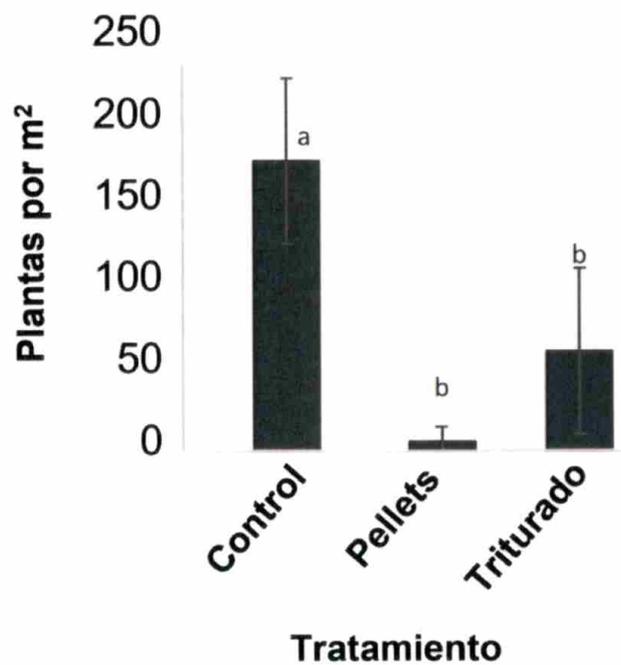


FIG. 6

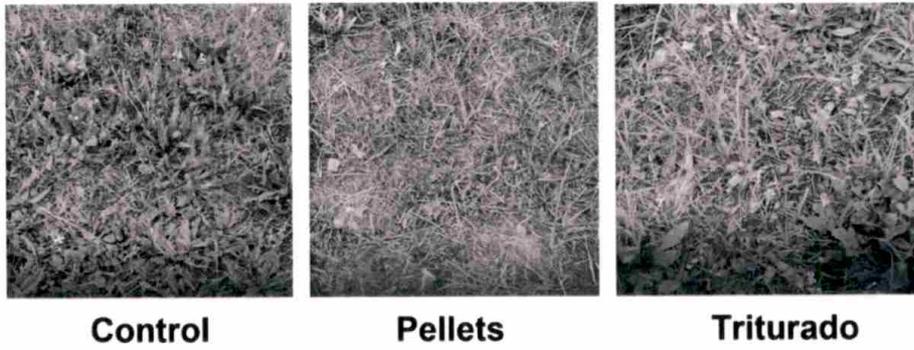


FIG. 7

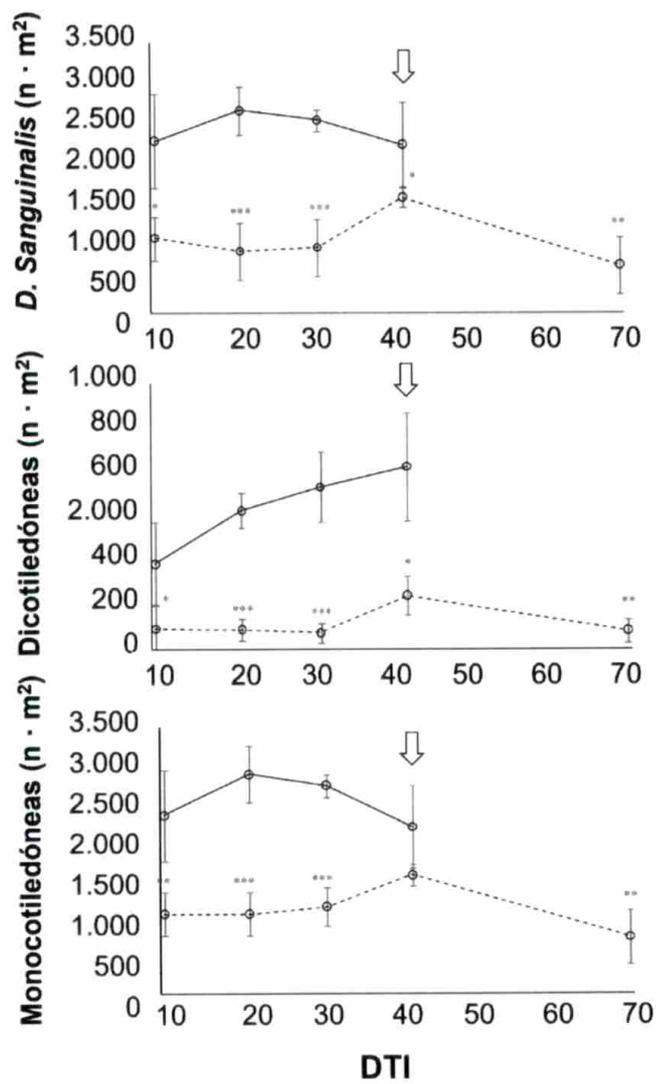
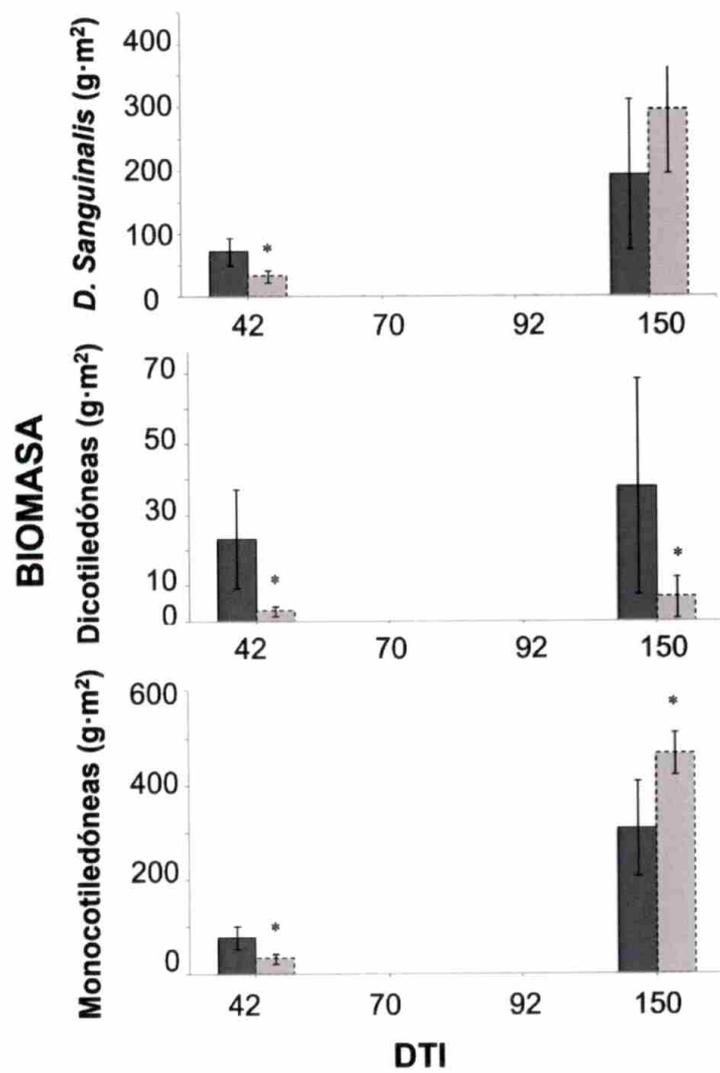


FIG. 8



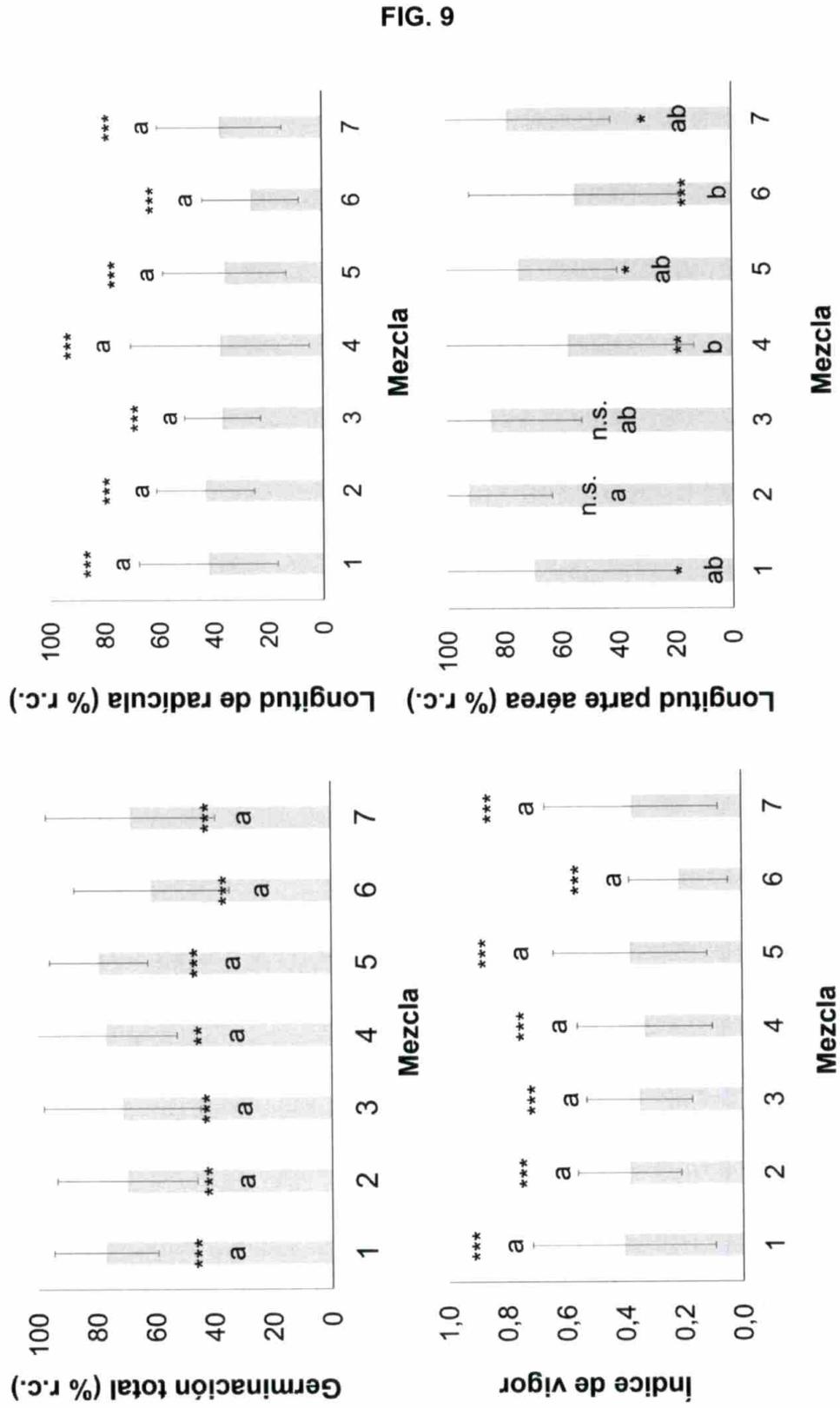


FIG. 10

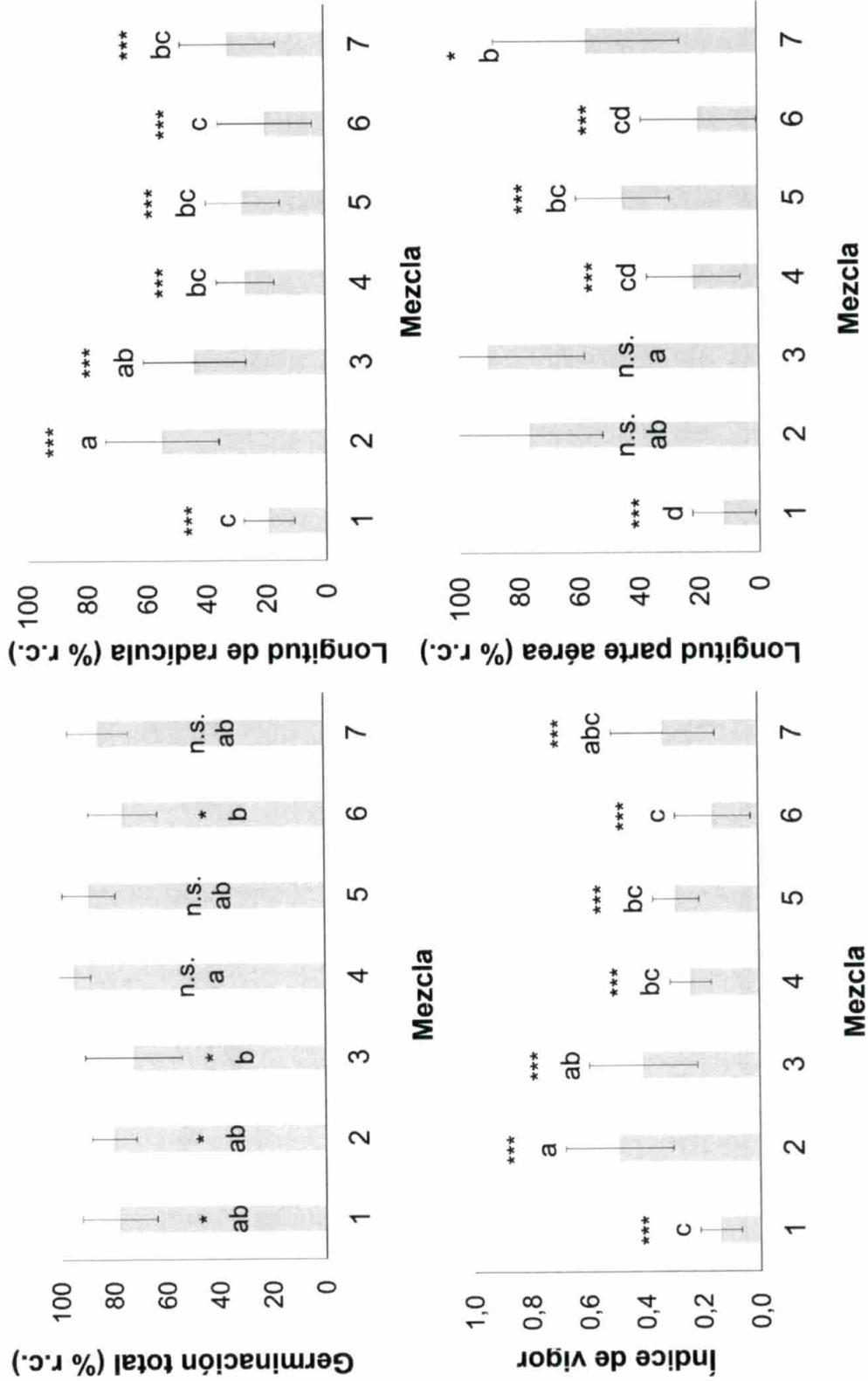


FIG. 11

