

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HERBICIDA POR ACCIÓN ALELOPÁTICA DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE *Helianthus annuus* SOBRE LAS MALEZAS *Bothriochloa pertusa* L., *Digitaria bicomis* L., y *Leptochloa mucronata* PROPIAS DE UN CULTIVO DE *Zea maíz*

Trabajo de grado

**DALGIS ALDANA ALDANA
HERNAN VARGAS ROMERO**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SINCELEJO
2.003**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HERBICIDA POR ACCIÓN
ALELOPÁTICA DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE *helianthus
annuus* SOBRE LAS MALEZAS *Bothriochloa pertusa* L., *Digitaria
Bicomis* L., y *Leptochloa mucronata* PROPIAS DE UN CULTIVO DE *Zea
maíz***

**Tesis presentada como requisito parcial para optar el título de Biólogo
con énfasis en biotecnología**

**DIRECTOR
RITA LUZ MARQUEZ VIZCAÍNO
Química Farmacéutica
Magíster en Biología P.U.J.**

**DALGIS ALDANA ALDANA
HERNAN VARGAS ROMERO**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SINCELEJO**

2.003

Los criterios expuestos, las opiniones expresadas y las conclusiones anotadas son responsabilidad de los autores y no comprometen en nada a la Universidad de Sucre (art. 12 Resolución 02 de 2.003) del reglamento de los trabajos de grado y de investigación.

DEDICATORIA

*A mi Dios por fortalecerme, protegerme y
acompañarme hoy y siempre.*

*A mi padre Guido y a mi madre Nancy por su
esfuerzo, apoyo, paciencia y constante
lucha.*

*A mi hija Dannita por ser la principal
fuente de inspiración.*

*A mis hermanos por su comprensión y
estímulo.*

*A mi esposo Carlos por impulsarme a seguir
adelante.*

Dalgis

DEDICATORIA

*A Dios, el Padre, por darme fortaleza y
sabiduría.*

*A mis padres Hernán e Inés, por su
comprensión y apoyo incondicional.*

*A todos mis profesores que de una u otra
forma aportaron en mi formación
intelectual.*

A mis compañeros y amigos.

Hernán.

AGRADECIMIENTOS

Luego de muchos esfuerzos y desvelos, por fin vemos realizados nuestros sueños de obtener nuestro título como Biólogos. Agradecemos a la Universidad de Sucre por ser la artífice de este gran logro.

A nuestra directora Rita Luz Márquez Vizcaino por su valiosa asesoría y sus sabios consejos.

Al profesor Gaitán por su colaboración en la ciudad de Cartagena.

Al Lic. Alfredo España por su aporte en la parte estadística.

A Nancy Aidana por su empeño, paciencia y eficacia en la digitación de nuestro proyecto.

A nuestros padres por su apoyo y ayuda incondicional.

A nuestros compañeros tesisistas a quienes les deseamos la mejor de las suertes en su vida profesional.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEORICO	3
1.1. ALELOPATÍA	3
1.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	16
1.3. FITOQUIMICA	18
1.4. BIOENSAYOS	22
1.4.1. Efecto de extracto acuosos de girasol sobre la germinación y crecimiento en las especies de malezas en estudio	22
2. METODOLOGÍA	23
2.1. RECOLECCIÓN Y MUESTRA	23
2.2. ANÁLISIS DE SUELO	24
2.2.1. Determinación de los niveles de hierro, potasio y calcio en las muestras de suelo	24
2.3. MÉTODOS APLICADOS EN EL ESTUDIO QUÍMICO	24
2.3.1. Tamizaje fitoquímico preliminar para el reconocimiento de Metabolitos secundarios	24

2.3.2. Obtención de los extractos	25
2.3.3. Métodos aplicados en el estudio biológico	25
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
3.1. ESTUDIO QUÍMICO	31
3.1.1. Análisis de suelo	31
3.1.2. Identificación de metabolitos secundarios en los extractos de <i>Helianthus annuus</i>	34
3.1.2.1. Reconocimiento de los metabolitos secundarios mediante tamizaje fitoquímico preliminar	34
3.1.2.2. Reconocimiento de metabolitos secundarios mediante cromatografía en capa delgada bidimensional	36
3.2. ESTUDIO BIOLÓGICO	38
3.2.1. Evaluación de la actividad herbicida sobre la maleza <i>Bothriochloa pertusa</i> L.	38
3.2.2. Evaluación de la actividad herbicida sobre la maleza <i>Digitaria bicomis</i> L.	44
3.2.3. Evaluación de la actividad herbicida sobre la maleza <i>Leplochioa mucronata</i> .	49
3.2.4. Efectos de la germinación ante la concentración 100 ppm de extractos de girasol sobre la maleza <i>Bothriochloa pertusa</i> L.	54
3.2.5. Efectos de la concentración 100 ppm sobre plantas de maíz (zea maíz)	55

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

INDICES DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. Rutas de biosíntesis de aleloquímicos	8
FIGURA 2. Vías a través de las cuales se liberan los agentes alelopáticos al entorno	9
FIGURA 3. Procedimiento: Preparación de diluciones del liofilizado aplicado a los ensayos de bioactividad	27
FIGURA 4. Procedimiento: Preparación de diluciones del reflujo aplicado a los ensayos de bioactividad	28
FIGURA 5. Experimentación general	29
FIGURA 6. Experimentación general	30
FIGURA 7. Espectrofotómetro de adsorción y emisión atómica	34
FIGURA 8. Cromatografía en capa delgada de la fracción clorofórmica del extracto acuoso total	36
FIGURA 9. Cromatografía bidimensional con patrones auténticos	37
FIGURA 10. Crecimiento promedio vs. concentración del primer ensayo de <i>Bothriochloa pertusa</i> L.	40
FIGURA 11. Crecimiento promedio vs. concentración del segundo ensayo de <i>Bothriochloa pertusa</i> L.	41
FIGURA 12. Crecimiento promedio vs. concentración del tercer ensayo	

de <i>Bcithriochloa pertusa</i> L.	43
FIGURA 13. Crecimiento promedio vs. concentración del primer ensayo de <i>Digitaria bicomis</i> L.	45
FIGURA 14. Crecimiento promedio vs. concentración del segundo ensayo de <i>Digitaria bicomis</i> L.	47
FIGURA 15. Crecimiento promedio vs. concentración del tercer ensayo de <i>Digitaria bicomis</i> L.	48
FIGURA 16. Crecimiento promedio vs. concentración del primer ensayo de <i>Leptochloa mucronata</i> .	50
FIGURA 17. Crecimiento promedio vs. concentración del segundo ensayo de <i>Leptochloa mucronata</i> .	51
FIGURA 18. Crecimiento promedio vs. concentración del tercer ensayo de <i>Leptochloa mucronata</i> .	53
FIGURA 19. Porcentaje germinación vs. tratamiento de <i>Bcithriochloa pertusa</i> L.	55
FIGURA 20. Bioensayo de la maleza <i>Botriochloa pertusa</i> L.	56
FIGURA 21. Bioensayo de la maleza <i>Digitaria bicomis</i> L.	57
FIGURA 22. Bioensayo de la maleza <i>Leptochloa mucronata</i> .	58

INDICE DE CUADROS

	Pág.
CUADRO 1. Porcentaje promedio de los niveles de hierro, calcio y potasio en las muestras de suelo	33
CUADRO 2. Tamizaje fitoquímico preliminar	35
CUADRO 3. Crecimiento promedio del primer ensayo de <i>Bhriochloa pertusa</i> L.	38
CUADRO 4. Análisis de varianza del primer ensayo de la maleza <i>bhriochloa pertusa</i> L.	39
CUADRO 5. Crecimiento promedio del segundo ensayo de <i>bhriochloa pertusa</i> L.	40
CUADRO 6. Análisis de varianza del segundo ensayo de <i>Bhriochloa pertusa</i> L.	41
CUADRO 7. Crecimiento promedio del tercer ensayo de <i>Bhriochloa pertusa</i> L.	42
CUADRO 8. Análisis de varianza del tercer ensayo de <i>Bhriochloa pertusa</i> L.	42
CUADRO 9. Crecimiento promedio del primer ensayo de <i>Digitaria bicomis</i> L.	44
CUADRO 10. Análisis de varianza del primer ensayo de <i>Digitaria</i>	

<i>bicomis</i> L.	45
CUADRO 11. Crecimiento promedio del segundo ensayo de <i>Digitaria</i> <i>bicomis</i> L.	46
CUADRO 12. Análisis de varianza del segundo ensayo de <i>Digitaria</i> <i>bicomis</i> L.	47
CUADRO 13. Crecimiento promedio del tercer ensayo de <i>Digitaria</i> <i>bicomis</i> L.	47
CUADRO 14. Análisis de varianza del tercer ensayo de <i>Digitaria</i> <i>bicomis</i> L.	48
CUADRO 15. Crecimiento promedio del primer ensayo de <i>Leptochloa</i> <i>mucronata</i> .	49
CUADRO 16. Análisis de varianza del primer ensayo de <i>Leptochloa</i> <i>mucronata</i> .	49
CUADRO 17. Crecimiento promedio del segundo ensayo de <i>Leptochloa</i> <i>mucronata</i> .	50
CUADRO 18. Análisis de varianza del segundo ensayo de <i>Leptochloa</i> <i>mucronata</i> .	51
CUADRO 19. Crecimiento promedio del tercer ensayo de <i>Leptochloa</i> <i>mucronata</i> .	52
CUADRO 20. Análisis de varianza del tercer ensayo de <i>Leptochloa</i> <i>mucronata</i> .	52
CUADRO 21. Promedio de germinación de la maleza <i>Bothriochloa</i> <i>peritusa</i> L.	54
CUADRO 22. Crecimiento promedio (cm) del maíz durante 8 días	55

RESUMEN

Del extracto acuoso de *Helianthus annuus*, mediante tamizaje fitoquímico preliminar, se obtuvieron resultados positivos para metabolitos tales como terpenos, flavonoides, lactonas, triterpenoides, antocianinas y saponinas.

Así mismo, la fracción clorofórmica, mediante cromatografía en capa delgada bidimensional se identificaron sustancias de tipo terpénicas como Acetato de β -amirina y Friedelano, utilizando patrones auténticos de estos metabolitos.

La concentración 100 ppm en los bioensayos demostró ser la más activa tanto en la especie *Bothriochloa peritusa* L. como para la especie *Leptochloa mucronata*, mostrando diferencias altamente significativas ($P = 0,01$) entre las diferentes concentraciones del extracto acuoso de las hojas de *Helianthus annuus*.

ABSTRACT

From the aqueous extract of *Helianthus annuus*, through preliminary phitochemical sifting, positive results for metabolites were obtained such as terpenes, flavonoides, lactones, triterpenoides, antocianines and saponines.

Likewise, from the chloroformic fraction, through thin layer bidimensional chromatography some terpenic substances were identified such as β - amirine acetate and Friedelane, using authentic patterns of these metabolites.

The 100 ppm concentration in the bioassays showed to be most active for both species *Bothriochloa pertusa* L. and *Leptochloa mucronata*, showing highly significative differences ($P = 0,01$) between the different concentrations of the extract.

INTRODUCCIÓN

Las plantas, debido a su inmovilidad, son las especies de los seres vivos que más han tenido que desarrollar mecanismos de interacción química con su entorno, estableciéndose así una pirámide de relaciones de la planta con el resto del ecosistema. Ante esta forzada inmovilidad a que se ven sometidas las plantas ha hecho que se desarrollen, de forma mas pronunciada, mecanismos químicos de defensa.

En esta lucha se pueden diferenciar dos niveles. El primero hace referencia únicamente a la competencia que se establece entre las plantas por la consecución de ciertos factores que permitan el desarrollo de la vida (agua, minerales, luz) sin que intervenga ningún otro tipo de mecanismo. El segundo nivel contempla las interacciones bioquímicas beneficiosas y perjudiciales que se producen entre las diferentes especies vegetales también con el fin de prevalecer en un espacio vital que asegure la obtención de los recursos antes mencionados, este nivel es conocido como Alelopatia¹.

La suma de ambos efectos daría como resultado el comportamiento observado a nivel macroscópico, y que se conoce como interferencia para designar el efecto total de una planta sobre otra, englobando de esta manera los efectos alelopáticos y los competitivos².

El estudio de la alelopatía puede abordarse desde diferentes puntos de vista, dependiendo del aspecto específico que se quiere tener en cuenta; esta investigación estaría enfocada hacia el estudio fitoquímico de la especie *Helianthus annuus*, a fin de evaluar el grado de bioactividad de sus metabolitos secundarios como posibles responsables del comportamiento alelopático tanto en sistemas manipulados (cultivos in Vitro) como

en campo y probar su potencial como herbicida natural ¹.

La importancia del conocimiento de los mecanismos a través de los cuales las plantas, tanto cultivos como malas hierbas, interaccionan con su entorno radica en que permitirán, por un lado, un correcto diseño de la rotación de cultivos que minimicen las pérdidas que se producen en ciertos monocultivos (girasol, trigo, sorgo, cebada, café...) por fenómenos como autotoxicidad y cansancio del suelo¹.

Por otra parte, la utilización del potencial alelopático de ciertos cultivos permitirá la disminución del uso de herbicidas y la utilización de desechos de estos cultivos como "herbicidas naturales". Por último, el conocimiento de los compuestos fitotóxicos responsables de estas actividades permitirá el diseño de nuevos herbicidas tomando como modelos los desarrollados en la propia naturaleza. Es de esperar que esta nueva generación de herbicidas y pesticidas tenga un menor impacto medioambiental debido a su biodegradabilidad¹.

MARCO TEORICO

1.1. *ALELOPATIA: Conceptos y Generalidades.*

Algunas plantas producen un número considerable de sustancias biológicamente activas que, al ser liberadas al medio ambiente, afectan directa o indirectamente tanto a otras especies de plantas como a los animales. En el caso de las plantas superiores, esos compuestos pueden influir en los procesos reguladores de la germinación, el crecimiento y el desarrollo, la acción de tales sustancias se conoce como *alelopatía*.

El termino alelopatía procede del griego allelon = uno al otro, del griego pathos = sufrir; efecto injurioso de uno sobre otro o “perjuicio mutuo”. Fue utilizado por primera vez por Molisch para hacer referencia a todas las interacciones de tipo bioquímico, tanto estimuladoras como inhibidoras, que pudieran existir entre las plantas, incluyendo los microorganismos⁴.

Siguiendo esta definición, en todo fenómeno alelopático existe una planta (donadora) que libera al medio ambiente por una determinada vía (lixiviación, descomposición de residuos, etc.) compuestos químicos los cuales al ser incorporados por otra planta (receptora) provocan un efecto perjudicial o benéfico sobre germinación, crecimiento o desarrollo de esta ultima.

Los agentes responsables de la transmisión de tales informaciones son algunas moléculas químicas activas, denominadas *compuestos, agentes o sustancias alelopáticas*⁵.

La mayoría de los agentes alelopáticos en plantas superiores corresponden a *metabolitos secundarios*. Existe una gran diversidad de estos compuestos, que pueden ser sintetizados por las vías metabólicas, ya sea del ácido shikímico o del acetato o por una combinación de estas dos rutas biosintéticas⁶.

Naturaleza Química de los Agentes alelopáticos.

La naturaleza química de los agentes alelopáticos es muy variada. A medida que progresan las investigaciones en el tema se incorporan nuevos grupos de sustancias a las cuales no se les atribuía esta actividad biológica. Normalmente la literatura especializada los ordena en los siguientes grupos:

-Compuestos Alifáticos: Pocos de estos compuestos son conocidos por su actividad inhibitoria de la germinación de semillas y el crecimiento de plantas. Comprenden varios ácidos (por ejemplo, oxálico, crotónico, fórmico, butírico, acético, láctico y succínico) y alcoholes (tales como metanol, etanol, n-propanol y butanol) solubles en agua, que son constituyentes comunes presentes en plantas y suelo. Bajo condiciones aeróbicas los ácidos alifáticos son rápidamente metabolizados en el suelo, por lo cual no pueden considerarse una importante fuente de actividad alelopática⁵.

-Lactonas no saturadas: Son poderosos inhibidores de crecimiento aunque el rol de estos compuestos en alelopatía no se conoce completamente. (por ejemplo psilotina, psilotinina y protoanemonina)⁵.

-Lípidos y ácidos grasos: Existen varios ácidos grasos tanto de plantas terrestres como acuáticas que son inhibitorias de crecimiento vegetal. Podemos citar los siguientes: ácidos linoleico, mirístico, palmítico, láurico e hidroxiesteárico. Su rol en alelopatía no está completamente investigado⁵.

-Terpenoides: Las plantas superiores producen una gran variedad de terpenoides, pero de ellos solo unos pocos parecen estar involucrados en fenómenos alelopáticos. Los monoterpenos son los principales componentes de los aceites esenciales de los vegetales y son los terpenoides inhibidores de crecimiento más abundantes que han sido identificados en las plantas

superiores. Son conocidos por su potencial alelopático contra malezas y plantas de cultivo. Entre las más frecuentes con actividad alelopática se pueden citar el alcanfor, α y β pineno, 1,8-cineol, y dipenteno. Un sesquiterpeno destacado es el ácido abscísico una importante hormona vegetal y también agente alelopático⁵.

-Glicósidos ciangénicos: Entre ellos se encuentran la durrina y amigdalina de reconocida actividad alelopática. La hidrólisis de estos compuestos da lugar no solo a cianhídrico sino también a hidroxibenzaldehído que al oxidarse origina el ácido p-hidroxibenzoico, el cual posee por sí mismo actividad alelopática⁵.

-Compuestos aromáticos: Estos comprenden la más extensa cantidad de agentes alelopáticos. Incluye fenoles, derivados del ácido benzoico, derivados del ácido cinámico, quinonas, cumarinas, flavonoides y taninos⁵.

-Fenoles simples: Entre ellos las hidroxiquinonas y la arbutina, se aislaron de *archtostaphylos* e inhiben el crecimiento de varias plantas⁵.

-Ácido benzoico y derivados: Derivados del ácido benzoico tales como los ácidos hidroxibenzoico y vainílico, están comúnmente involucrados en fenómenos alelopáticos⁵.

-Ácido cinámico y derivados: la mayoría de estos compuestos son derivados de la ruta metabólica del ácido shikímico y están ampliamente distribuidos en las plantas. Se identificó la presencia de los mismos en pepino, girasol y guayule. Otros como el clorogénico, cafeico, p-cumárico y ferúlico, están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y son inhibitorios de una variedad de cultivos y malezas, son de larga persistencia en el suelo y han sido identificados como inhibidores de la germinación⁵.

-Quinonas y derivados: varias de las quinonas y sus derivados provienen de la ruta metabólica del ácido shikímico. El ejemplo relacionado de estos compuestos es la juglona y naftoquinonas relacionadas que se aislaron del nogal⁵.

-Cumarinas: están presentes en muchas plantas. La metilesculina fue identificada en buta, avena e imperata. Compuestos tales como escopolina, escopoletina y furanocumarinas tienen capacidad inhibitoria del crecimiento vegetal⁵.

-Flavonoides: una amplia variedad de flavonoides tales como floridzina y sus productos de degradación como son glicósidos de quempferol, quercetina y myrcetina son agentes alelopáticos bien conocidos⁵.

-Taninos: los taninos, tanto los hidrolizables como los condensados, tienen efectos inhibitorios debido a su capacidad para unirse a proteínas. Por ejemplo los ácidos gálico, elágico, trigálico, tetragálico y quebúlico están ampliamente distribuidos en el reino vegetal⁵.

La mayoría están presentes en suelos de bosques en concentraciones suficientes para inhibir nitrificación. Los taninos condensados, los cuales se originan de la polimerización oxidativa de las catequinas, inhiben las bacterias nitrificantes en suelos forestales y reducen el ritmo de descomposición de la materia orgánica el cual es importante para los ciclos de circulación de minerales en el suelo⁵.

-Alcaloides: pocos alcaloides se conocen con actividad alelopática. Algunos como la cocaína, cafeína, cinconina, quinina, estricnina son reconocidos inhibidores de la germinación⁵.

Biosíntesis de los Agentes alelopáticos.

La mayoría de los agentes alelopáticos, como se mencionó son metabolitos secundarios derivados de las rutas del acetato-mevalonato o del ácido shikímico. Proviene de la ruta metabólica del acetato-mevalonato: terpenos, esteroides, ácidos orgánicos, solubles en agua, alcoholes de cadena lineal, aldehídos alifáticos, cetonas, ácidos grasos insaturados simples, ácidos grasos de cadena larga, poliacetilenos, naftoquinonas, antroquinonas, quinonas complejas y floroglucinol. Proviene de la vía metabólica del ácido shikímico: fenoles simples, el ácido benzoico y sus derivados, el ácido cinámico y sus derivados, cumarinas, sulfuros, glicósidos, alcaloides, cianhídrinas, algunos de los derivados de quinonas y taninos hidrolizables y condensados. Existen también compuestos (flavonoides) en cuya síntesis participan metabolitos de las dos rutas. Como es previsible, las concentraciones de estos compuestos en los tejidos varía según el ritmo de biosíntesis, almacenamiento y degradación. También son afectados por los balances internos de reguladores de crecimiento vegetal y otros factores bióticos y abióticos. Es importante también anotar que no siempre los detalles de la biosíntesis de estos compuestos son conocidos. (Figura 1)⁵.

Modo de liberación de los agentes alelopáticos.

Las sustancias químicas implicadas en fenómenos alelopáticos, pueden ser liberadas por las plantas al medio ambiente a través de: exudaciones radiculares, lixiviación por el agua desde las partes aéreas, descomposición en el suelo de los residuos vegetales o eliminación como compuestos volátiles⁷.

Todos estos mecanismos han demostrado ser importantes en el fenómeno de la alelopatía, produciéndose efectos sobre la germinación y crecimiento de las plantas, que viven en el mismo hábitat o en hábitat cercanos⁷.

De todas maneras, se puede afirmar que el modo de liberación de un agente

alelopático depende de su naturaleza química. A continuación analizaremos cada una de las principales vías de liberación al entorno de los aleloquímicos. (Figura 2)⁵.

Exudados Radiculares.

Por exudados radiculares se entienden todos aquellos compuestos orgánicos, liberados al medio por raíces de plantas sanas e intactas⁸.

La reducción en rendimiento observado en algunos cultivos en varios casos se ha atribuido a toxinas liberadas por otros y malezas adyacentes.

Se conocen sustancias exudadas por las raíces que reducen la germinación de las semillas, el crecimiento de raíces y brotes, la incorporación de nutrientes, y la nodulación⁵.

Entre las especies cultivadas que presentan estas características, se pueden citar: centeno, avena, cebada, maíz, tomate y pepino entre otros, incluyendo también varias especies no cultivadas y malezas⁹.

Rovira, (1.969) establece que son varios los factores que pueden afectar las exudaciones radiculares producidas por una especie determinada. Dentro de ellos los más importantes serían: edad de la planta, temperatura, luz, nutrición, medio de cultivo y enfermedades radiculares.

Lixiviación desde las porciones aéreas.

La lixiviación es la remoción de sustancias presentes en la planta por efecto de la lluvia, nieve, niebla o rocío. El grado de lixiviación depende del tipo de tejido vegetal, la edad de la planta y la cantidad y naturaleza de la precipitación⁵.

Un grupo extenso de sustancias, tales como: carbohidratos, aminoácidos orgánicos, fenoles y otros compuestos pueden ser arrastrados por acción del

agua, desde porciones aéreas de ciertas especies, incluyendo el género *Helianthus*. Algunas de estas sustancias han demostrado ser fitotóxicas al inhibir la germinación de semillas de otras especies y el crecimiento de las plántulas⁹.

Descomposición de residuos vegetales.

Grandes cantidades de sustancias con características inhibitorias son liberadas al medio como resultado de la descomposición microbiológica que sufren los residuos vegetales en el suelo, que pueden originar productos con actividad biológica mayor que sus precursores⁹.

Los factores que influyen este proceso incluyen la naturaleza del residuo, el tipo de suelo y las condiciones de descomposición. Eventualmente las sustancias alelopáticas liberadas por los residuos vegetales en el suelo entran en contacto con las raíces de plantas presentes en el mismo, ejerciendo su acción⁵.

Una gran parte de los estudios concernientes al fenómeno alelopático, están relacionados con la descomposición de residuos de cultivos, debido a la gran masa vegetal que queda sobre el terreno después de recolectarse sus frutos o semillas. Así fue determinada la toxicidad de extractos procedentes de la descomposición de la hoja del trigo, maíz, sorgo, de la avena, del centeno y del arroz⁹.

Volatilización desde las partes aéreas.

La liberación de agentes alelopáticos por volatilización esta frecuentemente confinada a plantas que producen terpenoides. Los géneros que comúnmente liberan compuestos volátiles incluyen artemisia, salvia, parthenium, eucalyptus y brassica. Estas sustancias han demostrado también actividad insecticida y como disuasivos alimenticios.

La toxicidad de los compuestos volátiles es prolongada, debido a su absorción a las partículas del suelo, lo cual le permite permanecer varios meses en él. En los ecosistemas de desierto y mediterráneos, la liberación de compuestos alelopáticos a través de volatilización es frecuentemente observada, debido al predominio de altas temperaturas, e influencia la distribución de las especies vegetales⁵.

Mecanismos de acción de los agentes alelopáticos.

Debido a la diversidad de naturalezas químicas de los diferentes agentes alelopáticos, no existe un mecanismo de acción único que explique la manera en que estos afectan a la planta receptora⁵.

Tanto en el campo como en el laboratorio los síntomas más visibles de la acción de las moléculas sobre un vegetal, son los efectos globales sobre tales como el decaimiento o el déficit de crecimiento, medidos a partir de las variaciones de masa y de elongación. En el plano fisiológico, se han puesto de manifiesto alteraciones hormonales, efectos sobre la actividad enzimática, efectos sobre la fotosíntesis, efectos sobre respiración y déficit en procesos asociados a membranas¹⁰.

Alteraciones hormonales provocadas por agentes alelopáticos.

Se han observado que aleloquímicos fenólicos pueden inhibir o aumentar la concentración de la hormona de crecimiento Ácido Indol Acético (AIA), una fitohormona del grupo de las auxinas, así por ejemplo los monofenoles (p-hidroxibenzoico y vainílico entre otros) reducen la disponibilidad de esta hormona puesto que promueven su descarboxilación, mientras que difenoles y polifenoles (clorogénico y cafeico), inducen el crecimiento ya que inhiben la descarboxilación de esta hormona¹¹.

Estos resultados surgieron que existiría un control en los niveles de

AIA a través del balance entre mono y polifenoles⁵.

Ciertos glicósidos de flavonoides como la naringenina, y la floridzina estimulan fuertemente enzimas del tipo AIA oxidasa, involucradas en la degradación de auxinas. Los ácidos hidroxámicos 6,7-dimetoxi-2-benzoxazolinona (DIMBOA) y 6-metoxi-2-benzoxazolinona (MBOA) modifican la afinidad de unión de las auxinas a sitios receptores de unión de las mismas a membrana⁵.

Varios compuestos fenólicos inhiben la acción de otras fitohormonas, las giberelinas ya sea por unión a la molécula hormonal o por bloqueo del proceso mediado por las mismas. En definitiva, parece que muchos compuestos fenólicos son capaces de provocar alteraciones en el balance hormonal de la planta receptora, lo cual en ciertos casos conduce a una inhibición del crecimiento⁵.

Efectos sobre la actividad enzimática.

Existen muchos compuestos alelopáticos con capacidad de modificar ya sea la síntesis o la actividad de enzimas tanto in vivo como in Vitro. La mayoría de estas sustancias han demostrado un efecto dual sobre la regulación de la actividad enzimática provocando un incremento en esta última cuando se encuentran en bajas concentraciones. En la situación opuesta se observa una reducción de actividad. Por ejemplo, plántulas de maíz tratadas con ácido ferúlico mostraron un incremento en los niveles de enzimas oxidativas (peroxidasas, catalasa y ácido indol acético oxidasa); junto con una elevación de enzimas de la ruta del ácido shikímico tales como fenilalanina amonioliasa y la cinamil alcohol deshidrogenasa involucrada en la síntesis de compuestos fenilpropanoides. También al ácido ferúlico se le atribuye la inhibición de enzimas hidrolíticas tales como amilasa, maltasa, invertasa, proteasa, y fosfatasa ácida involucradas en la movilización de material de alimento⁵.

Efectos sobre la fotosíntesis.

Bioensayos con *abutilon theophrasti* y *lemna minor* demostraron que varios ácidos derivados del benzoico y el cinámico (por ejemplo el ácido ferúlico), escopoletina y clorogénico en bajas concentraciones eran capaces de inhibir la fotosíntesis de plantas enteras. Experimentos con suspensiones de células foliares de *abutilon theophrasti*, mostraron que el ácido ferúlico, p-cumárico, clorogénico y vainílico son capaces de inhibir la fotosíntesis con concentraciones de los aleloquímicos menores a las requeridas para planta entera. Los efectos inhibitorios de los agentes alelopáticos dan como resultado una modificación en los niveles de clorofila, cierre de los estomas o una reducción en la provisión de CO₂ vital para la producción de fotosintatos. En soja los ácidos ferúlico, vainílico y p-cumárico reducen el contenido de clorofila. En sorgo, las mismas sustancias no provocan esa disminución. Los ácidos ferúlicos, p-cumárico y otros cinámicos a concentraciones altas, provocan el cierre de los estomas e inhiben el proceso fotosintético. Ciertos flavonoides parecen interferir en la organización funcional o estructural del cloroplasto. El quempferol, por ejemplo, aparentemente actúa como un inhibidor de transferencia de energía, impidiendo la síntesis de ATP⁵.

Efectos sobre respiración.

Para estudiar el efecto de los aleloquímicos sobre la respiración, normalmente se ensayan los mismos sobre suspensiones mitocondriales. Entre los compuestos fenólicos el orden de mayor a menor actividad es quinonas > flavonoides > cumarinas > ácidos fenólicos. Las quinonas sorgoleone y juglona son efectivos inhibidores a muy baja concentración. Nuevamente el sorgoleone afecta el transporte de electrones, mientras que la juglona afecta la incorporación mitocondrial de oxígeno. Flavonoides tales como la quercetina, naringenina y umbeliferona inhiben la producción de ATP en la mitocondria⁵.

Efectos sobre procesos asociados a membrana.

Los derivados de los ácidos benzoico y cinámico tienen profundos efectos sobre las membranas. Son capaces de provocar cambios en la polaridad lo cual provocaría alteraciones en la estructura y permeabilidad de las mismas. Los ácidos fenólicos tienen un efecto directo sobre la incorporación de iones. Todos los ácidos benzoicos y cinámicos implicados en alelopatía inhiben el ritmo de incorporación de fósforo y potasio en raíces cortadas. También algunos flavonoides inhiben la absorción mineral. La inhibición de las ATPasas de membranas y la alteración en la permeabilidad de las mismas pueden contribuir a la reducción en la incorporación mineral. Los ácidos fenólicos y las cumarinas alelopáticas también provocan alteraciones en el contenido de agua en la planta⁵.

Según Einhellig, si bien muchos compuestos fenólicos actuarían a nivel celular simultáneamente en varios blancos alterándola fisiológicamente, parece que algunos efectos son más importantes que otros y es central la acción que estas sustancias tienen sobre membrana plasmática para provocar la interrupción de la mayoría de los restantes procesos en que están involucrados.

Importancia del conocimiento de los procesos alelopáticos.

Para la agricultura moderna resulta de gran importancia investigar y encontrar nuevas estrategias que nos permitan el desarrollo de una agricultura sustentable, es decir, una agricultura no contaminante y basada en recursos naturales renovables⁹.

Por otra parte el uso de agroquímicos ha permitido aumentar notablemente los rendimientos y rentabilidad de los cultivos, pero el uso constante de estos puede alterar el medio biológico existente en el suelo, además de

encarecer una producción. Es por eso que diversos científicos buscando alternativas que den con ventajas económicas y medioambientales han encontrado un tipo de solución: *la alelopatía*, que es un fenómeno de gran importancia en la ecología y supervivencia de las plantas⁹.

Las investigaciones en alelopatía en algunos casos permiten plantear estrategias orientadas a una mayor sustentabilidad de los sistemas de producción agrícola, con un menor consumo en insumos contaminantes. Para lograr un mejor aprovechamiento de los agentes alelopáticos es necesario ampliar el conocimiento de los mismos en relación a la rotación de cultivos, manejo de residuos, prácticas de labranzas y la implementación de control biológico de malezas⁵.

1.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

La familia de las compuestas (compositae, Asteraceae) es una de las familias más numerosas de angiospermas; la mayoría de sus miembros son arbustos, matas de hojas persistentes o plantas herbáceas rizomatosas perennes o anuales. Pertenecen a esta familia las lechugas, las alcachofas, los girasoles, las margaritas, los crisantemos, las dalias y muchas otras plantas de ornato y medicinales, muchas malezas como el diente de león, la lechugilla y los cardos¹².

La familia compositae comparte características morfológicas generales con otros grupos de plantas, sin embargo debe su nombre a la particularidad de su inflorescencia. Esta es denominada cabezuela o capitulo y aparente ser una gran flor, pero es el conjunto de pocas o muchas flores que se agrupan en una base o receptáculo envuelto y protegido por una serie de brácteas que en su conjunto se denominan involucre. Las flores, que son pequeñas, pueden ser liguladas (en forma de lengua) o tubulares, así mismo pueden ser unisexuales o hermafroditas y sus envolturas florales se encuentran

modificadas. Los frutos son secos con una semilla y se conocen como aquenios¹².

Las compuestas tienen un incalculable interés económico indirecto para el hombre. La impresionante cantidad de especies de esta familia contribuye a la diversidad, y por consiguiente, a la estabilidad y el mantenimiento de la productividad de todo el mundo. En relación con el enorme tamaño de la familia, el número de especies de importancia económica directa es pequeña. Pertenecen a ella algunas plantas alimenticias, medicinales, ornamentales, suculentas, venenosas y malas hierbas¹².

La planta utilizada en esta investigación presenta la siguiente clasificación taxonómica.

Reino : Vegetal
Clase : Dicotiledónea
Subclase : Asteridae
Orden : Synanderales
Familia : Compuesta – Asteraceae
Género : *Helianthus*
Especie : *Helianthus annuus*

El girasol pertenece al género *Helianthus*, familia de las Compuestas. Es un género complejo, comprende 49 especies y 19 subespecies, siendo 12 especies anuales y 37 perennes. El girasol cultivado es una planta anual, normalmente de un solo tallo y con una inflorescencia en el ápice¹³.

La altura de la planta varía desde 1.60 a 2 mts, aunque también puede alcanzar los 3 mts, con cabezas o capítulos de hasta 30 cm de diámetro¹⁴. La raíz principal crece más rápido que la parte aérea. Generalmente, la longitud de la raíz principal sobrepasa la altura del tallo¹⁴.

El tallo es bastante vigoroso, áspero y veloso. En la madurez, este tallo se inclina en su parte terminal, esto suele ser beneficioso por el perjuicio ocasionado por pájaros y el golpe de sol disminuyendo los efectos negativos. Tiene hojas muy grandes y con largos pecíolos, los 2 o 3 pares de la base son opuestas y a partir de 3° y 4° par son alternas. El color de las hojas varía del verde oscuro al amarillo y su número oscila entre las 12 y 40 hojas en función de las condiciones del cultivo y la variedad. La inflorescencia forma un capítulo constituido por numerosas florecillas situadas en el receptáculo discoidal, este capítulo tiene un diámetro que varía entre los 10 y 40 cms¹⁴.

El polen es relativamente grande, unas 40 micras aproximadamente. Con forma esférica y poco aplastada. El fruto es un aquenio que está comprimido y al que incorrectamente se le denomina semilla. La semilla de girasol contiene en su totalidad 42% de aceite en comparación con otras oleoginosas¹⁴.

La planta de girasol presenta un heliotropismo evidente. Por la mañana, la yema terminal y las hojas del girasol se vuelven hacia el este; de ahí el nombre científico (*Helianthus* = Helio, que significa sol, y anthus, que significa flor, inflorescencia)¹⁵.

1.3. FITOQUIMICA

Las primeras fitotoxinas aisladas de *Helianthus annuus* han sido los ácidos clorogénico e isoclorogénico de extractos acuoso de la planta completa y las cumarinas escopoletina y ayopina de lixiviados de las hojas¹⁶.

Actualmente se sabe que estas sustancias no son las responsables de la actividad de *Helianthus annuus*, no solo porque los lixiviados de las hojas y los exudados de raíz muestran actividad a pesar de no contener

ácido clorogénico o isoclorogénico, sino porque la actividad de estos ácidos no corresponde con la mostrada por los extractos de la planta¹.

De las hojas y tallos de *Helianthus annuus L.* y de *Helianthus tuberosus L.* leather y col¹⁷. Han sido aislados compuestos fenólicos y ácidos grasos y probado su actividad sobre *Lemma minor*, desarrollando un estudio sistemático en el que las propiedades alelopáticas de los girasoles silvestres se correlacionan con las variedades cultivadas. Las sustancias aisladas fueron los ácidos gálico, protacatéquico, p-hidroxibenzoico, benzoico, vainílico, siringico y salicílico, así como ácidos grasos de cadena larga (C₁₀ a C₁₈). Los ácidos fenólicos producidos por el girasol inducen al cierre de los estomas de las hojas del sorgo produciéndose una disminución del potencial de agua en la hoja, efecto que contribuye a reducir el crecimiento de las plántulas¹.

Otro grupo de compuestos bioactivos aislados de diferentes variedades de girasol lo constituyen las lactonas sesquiterpénicas, aisladas principalmente de plantas pertenecientes a la familia de las Compuestas¹⁸ (familia a la que pertenece el girasol).

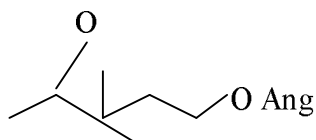
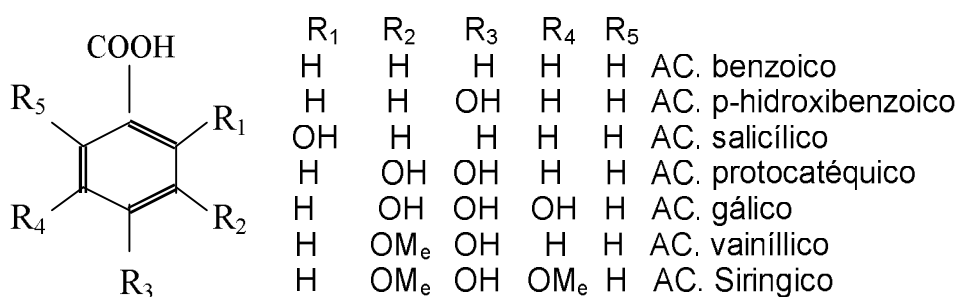
En el caso del girasol, las lactonas sesquiterpénicas sirven como defensa contra ataques de insectos y herbívoros debido a su sabor amargo, unido a su reactividad química. Así, la germacronolida argophyllina A, aislada de *Helianthus annuus L.*, actúa como agente disuasor y como neurotóxico frente al escarabajo, produciéndole excitabilidad¹⁹. Otras lactonas aisladas de plantas del género *Helianthus*, cuya capacidad para afectar el crecimiento de otras especies vegetales ha sido probado a nivel de laboratorio, son las niveusinas B y C, que actúan sobre la hormona de crecimiento Ácido Indol- Acético (AIA)²⁰ y las annuolidas C, D y E, aisladas de extractos acuosos de hojas de variedades comerciales de girasol²¹. De estos mismos extractos se ha aislado un nuevo tipo de esqueleto de sesquiterpeno, el Heliannol A²²,

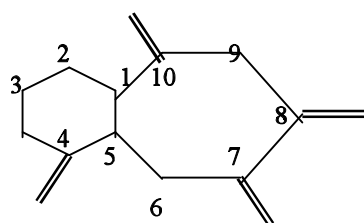
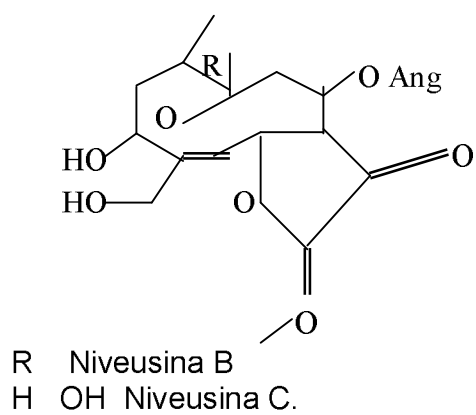
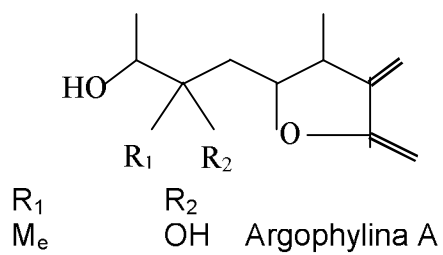
capaz de inhibir la germinación de la lechuga (*Lactuca sativa*) en un rango de concentraciones de 10^{-4} a 10^{-9} M.

Así mismo un nuevo sesquiterpeno 12 muestra un perfil inhibitorio homogéneo de actividad con un promedio del 40% de inhibición en la germinación de lechuga de 10^{-4} – 10^{-9} M y un efecto pequeño en la germinación y crecimiento de semillas de cebada. Estos hallazgos sugieren que los guaianolidas llamados annuolidas 7 – 11 y el Heliannuol 12 son propensos a estar involucrados en la acción alelopática de girasoles de cultivo con cierta especificidad sobre algunas especies dicotiledóneas²³.

Los efectos inhibitorios mostrados sobre la germinación de algunas especies dicotiledóneas lo mismo que los efectos estimulatorios mostrados sobre la germinación de algunas especies monocotiledóneas sugieren que estos guaianolidas y el heliannuol son excelentes candidatos para ser usados como un herbicida pre-emergente de cosechas monocotiledóneas en dosis muy bajas (10^{-4} – 10^{-9} M) donde incluso alguna estimulación sobre la germinación de las monocotiledóneas puede esperarse²³.

Estructuras Químicas.



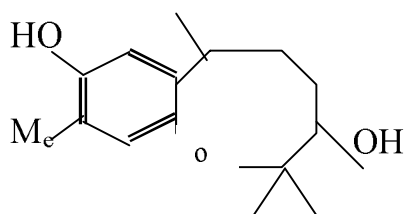


Sustituyentes

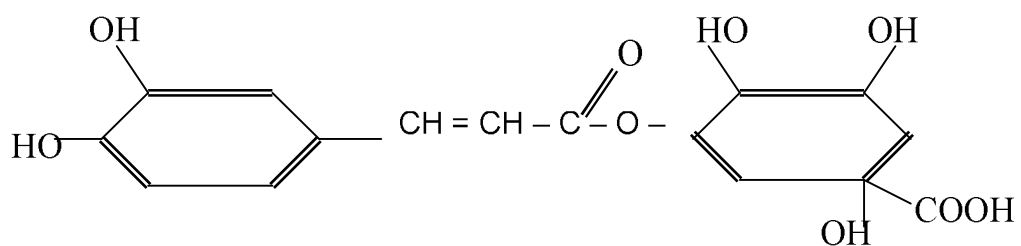
8α -hidroxi Annuolida C

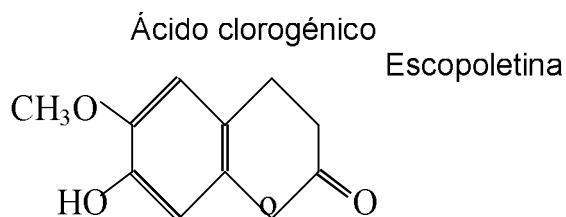
8α -hidroxi-11 β , 13-dihidro Annuolida D

8α -hidroxi – 11 α , 13 dihidro Annuolida E



Heliannuol A.





1.4. BIOENSAYOS

El procedimiento integral de caracterización de la actividad herbicida de un producto alelopático se conoce como *bioensayo*, el cual consiste en el uso de material biológico como indicador de la acción de fitotoxinas, cuantificándose los cambios que se puedan producir respecto a un control²⁴.

1.4.1. Efecto del extracto acuoso de girasol sobre la germinación y crecimiento en las especies de malezas en estudio.

Los ensayos de germinación y de crecimiento de plántulas son ampliamente utilizados debido a que son sencillos y permiten una evaluación rápida de la respuesta de una especie vegetal a un agente alelopático determinado⁵.

Generalmente se prefieren medidas globales (germinación y crecimiento) a medidas de parámetros fisiológicos, ya que los primeros ofrecen información indirecta de la acción sobre los segundos, cubriéndose un rango más amplio de efectos. Además, la medida de parámetros globales ofrece la ventaja de que los efectos son más evidentes, y se necesitan aparatos simples.

2. METODOLOGÍA.

2.1. Recolección y muestra.

La muestra fue recolectada en el municipio de corozal en julio del 2.002.

Las muestras botánicas fueron preparadas para ser llevadas al Herbario Nacional de Colombia y allí ser identificadas. El proceso de identificación y clasificación estuvo a cargo del profesor Edgar Linares, quien identificó los siguientes especímenes:

* *Helianthus annuus (L)*, perteneciente a la familia Asteraceae con número de radicación col 489039.

* *Bothriochloa pertusa (L)*, perteneciente a la familia Poaceae con número de radicación col 484335.

* *Digitaria bicomis (Lam)*, perteneciente a la familia Poaceae con número de radicación col 476378.

* *Leptochloa mucronata* perteneciente a la familia Poaceae con número de radicación col 484367.

Para la recolección del material vegetal (hojas) se realizó un cultivo de girasol (semillero) en una pequeña parcela, cuyo suelo fue previamente analizado para determinar el contenido de minerales (calcio, hierro y potasio).

2.2. Análisis de suelo.

2.2.1. Determinación de los niveles de Potasio, Calcio y Hierro en las muestras de suelo. Se tomaron muestras de suelo al azar para el análisis fisicoquímico.

10 gr de muestras de suelo seco, se somete a ebullición con 25 mL de

solución HCl (10%) durante 1 hora, obteniéndose 25 mL de solución HCl (ácido clorhídrico), se deja enfriar y se filtra.

25 mL de muestra se diluyen hasta 100 mL con agua destilada²⁶.

Esta parte se realizó con un equipo para adsorción atómica del Departamento de química de la Pontificie Universidad Javeriana, utilizando un espectrofotómetro de adsorción y Emisión atómica en llama Marca Shimadzu AA – 640 – 13. (Figura 7)

Medida	Altura del quemador (mm)	Longitud de onda (nm)	Rendija
Calcio	5	4227	3,8
Hierro	6	2483	3,8
Potasio	7	766,5	1,9

Para realizar estas mediciones se utilizaron soluciones patrones de hierro, calcio y potasio de 1 ppm, 4 ppm y 0,5 ppm respectivamente.

2.3. Métodos aplicados en el estudio químico.

2.3.1. Tamizaje fitoquímico preliminar para el reconocimiento de metabolitos secundarios. Se utilizó con el fin de evaluar los metabolitos responsables de la actividad herbicida en las hojas de *Helianthus annuus*, aplicando la técnica del profesor Alejandro Martínez (Universidad de Antioquia)²⁷.

2.3.2. Obtención de los extractos.

933,13 g de hojas de girasol de plantas jóvenes (en periodo de floración) fueron desmenuzadas y sometidas a extracción por percolación en un equipo (extractor de varios usos).

El extracto obtenido (5 L) fue liofilizado (Universidad de Cartagena)

obteniéndose 4,632 g (utilizado para preparar las diferentes concentraciones para el ensayo biológico de las tres malezas).

Se toman después 685,18 g de material de hojas frescas previamente desmenuzadas y se somete a licuada con agua destilada (750 mL), obteniéndose un extracto de 500 ppm y se utilizó para el ensayo biológico de las malezas.

Se toman 150 g de hojas de *Helianthus annuus* desmenuzada y se someten a reflujo con agua destilada por media hora. El extracto frío es filtrado obteniéndose un volumen de 500 mL. Este extracto fue utilizado una parte (300 mL) para el ensayo biológico y 200 mL para la extracción L/L con cloroformo.

La fracción clorofórmica fue secada con sulfato de sodio anhídrido y concentrada a presión reducida. Posteriormente fue monitoreada en CCD utilizando como fase estacionaria de sílica – gel y fase móvil Éter petróleo – acetato de Etilo 7:3 y revelada con vainillina.

Posteriormente esta fracción fue sometida a CCD bidimensional utilizando como fase estacionaria sílica- gel 60 G y como fase móvil primero a Éter de petróleo- Acetona (9:1) y como fase móvil dos diclorometano, con patrones auténticos de terpenos como Friedelano y Acetato de β -Amirina.

2.4. Métodos aplicados en el estudio biológico.

Se evaluó el efecto del extracto acuoso de girasol (*Helianthus annuus*) sobre las malezas en estudio, en condiciones controladas. Para su realización se tomaron muestras de suelo en bolsas, se sembraron aproximadamente 20 semillas de las malezas aplicando 20 mL de extractos acuosos preparados de hojas de girasol a diferentes concentraciones (0.5, 1, 10, 20, 50, 75 y 100 ppm)(Figura 3, 4) durante 8 días consecutivos. La evaluación realizada fue crecimiento (desarrollo vegetativo)²⁵.

Todos los testigos fueron tratados con agua. El experimento fue randomizado

completamente al azar²⁵.

Para evaluar el porcentaje de germinación, se sembraron 20 semillas de la maleza *Bothriochloa pertusa* L. y se le aplicó 20 mL de la concentración o dilución mas activa y los testigos fueron tratados con agua.

Se evaluó el efecto inhibitorio de la concentración activa sobre un cultivo de zea maíz, dado que muchos aleloquimicos afectan tanto a cultivos como malas hierbas⁵.

Para obtener datos fiables de estos parámetros se utilizó un diseño experimental muy cuidadoso, en base a dos requisitos fundamentales. Primero, el número de muestras debe ser lo suficientemente alto como para que la muestra sea representativa de una población. Segundo, se debe contar con varias réplicas, es decir, con varias plantas de una misma especie agrupadas en macetas²⁴ (en este caso se estableció replicas de tres).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se discutirán los resultados obtenidos tanto en el estudio químico de los extractos de *Helianthus annuus* como en la evaluación biológica.

3.1. Estudio Químico.

3.1.1. Análisis de suelo. Se determinaron los niveles de hierro, potasio y calcio mediante adsorción atómica, los resultados obtenidos fueron:

Hierro (Fe)

	Concentración	Adsorbancia
Patrón	1 ppm	0.086
Muestra 1	-----	0.600
Muestra 2	-----	0.406

$$\begin{aligned}\text{Concentración diluida (Fe)} &= 0.600 / 0.086 * \text{Concentración patrón} \\ &= 1 \text{ mg / L} * 0.6 / 0.086 \\ &= 6.9 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Concentración en 100 mL} &= 100 * 6.9 \text{ mg / L} \\ &= 690 \text{ mg / L}\end{aligned}$$

$$\text{Peso (Fe)} = 690 \text{ mg / L} * 0.1 \text{ L} = 69 \text{ mg Fe}$$

$$\% \text{ Fe} = 69 \text{ mg} / 10.000 \text{ mg} * 100 = 0.69 \%$$

$$\begin{aligned}\text{Concentración de muestra 2 (Fe)} &= 0.406 / 0.086 * 1 \text{ ppm} \\ &= 4.72 \text{ mg / L}\end{aligned}$$

Concentración en 100 mL = $100 * 4.72 \text{ mg / L}$
= 472 mg / L

Peso (Fe) = $472 \text{ mg / L} * 0.1 \text{ L} = 47.2 \text{ mg Fe}$
% Fe = $47.2 \text{ mg} / 10.000 \text{ mg} * 100 = 0.472 \%$

Porcentaje Promedio (Fe) = 0.581

Calcio (Ca)

	Concentración	Adsorbancia
Patrón	4 ppm	0.446
Muestra 1	-----	0.262
Muestra 2	-----	0.170

Concentración de muestra 1 = 2.34 mg / L
Concentración en 100 mL = 234 mg / L
Peso (Ca) = 23.4 mg
% Ca = 0.234

Concentración de muestra 2 = 1.52 mg / L
Concentración en 100 mL = 152 mg / L
Peso (Ca) = 15.2 mg
% Ca = 0.152
Porcentaje promedio (Ca) = 0.193

Potasio (K)

	Concentración	Adsorbancia
Patrón	0.5 ppm	0.400
Muestra 1	-----	0.534
Muestra 2	-----	0.397

Concentración de muestra 1 = 0.6675 mg / L

Concentración en 100 mL = 66.75 mg / L

Peso (K) = 6.675 mg

% K = 0.06675

Concentración de muestra 2 = 0.49625 mg / L

Concentración en 100 mL = 49.625 mg / L

Peso (K) = 4.9625 mg

% K = 0.049625

Porcentaje promedio (K) = 0.0581875

Las muestras de suelo presentaron bajos niveles de hierro, potasio y calcio, por lo cual se le puede considerar un suelo “pobre” ²⁷. Así mismo, el girasol para crecer precisa de ciertos elementos, algunos de los cuales los requiere en mayores cantidades (macronutrientes), mientras que otros (micronutrientes) pueden ser suficientes en menores proporciones. Entre los primeros destacan nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S). Entre los segundos los más importantes son hierro (Fe), manganeso (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn), boro (B), cloro (Cl) y molibdeno (Mo)¹⁵.

3.1.2. Identificación de metabolitos secundarios en los extractos de *Helianthus annuus*.

3.1.2.1. Reconocimiento de los metabolitos secundarios mediante tamizaje fitoquímico preliminar.

Según los resultados anteriores, los extractos de girasol presentan metabolitos secundarios como terpenos, flavonoides, lactonas, Triterpenoides, antocianinas y saponinas¹⁸.

La cromatografía anterior puede señalar la relación de la muestra con los dos patrones utilizados, por lo tanto se puede decir que los extractos de *Helianthus annuus* contienen terpenos como el acetato de β -amirina y friedelano, los cuales son compuestos pentacíclicos y conocidos como los triterpenos mas importantes y ampliamente distribuidos²⁸.

3.2. Estudio Biológico.

Con los datos registrados en los tres ensayos para cada una de las malezas, se realizó un análisis de varianza a un solo factor (ANOVA), para establecer si existían diferencias entre los tratamientos, comparando: las diferentes concentraciones del extracto de *Helianthus annuus* con el crecimiento promedio (cm) de las malezas en estudio. Además los ensayos que presentaron diferencias entre las medias de sus tratamientos fueron comparados mediante la prueba de Duncan.

3.2.1. Evaluación de la actividad herbicida sobre la Maleza *Bothriochloa pertusa* L. Al evaluar la actividad del extracto liofilizado sobre esta maleza, por el método de diluciones, los resultados son los siguientes.

Primer Ensayo.

Los siguientes datos muestran el crecimiento promedio de *Bothriochloa pertusa* L. durante el experimento, frente a las diferentes concentraciones del extracto de *Helianthus annuus*.

H^0 : $U_1 = U_2 = U_3 = \dots = U_8$: Las diferentes concentraciones del extracto de girasol producen igual crecimiento en *Bothriochloa pertusa* L.

H^a : Por lo menos uno diferente: Las diferentes concentraciones del extracto de girasol no producen igual crecimiento en *Bothriochloa pertusa* L.

$$SC_{\text{trat}} = 8.400$$

$$SC_{\text{error}} = 5.929$$

$$GL_{\text{trat}} = 7$$

$$GL_{\text{error}} = 16$$

$$CM_{\text{trat}} = 1.2$$

$$CM_{\text{error}} = 0.370$$

$$F_{\text{cal}} = 3.24$$

$$F_{\text{tab}} = 2.66, \text{ para } \alpha = 0.05$$

$$4.03, \text{ para } \alpha = 0.01$$

Análisis de Varianza. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el crecimiento promedio (cm) de *Bothriochloa pertusa* L

Como $F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$, se rechaza H^0 ; las diferentes concentraciones del extracto de girasol no producen en promedio igual crecimiento en *Bothriochloa pertusa* L. (Figura 10)

Segundo Ensayo.

Como $F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$, A H^0 ; las diferentes concentraciones del extracto de girasol producen en promedio igual crecimiento en *Bothriochloa pertusa* L. (Figura 11)

Tercer Ensayo.

Como $F_{cal} > F_{tab}$, $R > H^0$; las diferentes concentraciones del extracto de girasol no producen en promedio igual crecimiento en *Bothriochloa pertusa* L. (Figura 12).

El ANOVA para el primer ensayo señala que hubo diferencias significativas ($p=0.05$) con el crecimiento de la maleza respecto a las diferentes concentraciones del extracto.

Además, la prueba de comparación de medias o pruebas de Duncan, mostró que hubo diferencias significativas entre varias de las concentraciones. (diferencias entre 50 ppm y 10 ppm; 50 ppm y 0.5 ppm; 100 ppm y 10 ppm; 75 ppm y 10 ppm; 75 ppm y 0.5 ppm), es decir, las mayores concentraciones tuvieron diferencias con respecto a las menores. (Anexo 1).

En el segundo el ANOVA manifestó que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

En lo concerniente al tercer ensayo el análisis de varianza señaló que hubo diferencias altamente significativas ($p:0,01$) entre las diferentes concentraciones del extracto del girasol y prueba de Duncan arrojó los siguientes resultados:

Una y solo una de las diferentes concentraciones del extracto de girasol (100ppm) presentó diferencias en el crecimiento de *Bothriochloa pertusa* L. y el testigo.

Además esta concentración presentó diferencias en el crecimiento de la maleza con las demás concentraciones, excepto para la concentración 75 ppm.

No hay diferencias significativas de crecimiento de *Bothriochloa pertusa* L.

con las demás concentraciones (75ppm, 50 ppm, 20 ppm, 10 ppm, 1 ppm, 0.5 ppm) y el testigo. Por lo tanto la concentración del extracto acuoso que mejor inhibe el crecimiento de *Bothriochloa pertusa* L. fue 100 ppm. (Anexo 1).

3.1.2. Evaluación de la actividad herbicida sobre la Maleza *Digitaria bicomis* L. Al evaluar la actividad del extracto por el reflujo sobre la *Digitaria bicomis* L., por el método de diluciones, los resultados son analizados por ANOVA.

Primer Ensayo.

Como $F_{cal} < F_{tab}$, A H°; las diferentes concentraciones del extracto de girasol producen en promedio igual crecimiento en *Digitaria bicomis* L. (Figura 13).

Segundo Ensayo.

Como $F_{cal} < F_{tab}$, A H°; las diferentes concentraciones del extracto de girasol producen en promedio igual crecimiento en *Digitaria bicomis* L. (Figura 14).

Tercer Ensayo.

Como $F_{cal} < F_{tab}$, A H°; las diferentes concentraciones del extracto de girasol producen en promedio igual crecimiento en *Digitaria bicomis* L. (Figura 15).

El análisis de varianza (ANOVA) para la *Digitaria bicomis* L. en los tres ensayos realizados no presentó diferencias significativas entre las diferentes concentraciones del extracto de girasol (*Helianthus annuus*).

3.1.3. Evaluación de la actividad herbicida sobre la Maleza *Leptochloa mucronata*. Al evaluar la actividad del extracto (por reflujo) sobre la maleza *Leptochloa mucronata*, los resultados obtenidos fueron los siguientes.

Primer Ensayo.

Como $F_{cal} < F_{tab}$, A H°; por lo tanto no hay diferencia entre los tratamientos, es decir, las diferentes concentraciones del extracto producen en promedio, igual crecimiento en *Leptochloa mucronata*. (Figura 16).

Segundo Ensayo.

Como $F_{cal} > F_{tab}$, R H°; las diferentes concentraciones del extracto de girasol no producen en promedio igual crecimiento en *Leptochloa mucronata*. (Figura 17).

Tercer Ensayo.

Como $F_{cal} > F_{tab}$ R H°; las diferentes concentraciones del extracto de girasol no producen en promedio igual crecimiento en *Leptochloa mucronata*. (Figura 18).

En el análisis de varianza esta maleza (*Leptochloa mucronata*), en el primer ensayo no presentó diferencias significativas entre las diferentes concentraciones del extracto.

Para el segundo ensayo la ANOVA mostró que hubo diferencias altamente significativas ($p: 0,01$) entre las diferentes concentraciones y la prueba de Duncan presentó diferencias significativas entre varias de las concentraciones (0.5 y 100 ppm; 0.5 y 75 ppm; 0.5 y 50 ppm; 0.5 y 20 ppm; 1 y 100 ppm; 1 y 75 ppm; 1 y 50 ppm; 1 y 20 ppm; 10 y 100 ppm; 10 y 75

ppm; 10 y 50 ppm; 10 y 20 ppm). Con respecto al testigo (H₂O), tenemos que solo presentó diferencias con 100 ppm, 75 ppm, 50 ppm y 20 ppm evidenciando que estas fueron las mayores concentraciones. (Anexo 3).

En el tercer ensayo al igual que en el segundo la ANOVA mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos, mientras que la prueba de Duncan (comparación de medias) mostró diferencias entre los tratamientos 100 ppm, 75 ppm, 50 ppm, 20 ppm, 10 ppm, 1 ppm y el testigo (H₂O). Además evidenció que la concentración 100 ppm, es el mejor tratamiento, ya que presenta diferencia en relación con las demás.

3.1.4. Efectos de la germinación ante la concentración 100 ppm de extractos de girasol sobre la maleza *Bothriochloa pertusa* L.

Al analizar los promedios de germinación entre la concentración 100 ppm (extracto de girasol) y el testigo (H₂O), se observa la tendencia a la disminución en el % de germinación de *Bothriochloa pertusa* L. cuando es aplicada dicha concentración²⁵. (Figura 19).

3.1.5. Efecto de la concentración 100 ppm sobre plantas de maíz (*Zea Maíz*).

Al evaluar la actividad de la concentración 100 ppm sobre plantas de maíz con el fin de constatar su efecto en malezas mas no en plantas de cultivo, se utilizó la prueba t-student para muestras relacionadas.

$$H^{\circ} : \mu_d = 0$$

$$H^a : \mu_d \neq 0$$

$$S_d = 4,618$$

$$S_{d'} = 1,855$$

$$T = - 0,525 / 1,855 = - 0,2784$$

A H^o, No existe diferencia en el crecimiento promedio (cm) del maíz durante

los 8 días consecutivos del experimento, cuando es expuesto a dos tratamientos (extracto y agua).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación permiten concluir:

Por métodos preliminares (precipitación y coloración) en los extractos de *Helianthus annuus* se identificaron metabolitos secundarios de tipo terpenos, lactonas, flavonoides, antocianinas y saponinas.

Mediante cromatografía en capa delgada bidimensional se identificaron terpenos, tales como acetato β -amirina y friedelano utilizando patrones auténticos de estos.

Los bajos contenidos de minerales como hierro, potasio y calcio son óptimos para el crecimiento y desarrollo de la especie *Helianthus annuus*.

Los resultados obtenidos indican la susceptibilidad de la maleza *Bothriochloa pertusa* L. y maleza *Leptochloa mucronata* ante los extractos de *Helianthus annuus*, al ser inhibidor del crecimiento de estas especies.

En la especie *Bothriochloa pertusa* L. se demuestra dicha susceptibilidad al presentar un descenso en el porcentaje de germinación, lo que puede contribuir al uso de estrategias en el campo más ecológicas y menos costosas.

La concentración 100 ppm demuestra ser la mas activa tanto para la maleza *Bothriochloa pertusa* L. como para la maleza *Leptochloa mucronata*.

BIBLIOGRAFÍA

1. MACIAS, Francisco y GALINDO Juan Carlos. Química Orgánica Ecológica: Guerra química entre seres vivos. Aplicaciones de las interacciones alelopáticas. Cádiz, n° P B 91 – 0743, 81 – 88.
2. MULLER, W.H y MULLER, CH (1964) BULL. Torrey Bo Club. 91, 327 – 330.
3. BOWEN, Jhon et al. Alelopatía, in: Agricultura de las Americas, Año 34, N° 2, feb 1985, 24 – 26.
4. MOLISEH, H. Der Einfluss einer Pflanze auf die andere – Allelopathic. Fischer, Jena, 1969.
5. <http://fai.unne.edu.ar/biologia/alelopatia/alelopatia.htm>.
6. EINHELLIG, F.A, en Allelopathy: organisms, processes and applications. (Inderjit, Darkshini y Einhellig Ed), Vol 582, American Chemical Society, Washington, D.C, 1995, 1- 24.
7. TUKEY, H.B, Jr. 1969. Implications de Allelopathy in agricultural plant science. Bot. Rev. 35:1 – 16.
8. ROVIRA, A.D. 1989. Bot. Rev. 35:35-37.
9. <http://www.e-mas.co.cl/categorias/cnaturales/alelopatia.htm>.

10. MARTINEZ, Uriel. Escuela de ciencias quimicas, Universidad Autónoma Benito Suarez de Oaxaca, 1983.
<http://mail/web.udlap.mx/~aleph/alephzero6/alelopatia.html>.
11. PAZMIÑO, Adolfo, Alelopatia, Universidad de Chile, Escuela de agronomia, 1999.
12. <http://www.correodelmaestro.com/anteriores/2001/mayo/mundoplanpoptop.htm>.
13. <http://www.sitioduascachoeiras.com.br/reinos/vegetal/Girssbotan.htm>
14. <file:///A:/Generalidades.htm>.
15. SILVEIRA, José M y DURAN, José; El cultivo del girasol, Departamento de producción vegetal:Fitotecnia, Madrid. N° 102, feb 15, 2000.
16. CURTIS, J.T. y COTTAN, C: Bull. Torrey Bot. Club, 77, 1950, 187-191.
17. SAGGESSE, E.J; FOGLIA, T.A; LEATHER, G; THOMPSON, M,P; BILIS, D.D, Y HOAGLAND P.D; In: "The Chemistry of Allelopathy" (Thompson, A.D., ed), ACS.
18. FISCHER, N.H (1985): The science of Allelopathy (Putnam, A; Rang, C-S, Eds). Jhon Wiley y Sons, New York, C. 12.
19. MULLIN, C.A.; ALFATFTA, A.A; HARMAN, J.L; SERINO, A.A., y ECERETT, S.L.: In "Corn rootworm feeding of sunflower

and onther compositae: Influence of floral terpenoid and phenolic factors” , 1991, p. 278, 292.

20. SPRING O.; Abert, K, y GRADMANN, W. (1981): Phytochemistry, p. 20, 1883.

21. MACIAS, F.A.; VARELA, R.M., TORRES, A. y MOLINILLO, J.M.G. Phytochemistry, p. 34, 669-674.

22. MACIAS, F.A.; VARELA, R.M.; TORRES, A. y MOLINILLO G.M – G. The trehedron Lett, 1999, 2002.

23. MACIAS, Francisco A, Allelopathy in the Search for Natural Herbicide Models, in: Allelopathy organisms, processes, and applications, Puerto Real – Cádiz, Chapter 23, 1995, p. 312-326.

24. file:///D:/Antecedentesensayosbusquedaaherbicidas_archivos/met_am.htm.

25. PUENTE, Mayra; TORRES, Sinesio y GARCIA, Humberto, Efectos alelopáticos del girasol (*Helianthus annus*) sobre malezas y cultivos de interés económico, otra alternativa para el desarrollo de una agricultura sustentable, Dpto. Indusrial, Universidad Central de las Villas, Cuba.

26. PRIMO, E; YUFERA y CARRASCO, J.M.; Química Agrícola I. Suelos y Fertilizantes. Editorial Alambra, Madrid, Pág. 341-358.

27. MARTÍNEZ, Alejandro; Farmacognosia y Fotoquímica Experimental, Medellín, 1999, p. 96-101.

28. VALENCIA, Ciria, Fundamentos de Fitoquímica. Pág. 196.

RECOMENDACIONES

- Comprobar el potencial alelopático de *Helianthus annuus* sobre otras plantas de cultivo (algodón, yuca, etc) y malas hierbas asociadas a estos.
- Determinar la forma como un cultivo de girasol afecta la concentración de los minerales en el suelo, debido a que en este estudio solo se realizó un análisis químico preliminar del mismo.
- Generar nuevas investigaciones sobre el fenómeno alelopático en otras plantas pertenecientes a la familia de las Compuestas, que contribuyan a la utilización de nuevos herbicidas siguiendo como modelos los desarrollados en la propia naturaleza.

ANEXO 1

ANALYSIS OF VARIANCE (Analysis of Variance Report)

PRIMER ENSAYO. *Bothriochloa pertusa* L.

ANOVA Table for Response Variable: C3

Source Term	DF	Sum-Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob>F	Error
A (C2)	7	8.403749	1.200536	3.24	0.0244	ERROR
ERROR	16	5.929584	.370599			
TOTAL(Adj)	23	14.33333				

ANALYSIS OF VARIANCE (Duncan's Range Test)

PRIMER ENSAYO. *Bothriochloa pertusa* L.

Response Variable: C3 Factor(A,C2) Error Term: ERROR

Summary Results $\alpha = .05$		Level Codes
Code(Level)	Mean	ABCDEFGH
A(3)	4.125	SS
B(1)	4.791667	S
C(2)	4.791667	S
D(4)	4.916667	
E(6)	4.991667	
F(8)	5.125	
G(7)	5.925	S.....
H(5)	6.066667	SSS.....

ANALYSIS OF VARIANCE (Analysis of Variance Report)

SEGUNDO ENSAYO. *Bothriochloa pertusa* L.

ANOVA Table for Response Variable: C3

Source Term	DF	Sum-Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob>F	Error
A (C2)	7	1.3206	.1886571	0.86	0.5569	ERROR
ERROR	16	3.510001	.219375			
TOTAL(Adj)	23	4.8306				

ANALYSIS OF VARIANCE (Duncan's Range Test)

SEGUNDO ENSAYO. *Bothriochloa pertusa* L.

Response Variable: C3 Factor(A,C2) Error Term: ERROR

Summary Results $\alpha = .05$ Level Codes

Code(Level)	Mean	ABCDEFGH
A(8)	3.9	
B(1)	3.933333	
C(3)	3.966667	
D(7)	4.133333	
E(2)	4.325	
F(5)	4.333334	
G(4)	4.441667	
H(6)	4.558333	

ANALYSIS OF VARIANCE (Analysis of Variance Report)

TERCER ENSAYO. *Bothriochioa pertusa* L.

ANOVA Table for Response Variable: C6

Source Term	DF	Sum-Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob>F	Error
A (C5)	7	14.2449	2.034985	4.05	0.0098	ERROR
ERROR	16	8.044169	.5027605			
TOTAL(Adj)	23	22.28906				

ANALYSIS OF VARIANCE (Duncan's Range Test)

TERCER ENSAYO. *Bothriochioa pertusa* L.

Response Variable: C6 Factor(A,C5) Error Term: ERROR

Summary Results $\alpha = .05$ Level Codes

Code(Level)	Mean	ABCDEFGH
A(1)	2.7	..SSSSSS
B(2)	3.816667	S
C(3)	4.191667	S.....
D(7)	4.458334	S.....
E(5)	4.808333	S.....
F(8)	4.816667	S.....
G(4)	4.941667	S.....
H(6)	5.316667	SS.....

ANEXO 2

ANALYSIS OF VARIANCE (Analysis of Variance Report)

SEGUNDO ENSAYO. *Digitalia bicomis* L.

ANOVA Table for Response Variable: C9

Source Term	DF	Sum-Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob>F	Error
A (C8)	7	.5026907	7.181E-02	0.66	0.7002	ERROR
ERROR	16	1.734133	.1083833			
TOTAL(Adj)	23	2.236824				

ANALYSIS OF VARIANCE (Duncan's Range Test)

SEGUNDO ENSAYO. *Digitalia bicomis* L.

Response Variable: C9 Factor(A,C8) Error Term: ERROR

Summary Results $\alpha = .05$ Level Codes

Code(Level)	Mean	ABCDEFGH
A(2)	1.711667	
B(5)	1.766667	
C(3)	1.808333	
D(1)	1.891667	
E(7)	1.953333	
F(8)	2.066667	
G(4)	2.091667	
H(6)	2.108333	

ANALYSIS OF VARIANCE (Analysis of Variance Report)

TERCER ENSAYO. *Digitalia bicomis* L.

ANOVA Table for Response Variable: C12

Source Term	DF	Sum-Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob>F	Error
A (C11)	7	.5526798	7.895E-02	0.64	0.7159	ERROR
ERROR	14	1.724166	.1231547			
TOTAL(Adj)	21	2.276846				

ANALYSIS OF VARIANCE (Duncan's Range Test)

TERCER ENSAYO. *Digitaria bicomis* L.

Response Variable: C12 Factor(A,C11) Error Term: ERROR

Summary Results $\alpha = .05$ Level Codes

Code(Level)	Mean	ABCDEFGH
A(3)	1.508333	
B(5)	1.525	
C(4)	1.7	
D(2)	1.841667	
E(6)	1.85	
F(1)	1.866667	
G(8)	1.9	
H(7)	1.958333	

ANALYSIS OF VARIANCE (Analysis of Variance Report)

PRIMER ENSAYO. *Digitaria bicomis* L.

ANOVA Table for Response Variable: C18

Source	DF	Sum-Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob>F	Error Term
A (C17)	7	2.00613	.28659	0.37	0.9064	ERROR
ERROR	13	10.18375	.7833654			
TOTAL(Adj)	20	12.18988				

ANALYSIS OF VARIANCE (Duncan's Range Test)

PRIMER ENSAYO. *Digitaria bicomis* L.

Response Variable: C18 Factor(A,C17) Error Term: ERROR

Summary Results $\alpha = .05$ Level Codes

Code(Level)	Mean	ABCDEFGH
A(4)	1.8	
B(3)	1.916667	
C(8)	1.95	
D(6)	1.958333	
E(1)	2.125	
F(2)	2.375	
G(7)	2.416667	
H(5)	2.875	

ANEXO 3

ANALYSIS OF VARIANCE (Analysis of Variance Report)

TERCER ENSAYO. *Leptochloa mucronata*.

ANOVA Table for Response Variable: C3

Source	DF	Sum-Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob>F	Error
Term						
A (C2)	7	2.591E-02	3.702E-03	9.09	0.0001	ERROR
ERROR	16	6.519E-03	.0004075			
TOTAL(Adj)	23	3.243E-02				

ANALYSIS OF VARIANCE (Duncan's Range Test)

TERCER ENSAYO. *Leptochloa mucronata*.

Response Variable: C3 Factor(A,C2) Error Term: ERROR

Summary Results $\alpha = .05$ Level Codes

Code(Level)	Mean	ABCDEFGHIH
A(2)	.2093333	...SSSSS
B(3)	.219	SSSS
C(1)	.227	SSS
D(4)	.2556667	S.....S
E(5)	.262	SS.....S
F(6)	.2676667	SSS....S
G(7)	.283	SSS.....
H(8)	.314	SSSSSS..

ANALYSIS OF VARIANCE (Analysis of Variance Report)

PRIMER ENSAYO. *Leptochloa mucronata*.

ANOVA Table for Response Variable: C6

Source	DF	Sum-Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob>F	Error	Term
A (C5)	7	.2537483	3.624E-02	1.05	0.4369	ERROR	
ERROR	16	.552505	3.453E-02				
TOTAL(Adj)	23	.8062533					

ANALYSIS OF VARIANCE (Duncan's Range Test)

PRIMER ENSAYO. *Leptochloa mucronata*.

Response Variable: C6 Factor(A,C5) Error Term: ERROR

Summary Results $\alpha = .05$ Level Codes

Code(Level)	Mean	ABCDEFGHIH
A(5)	.2497	S

B(1)	.3032334	
C(2)	.3040667	
D(3)	.3350567	
E(6)	.3508333	
F(8)	.3610333	
G(7)	.3945	
H(4)	.6135667	S.....

ANALYSIS OF VARIANCE (Analysis of Variance Report)

SEGUNDO ENSAYO. *Leptochica mucronata*.

ANOVA Table for Response Variable: C12

Source	DF	Sum-Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob>F	Error Term
A (C11)	7	4.160E-02	5.943E-03	5.78	0.0018	ERROR
ERROR	16	1.646E-02	1.028E-03			
TOTAL(Adj)	23	5.806E-02				

ANALYSIS OF VARIANCE (Duncan's Range Test)

SEGUNDO ENSAYO. *Leptochica mucronata*.

Response Variable: C12 Factor(A,C11) Error Term: ERROR

Summary Results $\alpha = .05$ Level Codes

Code(Level)	Mean	ABCDEFGHIH
-------------	------	------------

A(2)	.327	SSSS
B(3)	.3313333	SSSS
C(1)	.339	SSSS
D(4)	.3496667	SSSS
E(7)	.4093334	SSSS....
F(6)	.4146667	SSSS....
G(5)	.4146667	SSSS....
H(8)	.4336667	SSSS....

ANEXO 4

*Bioensayo aplicado en el porcentaje de germinación sobre la maleza
Bothriochloa pertusa L.*

N° de Réplicas								
	Ext. 1	H ₂ O	Ext. 2	H ₂ O	Ext. 3	H ₂ O	H ₂ O	Ext 4

Bioensayo aplicado en el cultivo de Zea Maíz.

N° de Réplicas												
	Ext	H ₂ O	Ext.	H ₂ O	Ext.	H ₂ O	H ₂ O	Ext.	Ext.	H ₂ O	H ₂ O	Ext.
	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6

ANEXO 5

DISTRIBUCION COMPLETAMENTE AL AZAR CON TRES REPETICIONES (3 ENSAYOS)

C ²⁴	F ²³	A ²²	C ²¹	G ²⁰	A ¹⁹	B ¹⁸	B ¹⁷
H ⁹	F ¹⁰	D ¹¹	H ¹²	H ¹³	D ¹⁴	G ¹⁵	C ¹⁶
A ⁸	E ⁷	E ⁶	B ⁵	D ⁴	E ³	F ²	G ¹

D ²⁴	F ²³	A ²²	E ²¹	B ²⁰	G ¹⁹	B ¹⁸	H ¹⁷
F ⁹	B ¹⁰	E ¹¹	E ¹²	H ¹³	C ¹⁴	C ¹⁵	C ¹⁶
H ⁸	F ⁷	D ⁶	G ⁵	G ⁴	A ³	D ²	A ¹

B ²⁴	D ²³	B ²²	G ²¹	F ²⁰	B ¹⁹	G ¹⁸	C ¹⁷
G ⁹	E ¹⁰	D ¹¹	C ¹²	C ¹³	F ¹⁴	F ¹⁵	A ¹⁶
H ⁸	E ⁷	D ⁶	H ⁵	E ⁴	A ³	A ²	H ¹

**DISTRIBUCIÓN COMPLETAMENTE AL AZAR CON TRES REPETICIONES
(3 ENSAYOS)**

G ²⁴	B ²³	D ²²	G ²¹	D ²⁰	E ¹⁹	A ¹⁸	F ¹⁷
C ⁹	A ¹⁰	H ¹¹	F ¹²	D ¹³	C ¹⁴	C ¹⁵	A ¹⁶
F ⁸	H ⁷	H ⁶	B ⁵	G ⁴	B ³	E ²	E ¹

H ²⁴	E ²³	D ²²	B ²¹	F ²⁰	C ¹⁹	G ¹⁸	G ¹⁷
A ⁹	G ¹⁰	B ¹¹	B ¹²	H ¹³	A ¹⁴	F ¹⁵	H ¹⁶
E ⁸	D ⁷	C ⁶	D ⁵	E ⁴	F ³	A ²	C ¹

B ²⁴	D ²³	F ²²	F ²¹	H ²⁰	D ¹⁹	G ¹⁸	G ¹⁷
A ⁹	E ¹⁰	G ¹¹	C ¹²	A ¹³	E ¹⁴	D ¹⁵	B ¹⁶
B ⁸	E ⁷	H ⁶	C ⁵	A ⁴	F ³	H ²	C ¹

**DISTRIBUICION COMPLETAMENTE AL AZAR CON TRES REPLICAS
(TRES ENSAYOS)**

A ²⁴	B ²³	A ²²	D ²¹	D ²⁰	H ¹⁹	F ¹⁸	E ¹⁷
F ⁹	G ¹⁰	H ¹¹	A ¹²	E ¹³	C ¹⁴	G ¹⁵	C ¹⁶
B ⁸	C ⁷	B ⁶	G ⁵	H ⁴	D ³	F ²	E ¹

G ²⁴	F ²³	A ²²	G ²¹	D ²⁰	E ¹⁹	B ¹⁸	H ¹⁷
H ⁹	B ¹⁰	A ¹¹	E ¹²	A ¹³	B ¹⁴	E ¹⁵	D ¹⁶
C ⁸	C ⁷	C ⁶	G ⁵	F ⁴	F ³	H ²	D ¹

D ²⁴	F ²³	H ²²	A ²¹	B ²⁰	G ¹⁹	D ¹⁸	C ¹⁷
A ⁹	F ¹⁰	F ¹¹	G ¹²	A ¹³	C ¹⁴	C ¹⁵	E ¹⁶
E ⁸	E ⁷	B ⁶	G ⁵	B ⁴	H ³	H ²	D ¹

ANEXO 6

Extractor de varios usos.

