



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
CAMPUS TUXTEPEC

" Establecimiento de las condiciones para el estudio de las propiedades herbicidas de hojas de nanche (*Byrsonima crassifolia*) utilizando *Brachiaria brizantha* como modelo"

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Ingeniera en Biotecnología

PRESENTA:

ITZEL GARCÍA BRAVO

Director: Dra. Alma Xochil Ávila Alejandre

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA

AGOSTO DE 2021



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 16 de julio de 2021 a las 12 hr, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "**Establecimiento de las condiciones para el estudio de las propiedades herbicidas de hojas de nanche (*Byrsonima crassifolia*) utilizando *Brachiaria brizantha* como modelo**" presentada por la alumna **Itzel García Bravo**, con número de matrícula 15090013, aspirante al título de **Licenciatura**.

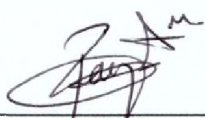
Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que la aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 16 de julio de 2021

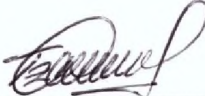
ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA



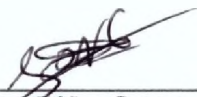
Dra. Alma Xochil Avila Alejandre
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis




Dr. Oscar Abelardo Ramirez Marroquin
Universidad del Papaloapan
Revisor de tesis



Dra. Tzvetanka Dinkova Dimitrova
Universidad Nacional Autónoma de México
Revisor de Tesis



Dr. Oscar Nuñez Gaona
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



Dr. Enrique Villalobos Amador
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca, a 03 de agosto de 2021
Oficio No. JCIB/001/08/2021

Lic. Yesenia Barrientos Arenal
Jefe de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis de la alumna **Itzel García Bravo** titulado "**Establecimiento de las condiciones para el estudio de las propiedades herbicidas de hojas de nanche (*Byrsonima crassifolia*) utilizando *Brachiaria brizantha* como modelo**". Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

Dr. Oscar Núñez Gaona (Presidente)
Dra. Tzvetanka Dinkova Dimitrova (Vocal)
Dr. Óscar Abelardo Ramírez Marroquín (Secretario)
Dr. Enrique Villalobos Amador (Primer Suplente)
Dr. Julián Mario Peña Castro (Segundo Suplente)

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.



Atentamente

Terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú

Dr. Julián Mario Peña Castro
Jefe de Carrera de Ingeniería en
Biotecnología
Universidad del Papaloapan



Vo.Bo. M.C. Héctor López Arjona
Vice Rector Académico
VICE-RECTORIA
ACADEMICA
Universidad del Papaloapan

c.c.p. Dra. Alma Xochil Avila Alejandre. Director de tesis, Para su conocimiento
c.c.p. Itzel García Bravo, Alumno, Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

Hoja de Originalidad

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

Agradecimientos

Se agradece a la Coordinación General de Educación Media Superior y Superior, Ciencia y Tecnología (CGEMSySCyT) por la beca Manutención Oaxaca-2015 con folio 3471980.

Se agradece a la Coordinación General de Educación Media Superior y Superior, Ciencia y Tecnología (CGEMSySCyT) por la beca Apoya tu transporte Oaxaca – 2015 con folio 3515856.

Se agradece a la Coordinación General de Educación Media Superior y Superior, Ciencia y Tecnología (CGEMSySCyT) por la beca Apoya tu transporte Oaxaca 2016– 2017 con folio 4315569.

Se agradece a la Coordinación General de Educación Media Superior y Superior, Ciencia y Tecnología (CGEMSySCyT) por la beca Manutención Oaxaca 2016-2017 con folio 4301565.

Se agradece a la Coordinación General de Educación Media Superior y Superior, Ciencia y Tecnología (CGEMSySCyT) por la beca Apoya tu transporte Oaxaca 2017– 2018 con folio 6390393.

Se agradece a la Coordinación General de Educación Media Superior y Superior, Ciencia y Tecnología (CGEMSySCyT) por la beca Manutención Oaxaca 2017-2018 con folio 6349666.

Se agradece a la Coordinación Nacional de Becas para el bienestar por la beca Elisa Acuña para iniciar la titulación, con número de folio 22758869.

Se agradece al laboratorio de Biotecnología Agraria y Transferencia de Tecnología (LABIOTT) por permitirme el uso de sus instalaciones, equipo, técnicas y reactivos.

Se agradece a la Dra. Alma Xochil Ávila Alejandre fungir como directora de tesis, facilitar un laboratorio para la realización del trabajo experimental y acceso a equipo, técnicas y reactivos para la realización del mismo.

Se agradece al Mto. Alejandro Hernández López fungir como asesor externo, facilitar un laboratorio para la realización del trabajo experimental y acceso a equipo, técnicas y reactivos.

Se agradece al comité de revisión de protocolo y manuscrito de tesis conformado por el Dr. Oscar Núñez Gaona (Presidente y revisor), el Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín (Secretario y revisor), la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova (Vocal y revisora), la Dra. Priscila Guerra Ramírez (vocal) y el Dr. Enrique Villalobos Amador (revisor).

Dedicatoria

A mi familia y amigos por su apoyo durante este proceso, en especial a mi mamá sin quien esto no hubiera sido posible.

ÍNDICE DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABLAS	xii
ABREVIATURAS	xv
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. MARCO CONCEPTUAL	4
2.1. Herbicidas: Definición y clasificación.	4
2.2. Importancia de los herbicidas	7
2.3. Translocación de herbicidas	9
2.4. Efectos indeseables de los herbicidas. Enfermedades y contaminación	10
2.5. Resistencia a herbicidas	11
2.6. Xenobióticos y aleloquímicos.....	13
2.7. Definición de germinación y establecimiento.....	14
3. ANTECEDENTES	15
3.1. Alelopatía en plantas.....	15
3.2. <i>Medicago sativa</i> (Alfalfa)	15
3.3. <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nanche).....	16
4. JUSTIFICACIÓN	17
5. HIPÓTESIS	17
6. OBJETIVOS	17
6.1. Objetivo principal	17
6.2. Objetivos secundarios	17
7. MATERIALES Y MÉTODOS	18
7.1. Material biológico	19
7.2. Procesamiento de hojas	19

7.3.	Obtención de extractos (UPAE).....	19
7.4.	Obtención de semillas de plantas modelo	20
7.5.	Prueba de efecto sobre germinación	20
7.5.1.	Preparación de extractos	21
7.5.2.	Efectos de los extractos sobre la germinación.....	21
7.6.	Efecto de los extractos sobre el establecimiento	22
7.7.	Análisis de resultados.....	24
7.8.	Análisis fitoquímico	24
7.8.1.	Determinación de flavonoides por Cromatografía en capa fina (TCL).....	24
7.8.2.	Barrido de extractos por espectrofotometría	25
7.8.3.	Cuantificación de fenoles totales (Folin-Ciocalteu).....	25
7.8.4.	Cuantificación de flavonoides totales	26
8.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	27
8.1.	Obtención de extractos (UPAE).....	27
8.2.	Efecto de los extractos de <i>Byrsonima crassifolia</i> y <i>Medicago sativa</i> sobre la germinación de <i>Brachiaria brizantha</i>.....	27
8.2.1.	Efecto del extracto etanólico sobre la germinación de <i>B. brizantha</i>	28
8.2.2.	Efecto del extracto obtenido con acetato de etilo sobre la germinación de <i>B. brizantha</i>	30
8.2.3.	Efecto del extracto hexánico sobre la germinación de <i>B. brizantha</i>	33
8.3.	Efecto de los extractos de <i>Byrsonima crassifolia</i> y <i>Medicago sativa</i> sobre el establecimiento de <i>Brachiaria brizantha</i>.....	36
8.3.1.	Efecto del extracto etanólico sobre las raíces de <i>B. brizantha</i>.....	36
8.3.2.	Efecto del extracto obtenido con acetato de etilo de <i>Byrsonima crassifolia</i> y <i>Medicago sativa</i> sobre las raíces de <i>Brachiaria brizantha</i>	41
8.3.3.	Efecto del extracto hexánico de <i>Byrsonima crassifolia</i> y <i>Medicago sativa</i> sobre las raíces de <i>Brachiaria brizantha</i>.....	45
8.3.4.	Efecto de los extractos de <i>Byrsonima crassifolia</i> sobre el crecimiento de la parte aérea de <i>B. brizantha</i>	49
8.4.	Prueba de toxicidad sobre un cultivo de interés agronómico (PTCIA).....	58
8.4.1.	Efecto del extracto de <i>Byrsonima crassifolia</i> sobre la germinación de <i>Zea mays</i> (PTCIA)	58
8.4.2.	Efecto de los extractos de <i>Byrsonima crassifolia</i> sobre el establecimiento de <i>Zea mays</i> (PTCIA).....	61
8.5.	Análisis fitoquímico	69
8.5.1.	Determinación de flavonoides por cromatografía en capa fina	69
8.5.2.	Barrido de extractos por espectrofotometría	72
8.5.3.	Cuantificación de fenoles y flavonoides totales.....	74

9.	CONCLUSIONES	77
10.	PERSPECTIVAS	79
11.	LITERATURA	80
12.	ANEXO	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Brachiaria brizantha</i> cv Marandú en campo.	8
Figura 2. Diagrama de flujo de estrategia experimental seguida en este trabajo.	18
Figura 3. Esquema de sistema de cromatografía líquida en capa fina.	24
Figura 4. Efecto de diferentes concentraciones de extracto etanólico de <i>B. crassifolia</i> (a), y <i>M. sativa</i> (b) sobre el porcentaje de germinación diaria de semillas de <i>B. brizantha</i> (Organismo diana).	28
Figura 5. Efecto de diferentes concentraciones de acetato de etilo etanólico de <i>B. crassifolia</i> (a), y <i>M. sativa</i> (b) sobre el porcentaje de germinación diaria de semillas de <i>B. brizantha</i> (Organismo diana).	31
Figura 6. Efecto de diferentes concentraciones de extracto hexánico de <i>B. crassifolia</i> (a), y <i>M. sativa</i> (b) sobre el porcentaje de germinación diaria de semillas de <i>B. brizantha</i> (Organismo diana).	34
Figura 7. Efecto de diferentes concentraciones de extracto etanólico de <i>B. crassifolia</i> (a), y <i>M. sativa</i> (b) sobre la longitud de la raíz principal de plántulas de <i>B. brizantha</i> (Organismo diana).	37
Figura 8. Efecto de diferentes concentraciones de extracto etanólico de <i>B. crassifolia</i> (a), y <i>M. sativa</i> (b) sobre el porcentaje de plántulas con raíces laterales de <i>B. brizantha</i> (Organismo diana).	39
Figura 9. Efecto de diferentes concentraciones de extracto obtenido con acetato de etilo de <i>B. crassifolia</i> (a), y <i>M. sativa</i> (b) sobre la longitud de la raíz principal de plántulas de <i>B. brizantha</i> (Organismo diana).	41
Figura 10. Efecto de diferentes concentraciones de extracto obtenido con acetato de etilo de <i>B. crassifolia</i> (a), y <i>M. sativa</i> (b) sobre el porcentaje de plántulas con raíces laterales de <i>B. brizantha</i> (Organismo diana).	44
Figura 11. Efecto de diferentes concentraciones de extracto hexánico de <i>B. crassifolia</i> (a), y <i>M. sativa</i> (b) sobre la longitud de la raíz principal de plántulas de <i>B. brizantha</i> (Organismo diana).	46
Figura 12. Efecto de diferentes concentraciones de extracto hexánico de <i>B. crassifolia</i> (a), y <i>M. sativa</i> (b) sobre el porcentaje de plántulas con raíces laterales de <i>B. brizantha</i> (Organismo diana).	48
Figura 13. Efecto de diferentes concentraciones de extracto etanólico de <i>B. crassifolia</i> (a), y <i>M. sativa</i> (b) sobre la aparición de la primera hoja de plántulas de <i>B. brizantha</i> (Organismo diana).	50
Figura 14. Efecto de diferentes concentraciones de extracto obtenido con acetato de etilo de <i>B. crassifolia</i> (a), y <i>M. sativa</i> (b) sobre la aparición de la primera hoja de plántulas de <i>B. brizantha</i> (Organismo diana).	53
Figura 15. Efecto de diferentes concentraciones de extracto hexánico de <i>B. crassifolia</i> (a), y <i>M. sativa</i> (b) sobre la aparición de la primera hoja de plántulas de <i>B. brizantha</i> (Organismo diana).	56

Figura 16. Efecto de diferentes concentraciones de extracto etanólico (a), de acetato de etilo (b) y hexánico (c) de <i>B. crassifolia</i> sobre el porcentaje de germinación diaria de semillas de <i>Z. mays</i> (PTCIA).	59
Figura 17. Efecto de diferentes concentraciones de extracto de <i>B. crassifolia</i> etanólico (a), de acetato de etilo (b) y hexánico (c) sobre la longitud de la raíz principal de plántulas de <i>Z. mays</i> (PTCIA).	62
Figura 18. Efecto de diferentes concentraciones de extracto etanólico de <i>B. crassifolia</i> etanólico (a), de acetato de etilo (b) y hexánico (c) sobre el porcentaje de plántulas con raíces laterales de <i>Z. mays</i> (PTCIA). 64	
Figura 19. Efecto de diferentes concentraciones de extracto etanólico de <i>B. crassifolia</i> etanólico (a), de acetato de etilo (b) y hexánico (c) sobre la aparición de la primera hoja de plántulas de <i>Z. mays</i> (PTCIA). 66	
Figura 20. Cromatografía con quercetina y extracto etanólico de <i>Byrsonima crassifolia</i> a 5, 2.5 y 1.66 mg/mL vista con una lámpara de 365 nm (a), y una de 254 nm (b), utilizando la fase móvil <i>ad hoc</i> para flavonoides y sílica gel 60 como fase estacionaria. Los números indican el factor de arrastre (Rf) de la banda, y la flecha señala la banda a la que corresponde dicho Rf.	69
Figura 21. Cromatografía con quercetina (Q), extracto etanólico de <i>B. crassifolia</i> (N), extracto etanólico de <i>M. sativa</i> (A), y cumarina (C) a 10 mg/mL vista con una lámpara de 365 nm (a), y una de 254 nm (b), utilizando la fase móvil <i>ad hoc</i> para flavonoides y sílica gel 60 como fase estacionaria. Los números indican el factor de arrastre (Rf) de la banda, y la flecha señala la banda a la que corresponde dicho Rf.	71
Figura 22. Perfil de extracto etanólico de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nanche) comparado con los de quercetina, atropina, cafeína y cumarina.	73
Figura 23. Perfil de extracto etanólico de <i>Medicago sativa</i> (alfalfa) comparado con los de quercetina, atropina, cafeína y cumarina.	74
Figura 24. Fotografía de reacciones de cuantificación de flavonoides totales.	75

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de clasificación de herbicidas.	4
Tabla 2. Mecanismos de acción de los herbicidas y principales ejemplos.....	5
Tabla 3. Vías de translocación de herbicidas en las plantas.	9
Tabla 4. Ecuaciones utilizadas para los parámetros de germinación evaluados.	21
Tabla 5. Ecuaciones utilizadas para los parámetros de establecimiento evaluados.	22
Tabla 6. Rendimiento de extracciones de <i>B. crassifolia</i> y <i>M. sativa</i> con diferentes solventes, con $n \geq 3$	27
Tabla 7. Cuadro comparativo de los parámetros de germinación de semillas de <i>B. brizantha</i> (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto etanólico <i>B. crassifolia</i> o <i>M. sativa</i> evaluados en el tiempo final (día 8).	29
Tabla 8. Cuadro comparativo de los parámetros de germinación de semillas de <i>B. brizantha</i> (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto obtenido con acetato de etilo <i>B. crassifolia</i> o <i>M. sativa</i> evaluados en el tiempo final (día 8).	32
Tabla 9. Cuadro comparativo de los parámetros de germinación de semillas de <i>B. brizantha</i> (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto hexánico <i>B. crassifolia</i> o <i>M. sativa</i> evaluados en el tiempo final (día 8).	35
Tabla 10. Cuadro comparativo de los parámetros de crecimiento de la raíz principal de <i>B. brizantha</i> (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto etanólico <i>B. crassifolia</i> o <i>M. sativa</i> evaluados en el tiempo final (día 8).	38
Tabla 11. Cuadro comparativo de los parámetros de crecimiento de las raíces laterales de <i>B. brizantha</i> (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto etanólico <i>B. crassifolia</i> o <i>M. sativa</i> evaluados en el tiempo final (día 8).	40
Tabla 12. Cuadro comparativo de los parámetros de crecimiento de la raíz principal de <i>B. brizantha</i> (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto obtenido con acetato de etilo <i>B. crassifolia</i> o <i>M. sativa</i> evaluados en el tiempo final (día 8).	42
Tabla 13. Cuadro comparativo de los parámetros de crecimiento de las raíces laterales de <i>B. brizantha</i> (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto obtenido con acetato de etilo <i>B. crassifolia</i> o <i>M. sativa</i> evaluados en el tiempo final (día 8).	45

Tabla 14. Cuadro comparativo de los parámetros de crecimiento de la raíz principal de *B. brizantha* (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto hexánico *B. crassifolia* o *M. sativa*.

47

Tabla 15. Cuadro comparativo de los parámetros de crecimiento de las raíces laterales de *B. brizantha* (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto hexánico *B. crassifolia* o *M. sativa* evaluados en el tiempo final (día 8).....49

Tabla 16. Cuadro comparativo de los parámetros de crecimiento de la parte aérea de *B. brizantha* (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto etanólico *B. crassifolia* o *M. sativa* evaluadas a tiempo final (días 8).....51

Tabla 17. Cuadro comparativo de los parámetros de crecimiento de la parte aérea de *B. brizantha* (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto obtenido con acetato de etilo *B. crassifolia* o *M. sativa* evaluadas a tiempo final (días 8).54

Tabla 18. Cuadro comparativo de los parámetros de crecimiento de la parte aérea de *B. brizantha* (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto hexánico de *B. crassifolia* o *M. sativa* evaluadas a tiempo final (días 8).....57

Tabla 19. Cuadro comparativo de los parámetros de germinación de semillas de *Z. mays* (PTCIA) tratadas con distintas concentraciones de extracto de *B. crassifolia* evaluados en el tiempo final.....60

Tabla 20. Cuadro comparativo de los parámetros de crecimiento de la raíz principal de *Z. mays* (PTCIA) tratadas con distintas concentraciones de extracto etanólico, de acetato de etilo y hexánico de *B. crassifolia* evaluados en el tiempo final.63

Tabla 21. Cuadro comparativo de los parámetros de crecimiento de las raíces laterales de *Z. mays* (PTCIA) (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto etanólico, de acetato de etilo y hexánico de *B. crassifolia* evaluados en el tiempo final.....65

Tabla 22. Cuadro comparativo de los parámetros de crecimiento de la parte aérea de *Z. mays* (PTCIA) tratadas con distintas concentraciones de extracto etanólico, de acetato de etilo y hexánico de *B. crassifolia* evaluados en el tiempo final.67

Tabla 23. Cuadro comparativo de los parámetros de establecimiento de *Z. mays* (PTCIA) tratadas con distintas concentraciones de extracto etanólico, de acetato de etilo y hexánico de *B. crassifolia* evaluados en el tiempo final.67

Tabla 24. Identificación de Rf de bandas de cromatografías presentadas en Figura 39 y potenciales compuestos correspondientes a ellos.....70

Tabla 25. Identificación de Rf de bandas de cromatografías presentadas en Figura 40 y potenciales compuestos correspondientes a ellos.....72

Tabla 26. Tabla de contenido de fenoles totales en extractos de *Byrsonima crassifolia*. Análisis estadístico ANOVA de una vía con Fisher como prueba como prueba *ad hoc*, con $P > 0.05$, $n=3$75

ABREVIATURAS

2,4 D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2,4 DB	Ácido 4-(2,4-diclorofenoxi)butanoico
2,4 DP	Ácido (R)-2-(2,4-diclorofenoxi)propanoico
Ác.	Ácida
Ala	Alanina
ALS	Acetolactato sintetasa
ANOVA	Análisis de la varianza
APP	Ariloxifenoxi propanoato
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Asparagina
ATP	Adenosín trifosfato
CHD	Ciclohexanodiona
CoA	Coenzima A
Col.	Colaboradores
Comer.	Comercial
CT	Carboxil transferasa
Cys	Cisteína
DCEPA	Dimetil tetraclorotereftalato
DE	Dry extract
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAG	Equivalentes de ácido gálico
Ecu.	Ecuación
EPSP	5-Enolpiruvato-Shikimato-3-fosfato
EQ	Equivalentes de quercetina
ES	De extracto seco
FAD	Flavina adenina dinucleótido
GAE	Gallic acid equivalent

Gly	Glicina
GS	Glutamina sintetasa
GTS	Glutación S-Transferasas
His	Histidina
Ile	Isoleucina
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Leu	Leucina
Lys	Lisina
MCPA	Ácido (4-cloro-2-metilfenoxi)acético
MCPB	Ácido 4-(4-cloro-o-toliloxi)butírico
Met	Metionina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
P450s	Citocromo P450 Monooxigenasas
PEP	Fosfoenolpiruvato
Phe	Fenilalanina
Ppm	Partes por millón
PPO	Protoporfirinógeno IX Oxidasa
PQ	Plastoquinona
Pro	Prolina
PS	Fotosistema
PSaC	Fotosistema I centro hierro-azufre
PTCIA	Prueba de toxicidad en cultivo de interés agronómico
QE	Quercetine equivalent
QB	Plastoquinona B
Rf	Factor de retardo
Ser	Serina
Sil.	Silvestre
TBA	Ácido 2,3,6 diclorobenzoico
TC50	Tiempo de crecimiento 50
TCA	Ácido tricloroacético

TG50	Tiempo de germinación 50
Thr	Treonina
TI	Tasa de inhibición
Trp	Triptofano
UPAE	Extracción asistida por ultrasonificación y prensado
Val	Valina
Var.	Variedad

RESUMEN

Los herbicidas son los plaguicidas más utilizados en la agricultura. Son utilizados para controlar la población y crecimiento de malezas, evitando competencia por sol, nutrientes y agua (Pileggi, Pileggi y Sadowsky, 2020; Mortimer, 1996). Las pérdidas en producción agrícola por ellas se estiman de 10%, pero pueden llegar al 52% (Weed Science Society of America, 2021; Mortimer, 1996) y su control puede aumentar la producción hasta en un 37% (Khanh, 2008). El uso de herbicidas también tiene desventajas: contamina, produce daños a la salud y resistencia en hierbas. Por esto, es importante buscar moléculas con distintos mecanismos de acción. La búsqueda de actividad herbicida ha fijado su atención en extractos de plantas. En un trabajo no publicado de Hernández López et al. se observó una disminución en la densidad poblacional y altura de malezas bajo la copa de árboles de *Byrsonima crassifolia*, la cual fue corroborada por otros productores de la región. Esto, aunado a la variedad de propiedades biológicas previamente reportadas de *B. crassifolia*, permiten suponer que sus hojas podrían acumular compuestos con actividad herbicida no reportada. El objetivo de este trabajo fue estudiar la actividad herbicida de extractos de hojas de *Byrsonima crassifolia* (Nanche) utilizando *Brachiaria brizantha* (pasto Marandú) como modelo experimental de maleza y a *Medicago sativa* (Alfalfa) como Control positivo (con actividad herbicida reportada), para esto se probó su efecto sobre la germinación y establecimiento, comparando con *Zea mays* (Maíz) y se realizaron pruebas fitoquímicas del extracto. Los resultados indicaron que el extracto etanólico de *B. crassifolia* tuvo efectos negativos sobre la germinación y porcentaje de plantas con 1 hoja de *B. brizantha*; los extractos de acetato de etilo y hexánico disminuyeron el porcentaje de germinación, la longitud de la raíz principal, porcentaje de plantas con raíces laterales y con 1 hoja. *B. brizantha* fue más sensible a los extractos de *B. crassifolia* que *Z. mays*, y *B. brizantha* fue más sensible a extractos de *B. crassifolia* que de *M. sativa* en germinación. Se consideró que el mejor tratamiento fue el extracto etanólico a 10 ppm. En el extracto etanólico de *B. crassifolia*, se identificó tentativamente quercetina, rutina, ácido cafeico, Isorhamnetina-rutinosil-glucósido e Isoquercetina. Tuvo un contenido de fenoles totales de $4.4 \pm 0.1 \mu\text{g EAG}/\mu\text{g ES}$ y de flavonoides de $72.5 \pm 3.2 \mu\text{g EQ/mL}$; en el extracto obtenido con acetato de etilo fue de $1.2 \pm 0.1 \mu\text{g EAG}/\mu\text{g ES}$ y $83.5 \pm 0.6 \mu\text{g EQ/mL}$, respectivamente. Se demostró que los extractos de *Byrsonima crassifolia* variedad de fruto ácido tienen un potencial como herbicida, por lo que se seguirá estudiando por el grupo de trabajo.

ABSTRACT

Herbicides are the most widely used pesticides in agriculture. They are used to control the population and growth of weeds, avoiding competition for sun, nutrients and water (Pileggi, Pileggi and Sadowsky, 2020; Mortimer, 1996). Losses in agricultural production due to them are estimated at 10%, but they can reach 52% (Weed Science Society of America, 2021; Mortimer, 1996) and their control can increase production up to 37% (Khanh, 2008). The use of herbicides also has disadvantages: it pollutes, causes damage to health and resistance in herbs. For this reason, it is important to look for molecules with different mechanisms of action. The search for herbicidal activity has turned its attention to plant extracts. In an unpublished work by Hernández López et al. a decrease in the population density and height of weeds was observed under the canopy of *Byrsonima crassifolia* trees, which was corroborated by other producers in the region. This, coupled with the variety of biological properties previously reported of *B. crassifolia*, allow us to suppose that its leaves could accumulate compounds with unreported herbicidal activity. The objective of this work was to study the herbicidal activity of *Byrsonima crassifolia* (Nanche) leaf extracts using *Brachiaria brizantha* (Marandú grass) as an experimental weed model and *Medicago sativa* (Alfalfa) as a Positive Control (with reported herbicidal activity), for this its effect on germination and establishment was tested, comparing with *Zea mays* (Corn) and phytochemical tests of the extract were carried out. The results indicated that the ethanolic extract of *B. crassifolia* had negative effects on the germination and percentage of plants with 1 leaf of *B. brizantha*; the ethyl and hexane acetate extracts decreased the germination percentage, the length of the main root, and the percentage of plants with lateral roots and with 1 leaf. *B. brizantha* was more sensitive to *B. crassifolia* extracts than *Z. mays*, and *B. brizantha* was more sensitive to germinating *B. crassifolia* extracts than *M. sativa*. The best treatment was considered to be the ethanolic extract at 10 ppm. In the ethanolic extract of *B. crassifolia*, quercetin, rutin, caffeic acid, Isorhamnetin-rutinosyl-glucoside and Isoquercetin were tentatively identified. It had a total phenol content of $4.4 \pm 0.1 \mu\text{g GAE}/\mu\text{g DE}$ and flavonoids of $72.5 \pm 3.2 \mu\text{g QE}/\text{mL}$; in the extract obtained with ethyl acetate it was $1.2 \pm 0.1 \mu\text{g GAE}/\mu\text{g DE}$ and $83.5 \pm 0.6 \mu\text{g QE}/\text{mL}$, respectively. It was shown that the extracts of *Byrsonima crassifolia* variety of acid fruit have a potential as herbicide, so it will continue to be studied by the working group

1. INTRODUCCIÓN

Los herbicidas son los plaguicidas más utilizados en la agricultura, controlan la población y crecimiento de malezas, evitando que éstas den sombra a los cultivos, compitan por nutrientes o agua, o sirvan como reservorios para otras plagas (Pileggi, Pileggi y Sadowsky, 2020; Mortimer, 1996). Son de gran importancia comercial, en 2019, en México, se exportaron 66.2 millones de dólares en herbicidas e importaron 167 millones de dólares (Hausmann, 2019). Las pérdidas de la producción agrícola por malezas se estiman en promedio del 10%, variando desde el 7% en Europa hasta el 16% en África (Mortimer, 1996), pero pueden llegar hasta al 52% en cultivos como el maíz (Weed Science Society of America, 2021). Por el contrario, el control adecuado de las malezas puede aumentar la producción hasta en un 37%, de acuerdo a estudios realizados en Pakistán (Khanh, 2008).

Por otro lado, el uso de herbicidas, también tiene desventajas, su uso puede contaminar el agua, el suelo, producir daños a la salud tanto en personal ocupacionalmente expuesto, como en consumidores, pero, además genera resistencia de las hierbas al tratamiento con los mismos. Por lo que es importante buscar nuevas moléculas con distintos mecanismos de acción a los existentes y a que en más de 20 años no se han reportado mecanismos nuevos y para el 2021 se reportan 522 hierbas resistentes a herbicidas comerciales cuya resistencia ya fue bien caracterizada con mecanismo de acción (Heap, 2021).

La tendencia de algunos grupos de trabajo a buscar actividad herbicida en extractos de plantas ha llevado al reporte de ésta actividad en varias plantas, entre las que se encuentran *Euphorbia heterophylla* L (Elshamy, Abd-ElGawad, El Gendy y Assaeed, 2019) y *Euphorbia helioscopia* (Wang, Wang, Feng, Yuan y Zhu et al. 2015) pertenecientes al género Malpighiales y *Medicago sativa*, en la que se ha reportado autotoxicidad e inhibición de crecimiento de raíces en *Echinochloa crus-galli* (Chon et al. 2002) y la inhibición de crecimiento de callos de *Digitaria ciliaris*, *Chenopodium album*, *Amaranthus lividus*, *Portulaca oleracea* y *Commelina communis* (Ghimire, Ghimire, Yu y Chung, 2019); el efecto se observa principalmente en las primeras etapas de la germinación.

En un trabajo no publicado de Hernández López et al. se observó una disminución en la densidad poblacional y altura de malezas bajo la copa de árboles de *Byrsonima crassifolia*, la cual fue corroborada por otros productores de la región. Esto, aunado a la variedad de propiedades

biológicas previamente reportadas de *B. crassifolia*, permiten suponer que sus hojas podrían acumular compuestos con actividad herbicida no reportada.

Además, se ha reportado actividad herbicida en plantas pertenecientes a la familia Magnoliopsida (Findura et al. 2020; Perveen et al. 2019), a la subclase Rosidae (Perveen et al. 2019; Puig, Reigosa, Valentão, Andrade y Pedrol, 2018; Chon et al. 2002) y al orden Malpighiales (Elshamy, Abd-ElGawad, El Gendy y Assaeed, 2019; Wang et al., 2015; Kowthar, El-Rokiek, Rawia y Taha, 2011), mismos a los que pertenece *B. crassifolia*.

2. MARCO CONCEPTUAL

2.1. Herbicidas: Definición y clasificación.

Los herbicidas son compuestos complejos que tienen la capacidad de controlar las plantas indeseables o malezas en los cultivos (Pileggi et al., 2020; Anzalone, 2007). Algunos de los criterios de clasificación de los herbicidas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Criterios de clasificación de herbicidas.

Criterio	Clasificación	Descripción	
Toxicidad	Extremadamente tóxicos	Dosis letal 50 media en mg/kg de peso vivo	
	Altamente tóxicos	1-100	
	Moderadamente tóxicos	101-250	
	Ligeramente tóxicos	251-1400	
Modo de uso	De contacto	Aplicación	Área afectada
	Sistémicos	Foliar	Tratada
	Residuales	Suelo	Distinta a la tratada Germinación
Forma de aplicación	Al follaje	Se aplica en follaje de maleza	
	Al suelo	Se aplica en el suelo del cultivo	
	Al agua	Sobre lámina de agua o disuelto en el riego	
Momento de aplicación	Pre-plantación	Antes de la plantación del cultivo	
	Pre-plantación incorporada	Antes de la plantación del cultivo y emergencia de maleza	
	Pre-emergencia	Antes de la emergencia de la maleza	
	Post-emergencia	Antes de la emergencia del cultivo y maleza	

	Post dirigidas	Después de la emergencia del cultivo y maleza, evitando asperjar los cultivos
Selectividad	Por cultivo Por maleza	Por cultivo al que puede aplicarse Por espectro de malezas que controla

Fuente: Elaborado a partir de Anzalone (2007) y Caseley (1996).

También puede clasificarse de acuerdo a su mecanismo de acción, los cuales se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Mecanismos de acción de los herbicidas y principales ejemplos.

Tipo de inhibición		Descripción de mecanismo	Ejemplos (Familias químicas o ingrediente activo)
Síntesis de Aminoácidos	Cadena ramificada	Acetolactato sintetasa (ALS) produce a los precursores de valina, leucina e isoleucina. Los herbicidas son inhibidores competitivos que se unen de manera reversible al complejo ALS-FAD-tiamina-pirofosfato-Mg ²⁺ piruvato descarboxilato.	Imidazolinonas, Triazolopirimidinas, Pirimidinil(tio)-Benzoatos, Sulfonilaminocarboniltriazolinonas y Sulfonilureas.
	Anillo aromático	La 5-Enolpiruvato-Shikimato-3-fosfato (EPSP) sintetasa actúa en la vía de Shikimato, convirtiendo el fosfoenol piruvato y Shikimato-3-fosfato en EPSP; el herbicida inhibe esta enzima, causando una acumulación de Shikimato que daña el tejido.	Glicinas: Glifosato, Sulfosato=glifosato, trimesio.
	Glutamina sintetasa (GS)	GS convierte ácido L-glutámico en ácido L-glutamina en presencia de amonio y ATP. El herbicida inhibe la unión del glutamato a GS, provocando una acumulación muy tóxica de amonio y causando rápido colapso celular.	Ácidos fosfínicos: Glufosinato de amonio, Bialafos = bilanafos.
Fotosíntesis	Inhibición del	Bloquean el flujo normal de la cadena de electrones fotosintética al unirse a la proteína D1 en el sitio de unión para Q _B	Bencimidazoles, biscalbamatos, triazinedionas, triazinas,

	fotosistema II	(plastoquinona); con esto la planta entra en muerte progresiva.	uracilos, ureas sustituidas, quinonas y hidroxibenzonitrilos.
	Secuestro de electrones en fotosistema I	Interactúan con la proteína PsaC, actúan como competidores para la ferredoxina en el flujo de electrones y se convierten en cationes monovalentes al recibir el electrón; el catión puede reducir el oxígeno a superóxido y el oxígeno activo (1O_2) puede reaccionar con el $2H^+$ para formar H_2O_2 , capaz de degradar las paredes celulares.	Bipiridilios: Diquat y Paraquat.
Biosíntesis de lípidos	De cadena corta	Inhiben a la acetil-CoA carboxilasa, evitando que catalice la reacción para la formación del Malonil CoA necesario para la elongación de los lípidos.	Ácido ariloxifenoxi alcanoico, ciclohexanediones y fenoxaprop-p-etil.
	De cadena larga	Inhibe el complejo de enzimas elongasas, que catalizan la elongación de las cadenas carbonadas de los ácidos grasos. Esto afecta la estructura y estabilidad de la membrana plasmática.	Tiocarbamatos, fosforoditioatos, benzofuranos, ácidos clorocarbónicos, acetamidas, y tetrazolinonas.
División Celular	Inhibidores de mitosis	Se unen con la tubulina, inhibiendo su polimerización y por lo tanto evitando una división celular correcta.	Dinitroanilinas, Piridinas, Fosforoamidas, Benzamidas y Ácidos bencenodioxibenzocarbónicos.
	Inhibidores de síntesis de pared celular	Se conoce el efecto, pero desconoce el mecanismo.	Carbamatos: Carbetamida, Cloroprofam y Profam.
Biosíntesis de carotenoides		Los carotenoides proporcionan protección contra la fotooxidación. Estos herbicidas inhiben a la fitoeno y fitoflueno desaturasa, la ciclación del licopeno para formar carotenos o a	Piridazinonas sustituidas, m-penoxibenzamidas, fluridona, difunona y 4-hidroxipiridinas y fitoflueno

		isopentenil pirofosfato isomerasa o a prenil transferasa.	desaturasa; el aminrol de aminotriazol; Clomazon.
Hormonales	Tipo auxina	Causan anomalías en el crecimiento y descoordinación del mismo; éstos afectan a plantas dicotiledóneas y son selectivos hacia gran parte de las gramíneas.	Ácidos Fenoxicarboxílicos: 2,4-D, 2,4-DB, 2,4-DP, MCPA y MCPB. Ácidos Benzoicos: Cloramben, TBA. Ácidos piridincarboxílicos: Clopiralid, Fluroxipir. Ácidos quinolincarboxílicos: Quinclorac, Quinmerac.
	Inhibidores de transporte de auxinas	Inhiben el flujo de auxinas desde las zonas productoras a las receptoras, causando la paralización del crecimiento en meristemas de raíces y pérdida del tropismo en éstas.	Ftalamatos Semicarbazones: Naptalam, Diflufenzopyr-Na.

Fuente: Elaborado a partir de Pileggi et al. (2020), Anzalone (2007) y Duke (1990)

2.2. Importancia de los herbicidas

Las malezas son especies vegetales que afectan el potencial productivo de la superficie ocupada por el hombre, causando pérdida del rendimiento agrícola por unidad de área cultivable o afectando la productividad de una empresa comercial (Jiménez, 2020; Mortimer, 1996). Compiten por nutrientes del suelo, agua, luz; dan sombra a los cultivos, funcionan como reservorio para otras plagas, algunos tienen lixiviados tóxicos para otras plantas y disminuyen la eficiencia de la fertilización. Las malezas son la principal plaga de los cultivos, lo cual hace a los herbicidas los plaguicidas más utilizados en el mundo (Jiménez, 2020; Mortimer, 1996).

Los herbicidas son una parte esencial de la agricultura comercial, evitan pérdidas de producción por hierbas, o pérdida de ganancias al tener que separar hierbas de producto deseado. México exporta anualmente 66.2 millones de dólares en herbicidas e importa 167 millones de dólares en ellos (Hausmann, 2019) y tan solo en el 2007 se estima que en el país se comercializaron 100,000 toneladas de plaguicidas, el equivalente al 4% del consumo mundial (García Hernández et al;

2018). Esto indica una demanda muy grande en el país, que no está siendo completamente satisfecha por la producción nacional.

La agricultura necesita apoyarse en herramientas para poder aumentar la cantidad y calidad en la producción, una muy importante son los herbicidas; éstos evitan que las hierbas disminuyan la producción o la calidad de la cosecha. En general, se estima que la pérdida directa de producción agrícola por malezas es del 10%, variando desde el 7% en Europa hasta el 16% en África (Pileggi et al. 2020; Mortimer, 1996). En la India, las pérdidas en cultivos de cacahuate por malezas se han estimado de 36%, 31% en soya, 25% en maíz y 19% en trigo (Chahuan, 2020); en Estados Unidos, se calculó que el promedio de pérdidas anuales por mal control de malezas en maíz era del 52% y del 49.5% en soya (Weed Science Society of America, 2021). Mientras tanto, en Pakistán, el control adecuado de hierbas puede aumentar la producción de granos hasta en un 37% (Khanh, 2008). Si bien, en países en desarrollo el margen de ganancias no es tan grande, aun así, es necesario el uso de herbicidas para mantener la rentabilidad de los cultivos.

Las principales malezas del mundo son: *Cyperus rotundus* L., *Cynodon dactylon* (L.) Pers, *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv., *Echinochloa colona* (L.), *Eleusine indica* (L.) Gaertn., *Sorghum halepense* (L.) Pers, *Imperata cylindrica* (L.) Raeuschel, *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, *Portulaca oleraceae* L., *Chenopodium album* L., *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop., *Convolvulus arvensis* L., *Avena fatua* L., *Amaranthus hybridus* L., *Amaranthus spinosus* L., *Cyperus esculentus* L., *Paspalum conjugatum* Berg. y *Rottboellia cochinchinensis*; de las cuales, 13 son monocotiledóneas (Weed Science Society of America, 2021b; Mortimer, 1996).

La *Brachiaria brizantha*, es una hierba perenne monocotiledónea, originaria de las zonas tropicales de África. Fue introducida a Brasil, donde se obtuvo el cultivar Marandú, también conocido como “Pasto Insurgente” (Veramin, 2016; Mena-Urbina et al. 2007). En México fue liberada para su



Figura 1. *Brachiaria brizantha* cv Marandú en campo.

distribución por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en la década de los ochentas y su importación al país aumentó de 63 toneladas métricas en 1990 a 2,047.6 toneladas métricas en 2003 (Mena-Urbina et al. 2007; Argel, 2006). Sus hojas pueden

llegar a los 1.4 m de altura, tiene resistencia a periodos prolongados de sequía y se adapta a suelos de mediana a alta fertilidad. Es utilizada como pasto y forraje (Veramin, 2016).

B. brizantha, al ser altamente productiva y haber sido seleccionada para adaptarse correctamente al clima tropical (Veramin, 2016; Mena-Urbina et al., 2007; Argel, 2006), es una potencial maleza si se establece en zonas utilizadas para la agricultura. Por lo cual se propone como modelo para otras malezas silvestres monocotiledóneas.

2.3. Translocación de herbicidas

Los herbicidas pueden transportarse dentro de las plantas por el sistema apoplástico constituido por el xilema, espacios intracelulares y paredes celulares; y por el sistema simplástico, formado por el floema.

Los herbicidas pueden ser “de contacto” o no translocables si su transporte es a distancias muy cortas, o sistémicos o translocables si pueden entrar en los sistemas de movimiento de sustancias a “grandes distancias” (Anzalone, 2007).

Tabla 3. Vías de translocación de herbicidas en las plantas.

Movilidad	Vía	Características	Ejemplos
Buena	Xilema	<ul style="list-style-type: none"> *Generalmente aplicados en suelo. *Movilización por transpiración. *Movimiento limitado por estrés hídrico. *La mayor translocación es por compuestos medianamente lipofílicos y no iónicos. 	Bentazón Carbamotioatos Carbamatos Cloroacetamidas Diclobenil Napropamide Norflurazon Pirazon TCA Triazinas Uracilos Ureas
	Floema	<ul style="list-style-type: none"> *Movimiento por gradiente de potencial. *Patrón de movimiento de fotosintatos. *Gran acumulación en frutos. *Compuestos acídicos en su mayoría. 	Glifosato

	Ambos	<ul style="list-style-type: none"> *Puede aplicarse en suelo o follaje. *Acidez media. *Afinidad media por lípidos. *Uso tanto en pre-emergencia como en post-emergencia temprana. 	<ul style="list-style-type: none"> Arseniacaes Asulam Clopiralid Dicamba Fosamine Imidazolinonas Piridinas
Limitada		<p>Posibles motivos:</p> <ul style="list-style-type: none"> *Sitio de acción cercano al área de contacto *Veloz acción fitotóxica, lo que destruye el tejido conductor. *Alta afinidad por los lípidos. *Baja solubilidad en agua. *Aplicaciones dirigidas, generando una selectividad posicional. 	<ul style="list-style-type: none"> Bromoxinil Oxadiazon Ariloxifenoxis Difenzoquat Fenoxiacéticos Diquat Naptalam Paraquat
Inmóvil			<ul style="list-style-type: none"> Bensulide DCPA Dinitroanilinas Difeniléteres

Fuente: Elaborado a partir de Anzalone (2007).

2.4. Efectos indeseables de los herbicidas. Enfermedades y contaminación

El uso tan extendido de los herbicidas está causando problemas ecológicos y resistencia de algunas plantas hacia los herbicidas. En estudios realizados en 1999 por U.S. Geological Survey en los ríos principales de Estados Unidos, se encontró que el 90% de las muestras de agua y peces contenían uno o más pesticidas, entre los cuales se identificaron 17 herbicidas, y en 16 de 84 medidas en manantiales de Brasil se encontró el herbicida Terbutilazina en concentraciones mayores al rango de agua potable (Laini et al., 2012; U.S. Geological Survey, 1999). En cuanto al suelo, el glifosato reduce el crecimiento y actividad de las bacterias fijadoras de nitrógeno, el 2,4-D reduce la fijación de nitrógeno por las bacterias en raíz de frijol e inhibe la transformación bacteriana de amonio a nitrato (Aktar, Sengupta y Chowdhury, 2009). A pesar de aumentar la

producción a corto plazo, todo esto afectaría el cultivo a largo plazo y a que el nitrógeno es un elemento fundamental para el crecimiento de las plantas, al ser necesaria la producción de proteínas y clorofila (Cárdenas-Navarro, Sánchez-Yáñez, Farías-Rodríguez y Peña-Cabriales, 2004).

Otros problemas causados por los herbicidas que se han estudiado son efectos en la salud humana. Se ha encontrado que los problemas más comunes en agricultores expuestos a herbicidas son alteraciones genéticas y disminución de calidad de semen, alteraciones en el perfil hormonal y mayor incidencia de abortos; en niños, deterioro en el desarrollo neuronal temprano, reducción significativa del índice de orientación espacial, disminución de energía y déficit de atención (García Hernández et al. 2018). En estudios *in vitro* se ha encontrado que la exposición a herbicidas puede causar estrés oxidativo, muerte celular, reducción de proliferación celular, daño al DNA, aberraciones cromosomales (Marin-Morales, Ventura- Camargo y Miyuki, 2013) y metilación del DNA (Kwiatkowska et al. 2017).

2.5. Resistencia a herbicidas

Los problemas económicos de los países pobres y la alta disponibilidad de las moléculas clásicas, por su bajo precio, ha generado un abuso en su empleo, por lo que se debe priorizar la búsqueda de nuevas moléculas con actividad herbicida. Como los herbicidas actúan sobre una enzima específica, muchas plantas adquieren resistencia por mutaciones de sustitución de aminoácidos; muchas mutaciones no mantienen la función de la enzima, aunque algunas si mantienen la función, pero con una disminución de la unión a los herbicidas; estas características pueden pasarse rápidamente a otras plantas por polinización cruzada (Powles y Yu, 2010). En un trabajo publicado por Heap en 2021, comentó que existen 522 especies de hierbas resistentes a herbicidas con mecanismo de acción ya bien caracterizado.

Aunque existen mecanismos de acción de herbicida distintos, a continuación, se enlistan los mecanismos de resistencia más comunes, tomados de Travios, De Prado, Chachalis y Bilalis (2020) y Powles y Yu (2010).

Resistencia a Herbicidas inhibidores de Triazina PSII: Globalmente, surgió una mutación puntual en el gen que codifica para la proteína D1, con una sustitución de aminoácidos a Ser-264-Gly en

el sitio de unión a la Plastoquinona (PQ). Con esta mutación no se inhibe el transporte de electrones del fotosistema II y continúa la producción de NADPH y ATP.

Resistencia a herbicidas inhibidores de acetolactato sintetasa (ALS): Para 2009 existían 22 mutaciones en 7 sitios distintos de ALS que confieren resistencia. ALS Pro-197 puede ser sustituido por His o Thr; la sustitución Pro-197 por Ser, puede conferir resistencia sin un gran impacto en la actividad de ALS; este mismo sitio puede ser sustituido por Ile, Lys, Met o Trp, pero requiere cambios en dos nucleótidos.

Resistencia a herbicidas inhibidores de Acetil-CoA carboxilasa: 36 especies de pastos han desarrollado esta resistencia. La mutación más común es Leu-1781-Ile en el dominio Carboxil transferasa (CT); la mutación Asp-2078-Gly da alta resistencia a ciertos herbicidas de este tipo (APP y CHD), pero baja resistencia al herbicida Cletodim (CHD). Las otras mutaciones existentes son Trp-1999-Cys, Trp-2027-Cys, Ile-2041-Asn, Ile-2041-Val, Cys-2088-Arg y Gly-2096-Ala.

Resistencia a glifosato: Para este hay mutación en sitio blanco del gen EPSPS y sin sitio blanco. El primer tipo puede darse por sustitución de serina, treonina o alanina en Pro-106-Ser en regiones altamente conservadas del gen EPSPS, esto causa un estrechamiento en la cavidad del sitio de unión de Glifosato-PEP. También se ha visto resistencia por sobreexpresión de EPSPS, hasta 100 veces en plantas altamente resistentes.

Resistencia a herbicidas inhibidores del ensamble de tubulina: En plantas con este mecanismo de resistencia, el gen que codifica a la α -tubulina, tiene una mutación de sustitución Thr-239-Ile; esto le confiere resistencia a herbicidas dinitroanilina y resistencia cruzada a herbicidas de fosforoamida y piridina, pero sensibilidad a algunos herbicidas de carbamato. Las mutaciones Met-268-Thr y Leu-136-Phe también le confieren resistencia a herbicidas dinitroanilina, pero a menor nivel. Esta resistencia es difícil que se herede, pues solo se hereda como gen recesivo nuclear individual y solo los organismos homocigotos sobreviven al herbicida.

Resistencia a herbicidas inhibidores de Protoporfirinógeno IX Oxidasa (PPO): Esta es la única resistencia a herbicidas a causa de una delección. El gen de PPO cloroplástica y mitocondrial hay una delección Gly-210 que confiere una alta resistencia a estos herbicidas, al afectar la afinidad de PPO por el protoporfirínogeno, pero también disminuye la actividad de la enzima.

Hay mecanismos de resistencia inespecíficos (sin una molécula blanco definida), los cuales favorecen una disminución en la cantidad de herbicida que llega al sitio activo de la planta. Estos pueden ser mediante: a) La disminución en la penetración del herbicida en la planta, b) La disminución de la tasa translocación del herbicida y c) El aumento en las tasas de secreción o metabolismo del herbicida. (Powles y Yu, 2010).

Citocromo P450 Monooxigenasas (P450s): Algunos P450 metabolizan ciertos herbicidas a productos con fitotoxicidad reducida o modificada para después inactivarlos por conjugación a glucosa y su posterior transporte a la vacuola.

Glutación S-Transferasas (GTS): Plantas con una GTS con mayor capacidad catalítica, posiblemente debido a una mutación, presentan mayor detoxificación de algunos herbicidas, se afecta la especificidad del sustrato a herbicidas y xenobióticos y en algunas, mitigan el estrés oxidativo.

Translocación restringida de herbicidas: La translocación del glifosato por el xilema y floema de la planta es importante para su toxicidad. Un mecanismo de resistencia es la translocación limitada y en otras plantas hay disminución de penetración de hojas.

El Paraquat entra por las hojas y pasa a cloroplastos, donde interrumpe el fotosistema I del transporte de electrones, reduciendo el oxígeno y dañando a los estados activos de oxígeno. Un mecanismo de resistencia es mejorar la actividad de las enzimas que detoxifican especies reactivas de oxígeno, así como la translocación restringida del Paraquat.

2.6. Xenobióticos y aleloquímicos

Los xenobióticos son sustancias ajenas a un cuerpo o ecosistema, pero con la habilidad de entrar en él, generalmente de síntesis química, aunque también se incluyen los aleloquímicos producidos de manera natural por las plantas. Estos no pueden ser metabolizados por las rutas bioquímicas de metabolismo intermediario, por lo cual su secreción es difícil (Vallero, 2016; Li, Schuler y Berenbaum, 2007). Los xenobióticos pueden tener estructuras químicas tan distintas a las de los compuestos naturales que su degradación por bacterias puede ser muy tardada y solo ser parcial, dejando sustancias químicas aún más tóxicas y difíciles de degradar que el compuesto original (Madigan, Martinko, Bender, Buckley y Stahl, 2015).

Los aleloquímicos son sustancias bioquímicas producidas por un organismo que tienen efecto benéfico o perjudicial en otro organismo blanco, puede ser en su crecimiento, supervivencia, desarrollo o reproducción. Estos aleloquímicos pueden ser metabolitos secundarios de plantas, o productos de la descomposición microbiana y pueden clasificarse en: ácidos orgánicos solubles en agua, cadenas lineales de alcoholes, aldehídos alifáticos, cetonas, lactonas simples insaturadas, ácidos grasos de cadena larga, poliacetilenos, benzoquinonas, antraquinonas, quinonas complejas, fenoles simples, ácido benzoico y sus derivados; ácido cinámico y sus derivados, cumarina, flavonoides, taninos, terpenoides y esteroides, aminoácidos, péptidos, alcaloides, cianohidrininas, sulfuro, glucosinolatos, purinas y nucleósidos. Pueden ser producidos por toda la planta, pero se liberan y producen principalmente en hojas y raíces (Peng, 2019; Gulzar y Siddiqui, 2017; Hou et al. 2016). Entre los efectos inhibidores de los compuestos aleloquímicos se encuentra la degradación del balance hormonal, que retrasa el crecimiento de la planta; reducción de la transferencia de materiales de almacenamiento y escasez de energía, que contribuyen a la disminución del crecimiento (Baziar, Farahvash, Mirshekari y Rashidi, 2014).

Como se mencionó previamente, la demanda de los herbicidas es muy grande, sin embargo, los efectos medioambientales y en salud también, por lo que algunos grupos de investigación se han dedicado a la búsqueda de extractos de plantas con propiedades herbicidas. Estas ya se han encontrado en algunas plantas, entre las que se encuentran la *Albizia procera*, *Delonix regia*, *Eucalyptus globulus* (Perveen et al. 2019; Puig, Reigosa, Valentão, Andrade y Pedrol, 2018), *Inula elenium L.* (Findura et al. 2020), *Lolium persicum*, *Sinapis arvensis* (Baziar et al. 2014), *Euphorbia heterophylla L.* (Elshamy, Abd-ElGawad, El Gendy y Assaeed, 2019) y *Euphorbia helioscopia* (Wang et al. 2015).

Por lo que los aleloquímicos pueden ser buenos sustitutos a los herbicidas sintéticos aun que debe ampliarse su estudio para conocer los efectos tóxicos y residuales, que debe ser revisado caso por caso, además, de su eficacia y especificidad (Cheng y Cheng, 2015).

2.7. Definición de germinación y establecimiento.

La germinación es un conjunto de mecanismos fisiológicos en las semillas que comienza con la imbibición de las mismas, termina con la rotura de las cubiertas seminales y elongación de la

radícula de acuerdo al criterio fisiológico, pero abarca hasta la emergencia sobre tierra y desarrollo de una plántula normal de acuerdo al criterio agronómico. En laboratorio es común utilizar el criterio fisiológico (ISTA, 2016; Pérez y Pita, 1998). En plantas cultivadas a partir de semilla, se considera que su establecimiento comienza con la siembra de la semilla y termina con la aparición de las primeras hojas verdaderas, la cantidad de hojas a tomar en cuenta y el tiempo que dura esta etapa depende de la especie (ISTA, 2016; Dumroese, Jacobs y Wilkinson, 2012).

3. ANTECEDENTES

3.1. Alelopatía en plantas

Se ha reportado actividad herbicida en plantas pertenecientes a la familia Magnoliopsida, (Findura et al., 2020; Perveen et al., 2019), a la subclase subclase Rosidae (Perveen et al., 2019; Puig et al., 2018; Chon et al., 2002) y al orden Malpighiales, mismos a la que pertenece *B. crassifolia* (Elshamy et al., 2019; Wang, Wang, Feng, Yuan y Zhu, 2015; Kowthar, El-Rokiek, Rawia y Taha, 2011). De éstas, se reportó que disminuyen el porcentaje de germinación (Findura et al., 2020; Elshamy et al., 2019; Perveen et al., 2019; Wang et al., 2015), la longitud de la raíz principal (Elshamy et al., 2019; Perveen et al., 2019; Wang et al., 2015; Chon et al., 2002), la longitud del ápice (Elshamy et al., 2019; Perveen et al., 2019; Kowthar et al., 2011), el peso seco de planta (Perveen et al., 2019) y el peso seco de la semilla (Wang et al., 2015) de como *Cenchrus echinatus*, *Echinochloa crus-galli* y *Echinochloa colonum*, las cuales son de la misma tribu que el modelo de malezas utilizado en este estudio, *B. Brizantha*.

3.2. *Medicago sativa* (Alfalfa)

Se ha reportado también que el extracto acuoso de hojas de *M. sativa* afecta significativamente la longitud de la raíz y la diferenciación morfológica de ellas, causando alelopatía en *Echinochloa crus-galli*, perteneciente a la familia poáceas al igual que *B. brizantha* y autotoxicidad y a que inhibe el crecimiento de la propia *M. sativa* (Chon et al. 2002; Chung y Miller, 1995). En otro estudio se reportó que el extracto etanólico de hoja de *M. sativa* inhibe el crecimiento de callos de *Digitaria ciliaris*, *Chenopodium album*, *Amaranthus lividus*, *Portulaca oleracea* y *Commelina communis*. (Ghimire et al. 2019).

3.3. *Byrsonima crassifolia* (Nanche)

El nanche es un árbol presente en las zonas tropicales y subtropicales de México, por lo tanto, se encuentra en el municipio de Tuxtepec. Su copa es amplia, es perene y sus hojas no tienen utilidad industrial, solo sus frutos (Avilés-Peraza, 2015). Ya ha sido reportada una amplia gama de actividades biológicas de éste y tiene aplicaciones en la medicina tradicional, lo que sugiere que podría tener otras propiedades no reportadas aún.

La corteza, hojas y ramas del *B. crassifolia* son utilizadas en la medicina tradicional de México y Guatemala para tratar diarrea, mordeduras de serpiente, infecciones de la piel, gastrointestinales y de vías respiratorias, cicatrizar úlceras, entre otras (Medina-Torres, Ortíz-Catón y Valdivia-Bernal, 2012). Se ha demostrado la alta capacidad antioxidante de extractos de fruto, en la que se encontraron polifenoles y flavonoides en extractos crudos y se identificó ácido gálico, catequina y quercetina (Roldan-Sabino, 2018; Moreno, Díaz y Álvarez, 2015). La fruta contiene ácido ascórbico, antocianinas y carotenoides todos estos compuestos están relacionados con la actividad antioxidante y se encontraron en altas concentraciones en relación a otras frutas tropicales (Moo-Huchin et al. 2014).

En un trabajo no publicado de Hernández López et al se observó que bajo la copa del *Byrsonima crassifolia* existe una disminución en el número y porte de la población de malezas, lo cual se corroboró por cuestionamiento directo con algunos productores de la región, quienes adicionalmente comentaron que las hojas secretaban compuestos del tipo “brea”, por lo cual es de interés determinar si en sus hojas se acumulan compuestos con propiedades herbicidas no reportadas.

4. JUSTIFICACIÓN

Los herbicidas son una parte esencial de la agricultura comercial. Evitan pérdidas de producción por hierbas, o pérdida de ganancias al tener que separar hierbas de producto deseado. También tienen una gran importancia económica. Sin embargo, los herbicidas también son causantes de problemas ambientales, afectan tanto suelo como agua (Aktar et al. 2009). Además, están relacionados con enfermedades en humanos de tipo genético y hormonal (García Hernández et al. 2018). No se han descubierto nuevos mecanismos de acción de herbicidas en más de 20 años y las antiguas moléculas ya generaron resistencia en las malezas (Heap, 2021), por lo cual es importante la búsqueda nuevos compuestos con propiedades herbicidas a los cuales las malezas actuales no tengan resistencia, causen menos problemas ambientales y de salud. En este sentido, se han encontrado compuestos con efectos herbicidas en plantas (Findura et al. 2020; Perveen et al. 2019; Puig et al. 2018). Experiencias empíricas describen que *B. crassifolia* disminuye el crecimiento en plantas vecinas, por lo que es de interés estudiar sus propiedades herbicidas.

5. HIPÓTESIS

Al menos un extracto de hojas de nanche (*Byrsonima crassifolia*), obtenido con disolventes de distintas polaridades, tendrá propiedades herbicidas sobre *Brachiaria brizantha*.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo principal

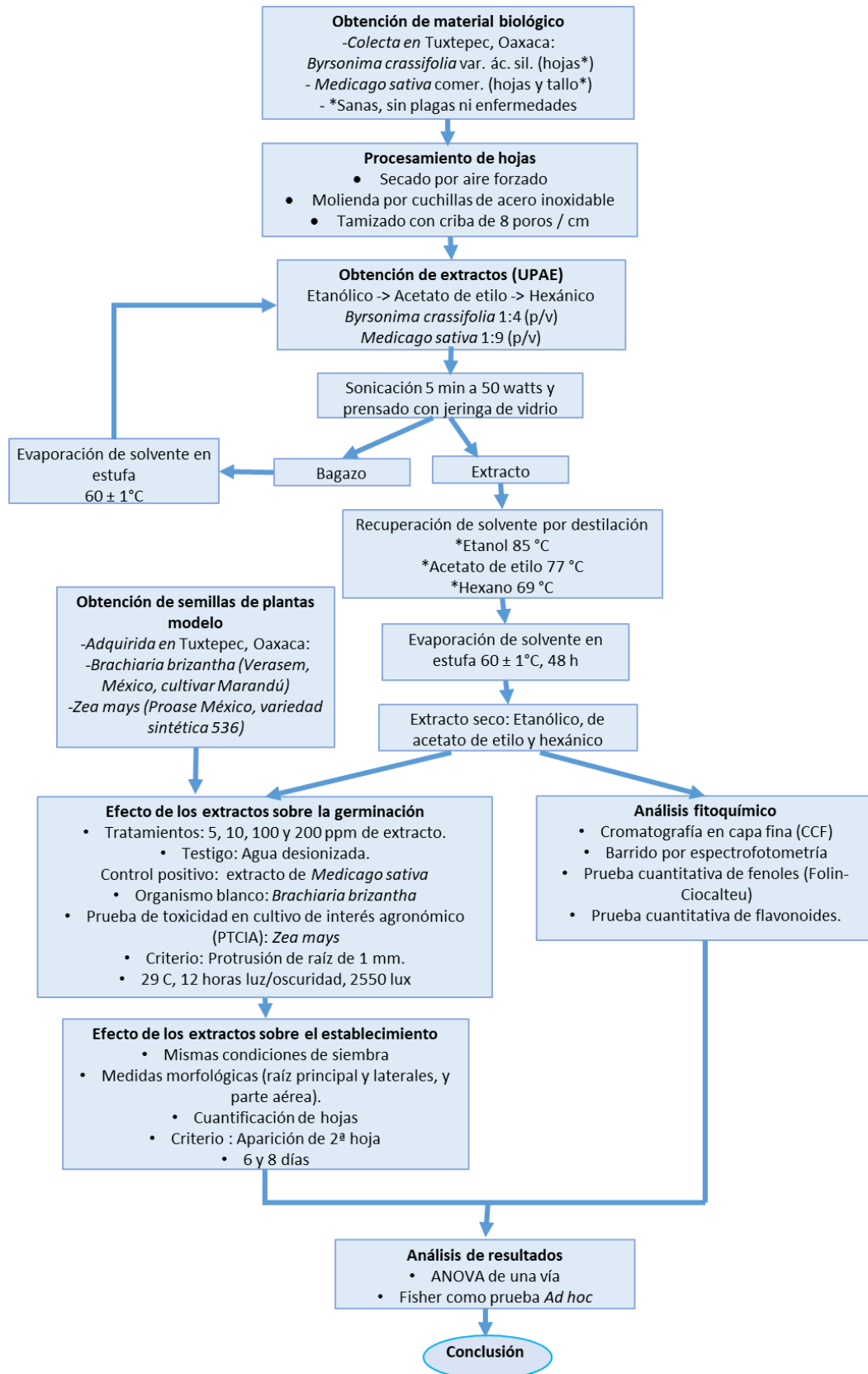
Estudiar la actividad herbicida de extractos de hojas de *Byrsonima crassifolia* con disolventes de diferente polaridad utilizando *Brachiaria brizantha* como modelo.

6.2. Objetivos secundarios

- Obtener extractos de hojas de *Byrsonima crassifolia* y *Medicago sativa* (Control positivo) con disolventes de diferente polaridad mediante el método UPAE.
- Probar el efecto de los diferentes extractos sobre la germinación de *Brachiaria brizantha* y *Zea mays*.
- Probar el efecto de los diferentes extractos sobre el establecimiento de *Brachiaria brizantha* y *Zea mays*.
- Realizar pruebas fitoquímicas de los extractos de *Byrsonima crassifolia* para caracterizarlos parcialmente.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 2. Diagrama de flujo de estrategia experimental seguida en este trabajo.



7.1. Material biológico

Las hojas de árboles de *Byrsonima crassifolia*, variedad fruto ácido fueron colectadas en las inmediaciones de la colonia Universidad en Tuxtepec, Oaxaca, con coordenadas 18°00'5"N, 96°09'5 W. Se separaron las hojas que presentaron anomalías de color, manchas, lo cual puede indicar presencia de hongos, o daño por insectos. Para *Medicago sativa* (Alfalfa) Se adquirieron plantas frescas en una verdulería en Tuxtepec, Oaxaca. Se utilizaron hojas y tallos en buen estado y se desecharon los dañados.

7.2. Procesamiento de hojas

El material biológico se procesó de acuerdo a Roldan-Sabino et al (2018). Una vez obtenido, se secó con aire forzado con un flujo de aire de 0.0103 m³/s durante 48 horas a 33±2 °C. Se molió con cuchillas de acero inoxidable hasta obtener harina, la cual se tamizó usando una criba de 8 poros/cm, pesó y se etiquetó. En el caso de la *Medicago sativa*, la harina se mezcló con el bagazo de tallo sobrante.

7.3. Obtención de extractos (UPAE)

Los extractos se obtuvieron por el método UPAE (Extracción por solventes asistida por ultrasonido y prensado) de acuerdo a Roldan-Sabino et al. (2018)

La extracción se realizó de manera secuencial en el siguiente orden: Etanol-Acetato de etilo-Hexano. Se mezclaron harina de hojas y etanol al 96% en una proporción 1:4 (p/v) para *Byrsonima crassifolia* y una proporción 1:9 (p/v) para *Medicago sativa*. Todas las extracciones se hicieron por triplicado. Se sonicó por 5 minutos a 50 watts en una tina ultrasonicadora. La harina sonicada se prensó y colectó el extracto. El bagazo se recuperó y se dejó secar a 60 ± 1°C por 48 horas, antes de agregar el siguiente solvente. Del extracto obtenido, se destiló el solvente, con un kit de destilación simple y secó a 60 ± 1°C por 48 horas. Las destilaciones se hicieron de acuerdo al punto de ebullición de los solventes, manteniendo la temperatura constante: 85°C para etanol, 77°C para acetato de etilo y 69°C para hexano. El extracto se dejó secar a 60 ± 1°C por 48 horas en una estufa.

Se obtuvo el rendimiento por medio de la ecuación 7.3.1:

$$R = (Mf \times 100) / Mi \quad \text{Ec.7.3.1}$$

Donde:

R es el rendimiento

Mf es la masa final en gramos

Mi es la masa inicial en gramos

7.4. Obtención de semillas de plantas modelo

Las semillas de *Brachiaria brizantha* (Verasem, México, cultivar Marandú) y *Zea mays* (Proase México, variedad sintética 536) se adquirieron en la ciudad de Tuxtepec, Oaxaca. Las semillas de *Brachiaria brizantha*, de acuerdo a las especificaciones de la empresa, reportaron una pureza del 94%, viabilidad del 80% y valor cultural del 75%. Las semillas de *Zea mays* tenían una viabilidad culada de 96.05% y valor cultural de 96.05% con datos experimentales, utilizando la ecuación 7.4.1.

$$\text{Valor cultural} = \frac{\% \text{ pureza} \times \% \text{ germinación máxima}}{100} \quad \text{Ec.7.4.1}$$

7.5. Prueba de efecto sobre germinación

Para evaluar el efecto de los extractos de *B. crassifolia* en la germinación se utilizaron semillas del pasto *Brachiaria brizantha* como un modelo de maleza y al que se consideró el organismo blanco. Posteriormente, se evaluó el efecto de los extractos sobre semillas *Zea mays* a fin de probar su toxicidad en cultivo de interés agronómico (PTCIA). Para ambas plantas, se utilizó agua desionizada como Testigo y diferentes concentraciones de extractos de *Medicago sativa* como Control positivo, ya que se ha reportado que sus extractos polares, los etanólicos y acuosos, disminuyen la longitud de raíz, afectan la diferenciación morfológica, crecimiento de callo o causan autotoxicidad en plantas pertenecientes a la misma subclase que *B. brizantha* (Chon et al., 2002; Chung y Miller, 1995) o familia (Ghimire et al., 2019; Chon et al., 2002). Todos los tratamientos se hicieron con $n \geq 60$.

7.5.1. Preparación de extractos

Se prepararon disoluciones madre de extracto etanólico, hexánico o de acetato de etilo, dispersando el extracto seco para obtener una concentración de 1 mg/mL en agua desionizada mediante sonicación por 30 minutos a 50 watts, y se usaron inmediatamente. Posteriormente, se prepararon disoluciones en agua desionizada con las siguientes concentraciones: 5, 10, 100 y 200 ppm de extracto. Las disoluciones fueron usadas inmediatamente.

7.5.2. Efectos de los extractos sobre la germinación

Se prepararon soluciones madre de extractos de *B. crassifolia* a 1 mg/mL, para después obtener soluciones a 5, 10, 100 y 200 ppm de extracto, utilizando la solución madre y agua desionizada. La siembra en caja se realizó de acuerdo a Hernández-López et al. (2018) con modificaciones. Para el Control positivo se utilizaron las mismas concentraciones utilizadas con el extracto de *B. crassifolia*, pero con extractos de *M. sativa*.

Se colocaron 2 capas de papel de estraza blanco en el fondo de una caja Petri de 10 cm de diámetro. Se agregaron 7 mL de la solución correspondiente, en las cajas para semillas de *Zea mays* y 7.5 mL de solución en las cajas para semillas de *Brachiaria brizantha*, después, se distribuyeron 20 semillas con el embrión sobre el papel húmedo. Posteriormente, se colocó un círculo de tela sobre las semillas, se selló con una película plástica, se cerró con su tapa, etiquetó e incubó a $29 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta el máximo de germinación, con 12 horas de luz/oscuridad y 2550 lux.

Se verificó la germinación de cada caja, a las 24, 30, 48 y 72 horas de imbibición para *Zea mays* y cada 24 horas hasta el día 8 en *Brachiaria brizantha*. Con estos datos se calcularon los parámetros de germinación indicados en la siguiente Tabla:

Tabla 4. Ecuaciones utilizadas para los parámetros de germinación evaluados.

Parámetro	Ecuación	Referencia
Germinación máxima*	$GM\% = \frac{nFRP}{n} \times 100$ <p>Donde: GM%= Germinación máxima o porcentaje total acumulado de germinación nFRP= número final de raíces protruidas con más de 1 mm de longitud n= número de semillas utilizadas por repetición</p>	Modificado de Hernández-López et al. (2018)

Tasa de inhibición (TI)	$TI = \frac{(C - T)}{T} \times 100$ <p>Donde: C = Valor medio ó promedio de la germinación máxima del Testigo T= Valor medio ó promedio de la germinación máxima en el tratamiento que se evalúa</p>	Modificado de Peng (2019)
Velocidad de germinación	$\text{Velocidad de germinación}^{**} = \frac{G_{50} - G_i}{mG}$ <p>Donde: Velocidad de germinación= Tiempo de germinación 50 G₅₀= Número de semillas para germinación 50 G_i= Número de semillas germinadas a tiempo inicial mG= Pendiente de germinación</p>	

*El criterio de inclusión para la germinación es de 1 mm de raíz principal.

**La velocidad de germinación, calculado como el tiempo de germinación 50, representa el tiempo en el que el 50% de las semillas germinaron. Se calculó obteniendo la ecuación de la recta a partir de una gráfica de dispersión en la que se graficó tiempo en X y porcentaje de germinación en Y y la ecuación se utilizó para obtener la pendiente.

7.6. Efecto de los extractos sobre el establecimiento

Alcanzado el 50% de la germinación, las semillas se trasplantaron a contenedor plástico con una cantidad adecuada de tierra preparada para macetas (Garden's®). Para ello, se mezclaron triplicados de cajas de cada tratamiento y se tomaron 20 semillas completamente al azar. Las semillas se regaron diariamente con volúmenes constantes de agua.

Se registró diariamente el número de hojas de cada planta, durante 6 y 8 días, para *Z. mays* y *B. brizantha*, respectivamente. A tiempo final, las plantas se extrajeron del sustrato y se midió la parte aérea, la raíz principal y se cuantificaron el número de raíces secundarias.

Con estos datos se calcularon los parámetros de establecimiento indicados en la Tabla 5.

Tabla 5. Ecuaciones utilizadas para los parámetros de establecimiento evaluados.

Parámetro	Ecuación	Referencia
Establecimiento máximo (%) *	$EstMax(\%) = \frac{\text{Número de plántulas establecidas}}{\text{Número de semillas sembradas}} \times 10$	
Velocidad de establecimiento	$TEst_{50}^{**} = \frac{Est_{50} - Est_l}{mEst}$ <p>Donde: TEst₅₀= Tiempo de establecimiento 50 Est₅₀= Número de plántulas para establecimiento 50</p>	

	EstI= Número de plántulas establecidas a tiempo inicial mEst= Pendiente de la curva establecimiento	
Longitud máxima de la raíz principal	$LMRP = \frac{\Sigma RP}{n}$ <p>Donde: LMRP= Longitud máxima de la raíz principal ΣRP= suma de la longitud de la raíz principal a día final n= número de semillas con al menos 1 mm de longitud de raíz principal saliente</p>	Modificada de Hernández-López et al. (2018)
Longitud máxima de la raíz lateral más larga	$LMRL = \frac{\Sigma RL}{n}$ <p>Donde: LMRL= Longitud máxima de la raíz lateral más larga ΣRL= suma de la longitud de la raíz lateral más larga a día final n= número de semillas con al menos una raíz lateral</p>	Modificada de Hernández-López et al. (2018)
Longitud máxima de la parte aérea	$LMPA = \frac{\Sigma AL}{n}$ <p>Donde: LMPA= Longitud máxima de la parte aérea. ΣAL= suma de la longitud de la parte aérea a día fina. n= número de plántulas con al menos 1 mm de longitud de parte aérea saliente</p>	Modificada de Hernández-López et al. (2018)
Velocidad de crecimiento de raíz principal	$TCRP_{50}^{***} = \frac{CRP_{50} - CRPI}{mCRP}$ <p>Donde: TCRP₅₀= Tiempo de crecimiento 50 de raíz principal CRP₅₀= valor de referencia**** CRPI= Longitud de raíz principal en Testigo a tiempo inicial mCRP= Pendiente de longitud de raíz</p>	
Velocidad de crecimiento de raíz lateral más larga	$TCRL_{50}^{***} = \frac{CRL_{50} - CRLI}{mCRL}$ <p>Donde: TCRL₅₀***= Tiempo de crecimiento 50 de raíz lateral más larga CRL₅₀= valor de referencia**** CRLI= Longitud de raíz lateral más larga en Testigo a tiempo inicial mCRL= Pendiente de longitud de raíz lateral más larga</p>	
Velocidad de crecimiento de parte aérea	$TCA_{50}^{***} = \frac{CA_{50} - CAI}{mCA}$ <p>Donde: TCA₅₀***= Tiempo de crecimiento 50 de parte aérea CA₅₀= valor de referencia**** CAI= Longitud de parte aérea en Testigo a tiempo inicial mCA= Pendiente de longitud de parte aérea</p>	

*El criterio de inclusión para establecimiento fue la aparición de 2 o más hojas.

** La velocidad de establecimiento, calculado como el tiempo de establecimiento 50, representa el tiempo en el que el 50% de las plántulas se establecieron. Se calculó obteniendo la ecuación de la recta a partir de una gráfica de dispersión en la que se graficó tiempo en X y porcentaje de establecimiento en Y y la ecuación se utilizó para obtener la pendiente.

***Tiempo en el que las raíces o la parte aérea de las semillas de cada tratamiento alcanzan el 50 % de la longitud máxima promedio del Testigo.

***Valor de referencia fue la longitud máxima del Testigo al tiempo final de medida dividido entre 2.

7.7. Análisis de resultados

Todos los resultados de cuantificación de germinación, establecimiento y medidas morfológicas fueron analizados con una Prueba de ANOVA de una sola vía, con $P < 0.05$ utilizando a Fisher como prueba *ad hoc*. Con Minitab 17.

7.8. Análisis fitoquímico

7.8.1. Determinación de flavonoides por Cromatografía en capa fina (TCL).

Se realizaron cromatografías en capa fina a las mismas condiciones que Roldan-Sabino (2019). Se prepararon placas de cromatografía de 2.5 x 4 cm y una fase móvil *ad hoc* de flavonoides con acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:26). En una placa se cargó 1 μL de solución de extracto de etanólico disuelto en etanol a concentraciones de 5, 2.5 y 1.665 mg/mL, separados por 0.5 cm entre cada carga. Se realizó una cromatografía con la fase móvil *ad hoc* de flavonoides en la que se cargaron 2 μL de extracto a una concentración de 10 mg/mL. En el primer carril se cargó quercetina, en el segundo extracto de nanche, el tercero extracto de *M. sativa* y en el cuarto cumarina; se realizó con extractos etanólicos.

Se realizó un análisis de imagen por ImageJ para normalizar la potencia de cada una de las extracciones. También se utilizó para calcular el R_f de las bandas encontradas la ecuación 7.7.1.1 y Figura 3.

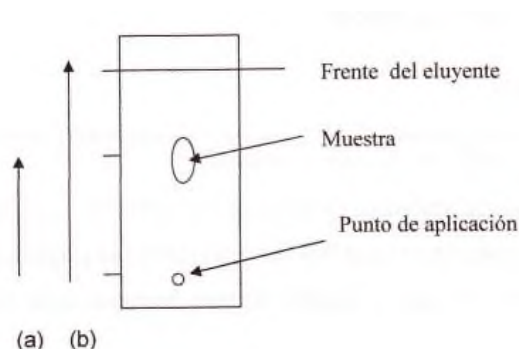


Figura 3. Esquema de sistema de cromatografía líquida en capa fina.

$$R_f (\text{Longitud recorrida}) = a / b \quad \text{Ec.7.7.1.1}$$

Donde

(a) = distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación.

(b)= es la distancia que recorre la fase móvil desde el punto de aplicación hasta el frente del eluyente.

7.8.2. Barrido de extractos por espectrofotometría

Se realizó un pool con todos los extractos obtenidos con el mismo solvente y se secaron a peso constante. De cada uno se hizo una dilución en su solvente de origen, a 0.1 mg/mL. Y se utilizó como blanco el solvente de origen de cada uno. Se utilizaron como estándares, quercetina, atropina, cafeína y cumarina a 0.1 mg/mL, en el solvente de origen de cada extracto.

Se leyó la absorbancia en un espectro UV de 350 a 1020 nm, de 10 en 10 nm, se restó la absorbancia del blanco a las absorbancias de los extractos y de los estándares. Para obtener los perfiles se graficó en Excel con una gráfica de dispersión la absorbancia obtenida contra la longitud de onda a la que se leyó.

7.8.3. Cuantificación de fenoles totales (Folin-Ciocalteu)

Se determinó el contenido de fenoles totales de acuerdo a Rios de Souza et al., (2012).

Se realizó una curva de calibración de ácido gálico a partir de una solución madre de 1 mg/mL, con un volumen final de reacción de 2 mL, graficando la absorbancia obtenida a 750 nm contra la concentración de ácido gálico en $\mu\text{g/mL}$ (Anexo Figura A).

Cada extracto se disolvió a una concentración final de 1 mg/mL en su solvente de origen. A 0.2 mL de extracto disuelto se le agregó 1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu al 10% (v/v) y 0.8 mL de Na_2CO_3 al 20% (p/v). Como blanco, se utilizó la mezcla de reacción, sustituyendo los 0.2 mL de muestra por el solvente en que se preparó la solución madre. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se midió la absorbancia de la mezcla de reacción a 750 nm, se utilizó el solvente respectivo de cada extracto como blanco. Los resultados fueron expresados como μg equivalente de ácido gálico por mg de extracto seco ($\mu\text{g GAE/mg}$ de ES).

7.8.4. Cuantificación de flavonoides totales

Se realizó una curva de calibración de quercetina a partir de una solución madre de 1 mg/mL graficando la absorbancia obtenida contra la concentración de quercetina en µg/mL (Anexo, Figura C). Para esto se preparó la mezcla de reacción: 0.25 mL de la solución que se va a leer, 0.75 mL de etanol al 95%, 0.05 mL de AlCl₃ al 10 %, 0.05 mL de solución 1 M de acetato de potasio y 1.4 mL de agua desionizada.

La mezcla se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente y se leyó su absorbancia a 415 nm.

Para la lectura de extracto etanólico se preparó una solución a 1 mg/mL en etanol, el extracto obtenido con acetato de etilo a 10 mg/mL en acetato de etilo y se disolvió a 1:10 en metanol, solvente adecuado por su polaridad para retener flavonoides. Para el extracto hexánico se preparó 1 mL de solución a 1 mg/mL en hexano, se añadieron 300 µL de metanol, se agitaron y se dejó reposar hasta la separación de fases, de la cual se recuperó la metanólica, en la cual se encontrarían los flavonoides. Los extractos se leyeron con la misma mezcla de reacción y se reportaron en µg de equivalentes de quercetina por mililitro de reacción (EQ/mL).

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.1. Obtención de extractos (UPAE)

Como se observa en la Tabla 6, los extractos de *Byrsonima crassifolia* y *Medicago sativa* mostraron la misma tendencia a disminuir el rendimiento de sólidos con la disminución de polaridad del solvente. El rendimiento de la extracción etanólica de *Byrsonima crassifolia* fue mayor en un 220.45% a la de *Medicago sativa*, pero las extracciones de acetato de etilo y hexano no mostraron diferencia significativa entre ellas. Esto podría deberse a que en la extracción de *Byrsonima crassifolia* se usaron únicamente de hojas y para *Medicago sativa* se usaron hojas mezcladas con tallo y por lo tanto las hojas tengan mayor concentración de compuestos polares que el tallo.

Tabla 6. Rendimiento de extracciones de *B. crassifolia* y *M. sativa* con diferentes solventes, con n≥3.

Planta de origen	Solvente utilizado	Rendimiento (%)*
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Etanol	7.76 ± 3.77 ^A
	Acetato de etilo	0.84 ± 0.31 ^C
	Hexano	0.17 ± 0.09 ^D
<i>Medicago sativa</i>	Etanol	3.52 ± 1.02 ^B
	Acetato de etilo	0.87 ± 0.18 ^C
	Hexano	0.21 ± 0.07 ^D

*Porcentaje calculado con respecto a 4g de harina. Letras diferentes indican diferencias significativas en el rendimiento.

8.2. Efecto de los extractos de *Byrsonima crassifolia* y *Medicago sativa* sobre la germinación de *Brachiaria brizantha*.

En el presente estudio, se determinó el efecto de diferentes concentraciones: 0 (Testigo), 5,10, 100 y 200 ppm de extractos de diferente polaridad de hoja de *Byrsonima crassifolia* sobre la germinación de semillas de un modelo de maleza, el pasto *Brachiaria brizantha* (organismo blanco). Se utilizó el extracto de *Medicago sativa* a las mismas concentraciones como Control positivo. Cada tratamiento se comparó con su respectivo Testigo, y al comparar entre extracto de *B. crassifolia* y *M. sativa*, se utilizaron porcentajes, normalizando con el Testigo. Los resultados se muestran a continuación.

8.2.1. Efecto del extracto etanólico sobre la germinación de *B. brizantha*

En la Figura 4a, se muestra que todas las concentraciones del extracto etanólico de *B. crassifolia*, tiene un efecto negativo sobre la germinación de semillas de *B. brizantha*, con respecto al Testigo, partir del día dos y no se repusieron al final de la observación (día 8), aunque tampoco mostraron un comportamiento dependiente de la concentración ($P>0.05$).

En contraste, el extracto etanólico de *M. sativa* (Figura 4b), disminuye significativamente el porcentaje de germinación de *B. brizantha* con todas las concentraciones utilizadas, únicamente al día 2. Sin embargo, a partir del día 3, los porcentajes de germinación se recuperaron y se observa una tendencia a igualarse con los valores del Testigo. Dicha tendencia, se mantiene hasta el día final (día 8), donde no observó diferencia significativa entre ningún tratamiento y el Testigo, excepto para la concentración de 5 ppm, la cual disminuyó significativamente el porcentaje de germinación desde el día 2 hasta el día 7, para el día 8, la desviación estándar del Testigo y el resto de las concentraciones es muy grande para mostrar diferencias significativas.

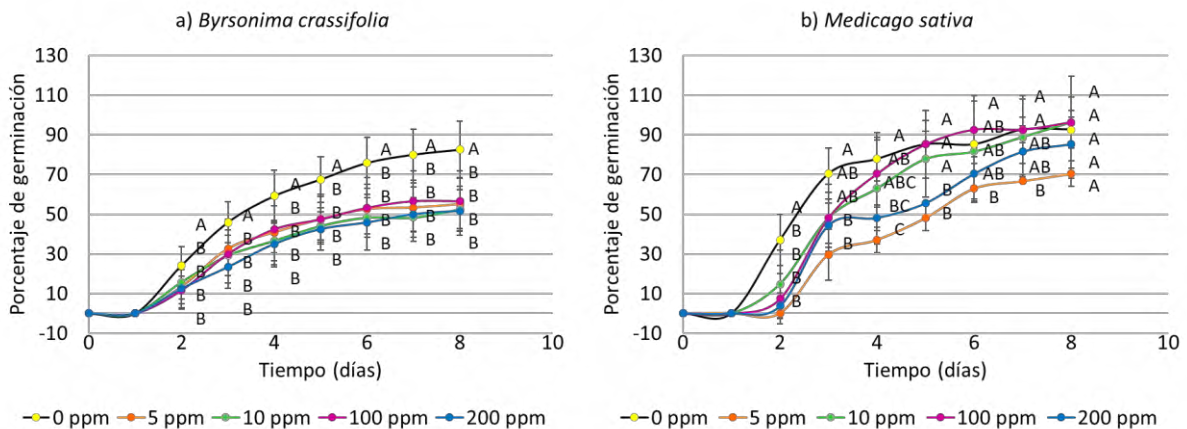


Figura 4. Efecto de diferentes concentraciones de extracto etanólico de *B. crassifolia* (a), y *M. sativa* (b) sobre el porcentaje de germinación diaria de semillas de *B. brizantha* (Organismo diana). Se observa que todos los tratamientos de *B. crassifolia* disminuyeron significativamente ($P<0.05$) el porcentaje de germinación con respecto al Testigo (-●-). Para *M. sativa*, 5 ppm disminuyó significativamente la germinación desde el día 2 hasta el día 7. Letra A significativamente mayor, letras distintas indican diferencias significativas con Fisher, $n \geq 60$.

En la Tabla 7, se muestran los parámetros de germinación al día final (día 8) de tratamiento tanto con *B. crassifolia* como *B. brizantha* y se puede observar que, todas las concentraciones del extracto de *B. crassifolia* utilizadas, disminuyeron el porcentaje de germinación máxima,

aumentaron la tasa de inhibición y disminuyeron la velocidad de germinación (calculada como tiempo de germinación 50), con respecto al Testigo. Aunque, no existen diferencias significativas entre las concentraciones de 5, 10, 100 y 200 ppm ($P>0.05$), los promedios más bajos de germinación se presentaron con 10 y 200 ppm, seguido por 5 ppm y finalmente 100 ppm.

Se evaluó *M. sativa* como control positivo, ya que como se mencionó previamente en antecedentes, la bibliografía lo reporta como un inhibidor alelopático, sin embargo, en nuestro caso se encontraron efectos desiguales en los parámetros evaluados.

En el caso de los extractos etanólicos de *M. sativa*, se observa que no tienen un efecto sobre la germinación máxima, ni en la tasa de inhibición, pero disminuyen la velocidad de germinación con las concentraciones 5 y 200 ppm. En el caso del extracto de *M. sativa*, se recuperó el porcentaje de germinación máxima en día 8, lo cual no ocurre con el extracto de *B. crassifolia* con estas mismas semillas, como se mostró en la Figura 4.

Esto sugiere que, *B. brizantha* es más sensible al extracto etanólico de *B. crassifolia*, que al extracto etanólico de *M. sativa* a la inhibición de la germinación máxima.

Tabla 7. Cuadro comparativo de los parámetros de germinación de semillas de *B. brizantha* (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto etanólico *B. crassifolia* o *M. sativa* evaluados en el tiempo final (día 8).

Concentración (ppm)	<i>Byrsonima crassifolia</i>			<i>Medicago sativa</i>		
	Germinación máxima (%)	Velocidad de germinación (días)**	Tasa de inhibición (%)	Germinación máxima (%)	Velocidad de germinación (días)**	Tasa de inhibición (%)
0	85.7 ± 11.8	4.2 ± 0.8	0 ± 13.8	92.6 ± 6.42	2.9 ± 0.8	0 ± 6.9
5	55 ± 13.2 *	6.5 ± 1.9 *	35.8 ± 15.4 *	70.4 ± 6.4	5.6 ± 0.5 *	24 ± 6.9
10	52.5 ± 9.7 *	6.9 ± 1.4 *	38.8 ± 11.3 *	96.3 ± 23.1	3.7 ± 1.4	-4 ± 25
100	56.7 ± 15.1 *	6.6 ± 1.6 *	33.9 ± 17.6 *	96.3 ± 12.8	3.4 ± 1.3	-4 ± 13.9
200	51.7 ± 15.2 *	7.2 ± 1.9 *	39.7 ± 14.3 *	85.2 ± 17	4.7 ± 0.7 *	8 ± 18.3

* Indica diferencias significativas respecto al Testigo, con Fisher, ($p<0.05$)

** Obtenida a partir del tiempo de germinación 50, como se indica en la Tabla 4.

Los resultados obtenidos en este estudio, se compararon con lo reportado previamente por otros autores, en los que extractos de plantas del mismo orden que *B. crassifolia* (Malpighiales)

disminuyeron la germinación de plantas monocotiledóneas de la tribu Paniceae, misma a la que pertenece *B. brizantha* (Elshamy et al., 2019; Wang et al., 2015). Los valores de inhibición de la germinación máxima de este trabajo, son menores a los reportado por Elshamy et al. (2019), donde se alcanzó una inhibición del 93.95%, pero la comparación es complicada debido a que, la concentración utilizada en el experimento se reporta como $\mu\text{L/L}$ de aceites esenciales, sin embargo, suponiendo que los aceites esenciales obtenidos por el autor tengan una densidad similar a la de otros aceites, generalmente cercana a la del agua, de 0.88-0.96 g/mL (Chávez, Coronado y Espinoza, 2014; Ochoa, Paredes, Bejarano y Silva, 2012), se podría inferir que la concentración aproximada fue de 100 ppm, la cual, se encuentra entre el rango de las concentraciones utilizadas en el presente estudio. Por otro lado, al ser un aceite esencial en lugar de un extracto, los grupos de compuestos obtenidos pueden ser distintos, tales como compuestos volátiles (Elshamy et al., 2019) a los cuales podría deberse su actividad. Si se compara con los reportes sobre plantas dicotiledóneas, el porcentaje máximo fue similar al obtenido por Perveen et al. (2019), donde obtuvieron uno de 50% respecto al Testigo en *Lepidium sativum*, pero son concentraciones superiores a las utilizadas en este trabajo, de 7,500 ppm y 10,000 ppm; sin embargo, no es posible hacer una comparación directa debido a que la planta utilizada en este trabajo es monocotiledónea.

La información existente sobre los efectos de la germinación de *M. sativa* sobre plantas monocotiledóneas es escasa, se centra sobre la de plantas dicotiledóneas como *Lycopersicon esculentum* (El-Darier y El-Dien, 2011), *Glycine max* (Chung y Ill-Min, 1994) y la propia *M. sativa* (Ghimire et al. 2019). mientras que los reportes muestran que en plantas monocotiledóneas afecta negativamente el peso seco de plántulas o callos, la longitud de la raíz principal y de la parte aérea (Ghimire et al., 2019; Chon y col, 2002; Chung y Miller, 1995).

8.2.2. Efecto del extracto obtenido con acetato de etilo sobre la germinación de *B. brizantha*

En la Figura 5a, se observa que el extracto obtenido con acetato de etilo de *B. crassifolia*, disminuye el porcentaje de germinación de *B. brizantha* en las concentraciones de 5 y 200 ppm al día 2, al día 3 afecta a 5, 100 y 200 ppm, al día 4 a 5 y 200 ppm, día 5 solo 200 ppm, al día 6 y 7 a 5, 100 y 200 ppm, pero 5 ppm se recupera, de modo que únicamente las concentraciones de 100 y 200 ppm mantienen su efecto para el día 8. Mientras que, el extracto obtenido con acetato de etilo de *M. sativa* (Figura 5b), disminuye el porcentaje de germinación de *B. brizantha* con las

concentraciones de 5, 100 y 200 ppm, únicamente al día 2. Sin embargo, a partir del día 3, los porcentajes de germinación tienen una tendencia a igualarse con el Testigo, por lo que a partir del día 4 no se ve diferencia significativa entre ningún tratamiento y el Testigo.

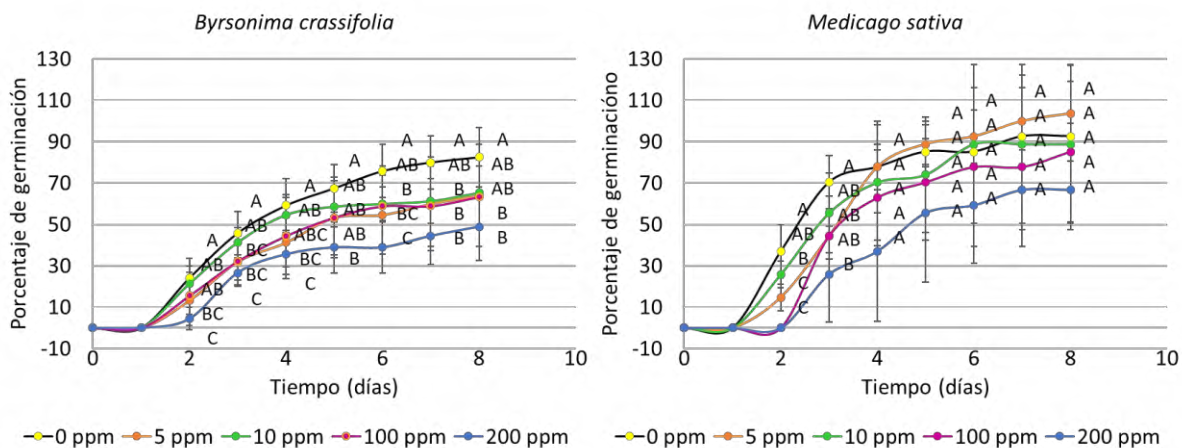


Figura 5. Efecto de diferentes concentraciones de acetato de etilo etanólico de *B. crassifolia* (a), y *M. sativa* (b) sobre el porcentaje de germinación diaria de semillas de *B. brizantha* (Organismo diana). Se observa que con extracto *B. crassifolia* a las concentraciones de 5, 100 y 200 ppm disminuyeron significativamente ($P < 0.05$) el porcentaje de germinación diaria en algunos tiempos de exposición entre los días 2 y 8, con respecto al Testigo (-●-). Para *M. sativa*, esas mismas concentraciones disminuyeron significativamente ($P < 0.05$) el porcentaje de germinación a los días 2 y de 3. Letra A significativamente mayor, letras distintas indican diferencias con Fisher, $n \geq 60$.

En la Tabla 8, se compararon los parámetros de germinación al día final (día 8) para ambos tratamientos. Con el extracto obtenido con acetato de etilo de *B. crassifolia*, la concentración de 5 ppm no muestra diferencias significativas en el porcentaje de germinación máxima, ni tiene efecto sobre la tasa de inhibición, pero disminuye la velocidad de germinación (calculada mediante el tiempo de germinación 50). Por el contrario, 100 ppm no tuvo efecto los primeros 5 días, pero a partir del día 6 comenzó a disminuir el porcentaje de germinación (Figura 5a), por lo cual afecta la germinación máxima y la tasa de inhibición, pero no disminuye la velocidad de germinación, ya que no modificó el tiempo de germinación 50. La concentración de 200 ppm afecta negativamente el tiempo de germinación 50 y disminuye la germinación en todos los tiempos, por lo cual, es la mejor concentración utilizada.

El extracto obtenido con acetato de etilo de *M. sativa* no mostró actividad sobre las semillas de *B. brizantha* (Figura 5b); ya que no se observó efecto en la germinación máxima, ni en la tasa de inhibición y tampoco disminuyó la velocidad de germinación.

Tabla 8. Cuadro comparativo de los parámetros de germinación de semillas de *B. brizantha* (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto obtenido con acetato de etilo *B. crassifolia* o *M. sativa* evaluados en el tiempo final (día 8).

Concentración (ppm)	<i>Byrsonima crassifolia</i>			<i>Medicago sativa</i>		
	Germinación máxima (%)	Velocidad de germinación (días)**	Tasa de inhibición (%)	Germinación máxima (%)	Velocidad de germinación (días)**	Tasa de inhibición (%)
0	85.7 ± 11.8	4.2 ± 0.8	0 ± 13.8	92.6 ± 6.4	2.9 ± 0.8	0 ± 6.9
5	64 ± 24.8	6.4 ± 2.4 *	22.4 ± 30.0	103.7 ± 23.1	3.6 ± 0.8	-12 ± 25.0
10	65.3 ± 15.9	5.2 ± 0.8	20.8 ± 19.3	88.9 ± 38.5	4.4 ± 2.5	4 ± 41.6
100	63.3 ± 15.1 *	6.0 ± 2.1	23.2 ± 18.3	85.2 ± 34.0	4.7 ± 1.5	8 ± 36.7
200	48.9 ± 16.2 *	8.1 ± 2.6 *	40.7 ± 19.6	66.7 ± 12.3	5.7 ± 1.8	28 ± 20.8

* Indica diferencia significativa respecto al Testigo, con Fisher.

** Obtenida a partir del tiempo de germinación 50, como se indica en la Tabla 4.

Los resultados anteriores muestran que si bien, el extracto obtenido con acetato de etilo de *B. crassifolia* muestra buena actividad herbicida, su tasa de inhibición más alta es de 40.7 % ± 19.6 con 200 ppm, la cual no tiene diferencia significativa con las obtenidas en todas las concentraciones del extracto etanólico (Tabla 8). La diferencia en eficacia podría deberse al contenido de compuestos de los extractos, ya que el extracto etanólico tuvo un mayor rendimiento de extracción, por lo cual podría tener una mayor variedad de compuestos; además, como el etanol es más polar que el acetato de etilo, los compuestos del extracto obtenido con etanol podrían ser más polares que los obtenidos con acetato de etilo, y por lo tanto serían distintos. Sin embargo, esto no puede afirmarse sin más estudios y de momento no es posible adjudicarle la actividad a ningún compuesto ni grupo de compuestos.

Con el extracto obtenido con acetato de etilo de *M. sativa* el porcentaje de germinación se recuperó con el tiempo en todos los tratamientos, cosa que no ocurre en ninguna de las concentraciones de este mismo extracto de *B. crassifolia*, durante las etapas evaluadas, como se mostró anteriormente en la Figura 5a. Esto sugiere que *B. brizantha* es más sensible al extracto

obtenido con acetato de etilo de *B. crassifolia* que al extracto obtenido con acetato de etilo de *M. sativa* en cuando a inhibición de la germinación.

Al comparar los resultados obtenidos en el porcentaje de germinación máximo de las semillas tratadas con 200 ppm de extracto obtenido con acetato de etilo con los resultados de la literatura consultada, se observó un comportamiento similar lo mencionado previamente. El extracto obtenido con acetato de etilo de *B. crassifolia* a 200 ppm tiene una germinación máxima de $48.9\% \pm 16.2$, el cual es menor al reportado en plantas del mismo orden de *B. crassifolia* (Elshamy et al., 2019), donde se alcanzó una inhibición del 93.95% y similar al obtenido por Perveen et al. (2019), donde se reportó un 50% de inhibición de la germinación respecto al Testigo. Pero con el extracto obtenido con acetato de etilo de *B. crassifolia* a concentración de 100 ppm se obtiene una tasa de germinación máxima de $63.3\% \pm 15.1$, que, si bien no muestra diferencia significativa a la obtenida a 200 ppm, su promedio es inferior al obtenido por Perveen et al. (2019).

La falta de efecto sobre la germinación máxima del extracto obtenido con acetato de etilo de *M. sativa* concuerda con la falta de reportes de efectos sobre la germinación de plantas monocotiledóneas del extracto de *M. sativa* previamente mencionada.

8.2.3. Efecto del extracto hexánico sobre la germinación de *B. brizantha*

En la Figura 6a, se observa que el extracto hexánico de *B. crassifolia* mostró efecto sobre la germinación de semillas de *B. brizantha* con la concentración de 200 ppm, disminuyó la germinación a partir del segundo día y las semillas no se recuperaron con el tiempo, por lo cual, si disminuyó el porcentaje de germinación al tiempo final. En cambio, en la Figura 6b vemos que el extracto hexánico de *M. sativa* disminuye el porcentaje de germinación de *B. brizantha* con las concentraciones de 100 y 200 ppm únicamente al día 2 y 3, sin embargo, a partir del día 4 los porcentajes de germinación tienen una tendencia a igualarse con el Testigo, por lo que al día 4 solo 100 ppm muestran diferencia significativa y a partir del día 5 no se ve diferencia significativa entre ningún tratamiento y el Testigo. A pesar de la falta de diferencia significativa debido a la gran desviación, la concentración de 100 ppm mantiene una tendencia central inferior al Testigo hasta el día 8.

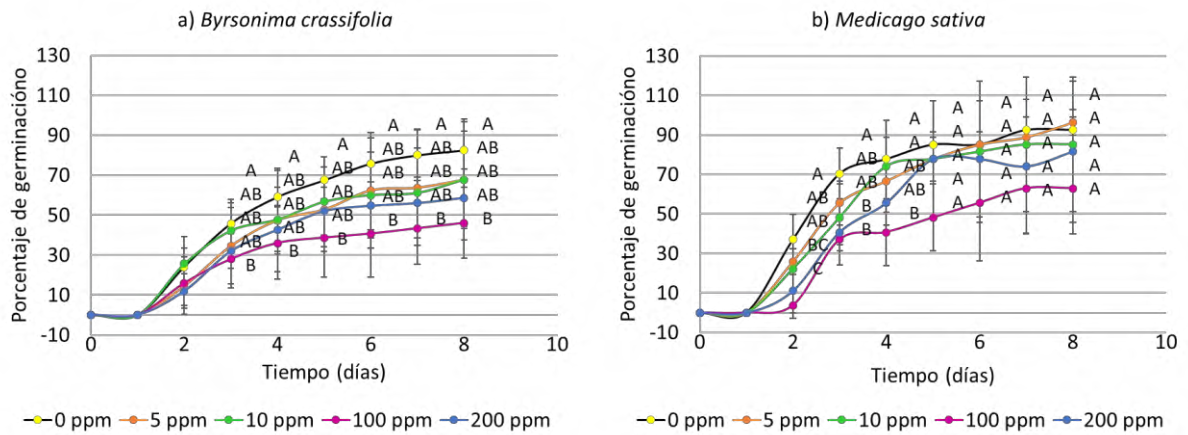


Figura 6. Efecto de diferentes concentraciones de extracto hexánico de *B. crassifolia* (a), y *M. sativa* (b) sobre el porcentaje de germinación diaria de semillas de *B. brizantha* (Organismo diana). Se observa que con el extracto de *B. crassifolia*, la concentración de 100 disminuyó significativamente ($P < 0.05$) el porcentaje de germinación a partir del día 2 con respecto al Testigo (-●-). Para *M. sativa*, las concentraciones de 100 y 200 ppm disminuyeron significativamente ($P < 0.05$) porcentaje de germinación a los días 2 y 3, recuperándose después. Letra A significativamente mayor, letras distintas indican diferencias con Fisher, $n \geq 60$.

En la Tabla 9 se muestra que, con respecto al Testigo, sólo la concentración de 100 ppm, del extracto hexánico de *B. crassifolia*, aumentó significativamente la tasa de inhibición y disminuyó significativamente la germinación máxima y la velocidad de germinación (calculada mediante el tiempo de germinación 50). En el caso del extracto hexánico de *M. sativa*, ninguna concentración tuvo un efecto sobre la germinación máxima o en la tasa de inhibición, pero disminuyó la velocidad de germinación con 100 ppm. La disminución en la eficacia del extracto hexánico con respecto a el etanólico y el obtenido con acetato de etilo coincide con un menor rendimiento de la extracción y menor polaridad del disolvente de extracción, por lo cual el extracto podría tener menor variedad de compuestos de menor polaridad, pero ni el contenido de estos ni su relación con la actividad inhibidora de la germinación puede afirmarse con los estudios que se han hecho hasta este punto.

Tabla 9. Cuadro comparativo de los parámetros de germinación de semillas de *B. brizantha* (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto hexánico *B. crassifolia* o *M. sativa* evaluados en el tiempo final (día 8).

Concentración (ppm)	<i>Byrsonima crassifolia</i>			<i>Medicago sativa</i>		
	Germinación máxima (%)	Velocidad de germinación (días)**	Tasa de inhibición (%)	Germinación máxima (%)	Velocidad de germinación (días)**	Tasa de inhibición (%)
0	85.7 ± 11.8	4.2 ± 0.8	0 ± 13.8	92.6 ± 6.4	2.9 ± 0.8	0 ± 6.9
5	67.8 ± 30.3	6.1 ± 2.7	17.8 ± 36.7	96.3 ± 6.4	3.6 ± 0.4	-4 ± 6.9
10	67.8 ± 24.4	6.0 ± 3.3	17.9 ± 29.5	85.2 ± 34.0	4.2 ± 1.4	8 ± 36.7
100	46.0 ± 17.8 *	8.7 ± 3.6 *	44.2 ± 21.5 *	63.0 ± 23.1	6.1 ± 2.1 *	32 ± 25.0
200	58.7 ± 14.5	6.3 ± 6.3	28.9 ± 17.3	81.5 ± 35.7	4.8 ± 1.4	12 ± 38.6

* Indica diferencia significativa respecto al Testigo, con Fisher.

** Obtenida a partir del tiempo de germinación 50, como se indica en la Tabla 4.

La comparación con la bibliografía de este extracto a 200 ppm es similar a lo mencionado previamente en la discusión del extracto etanólico de *B. crassifolia*, ya que el extracto hexánico de *B. crassifolia* a 100 ppm tiene una germinación máxima de 46.0% ± 17.8, menor al reportado en plantas del mismo orden de *B. crassifolia* (Elshamy et al., 2019), donde se alcanzó una inhibición del 93.95% y similar al obtenido por Perveen et al. (2019), donde se reportó un 50% de inhibición de la germinación respecto al Testigo.

Con el extracto hexánico de *M. sativa* se observó una recuperación del porcentaje de germinación con el tiempo en todos los tratamientos, cosa que no ocurre con el extracto de *B. crassifolia*, como se mostró anteriormente en la Figura 6a, lo que sugiere que *B. brizantha* es más sensible al extracto hexánico de *B. crassifolia* que al extracto hexánico de *M. sativa* en cuando a inhibición de germinación.

En general, los extractos de *B. crassifolia* afectaron todos los parámetros de germinación, sin embargo, los extractos de hexánico y acetato de etilo mostraron efecto a concentraciones altas, (100 y 200 ppm) mientras que el extracto etanólico desde concentraciones bajas, por lo cual, este extracto es el más efectivo. Esto podría deberse a que el extracto etanólico contenga una mayor cantidad de compuestos que afecten la germinación, contenga otros compuestos que trabajen de forma sinérgica para amplificar el efecto, o que los 3 extractos compartan el compuesto o grupo de compuestos responsables del efecto, pero estos se encuentren en mayor concentración en el

extracto etanólico; pero, para poder afirmar algunas de estas suposiciones, primero tendría que determinarse el compuesto o compuestos responsables del efecto.

8.3. Efecto de los extractos de *Byrsonima crassifolia* y *Medicago sativa* sobre el establecimiento de *Brachiaria brizantha*.

Posterior a la germinación, se determinó el efecto de todos los extractos sobre el establecimiento de las plantas, y se midieron los parámetros descritos en la Tabla 5 de materiales y métodos. Como se mencionó en materiales y métodos, el criterio de inclusión de establecimiento fue la aparición de la segunda hoja verdadera. Para el tiempo evaluado (día 8), se observó que todos los extractos inhibieron el establecimiento. El porcentaje de establecimiento en las plantas Testigo fue de 8.9%, el porcentaje de establecimiento de las plantas tratadas con los extractos fue 0, independientemente de la concentración. Se sugiere ampliar el tiempo del estudio para incrementar el porcentaje de establecimiento en el testigo y en los experimentales y así corroborar el efecto observado a tiempos posteriores.

Posteriormente se verificó el efecto de los extractos sobre la morfología de la raíz para todos los extractos.

8.3.1. Efecto del extracto etanólico sobre las raíces de *B. brizantha*.

8.3.1.1. Efecto del extracto etanólico sobre el crecimiento de la raíz principal de *B. brizantha*

En la Figura 7a, puede verse que el extracto etanólico de *B. crassifolia* no tuvo efecto significativo sobre la longitud de raíz principal de *Brachiaria brizantha* a ninguna de las concentraciones utilizadas, mientras que para el extracto etanólico de *M. sativa* (Figura 7b) disminuye la longitud de raíz principal de *Brachiaria brizantha* a 5, 100 y 200 ppm en el día 3, a todas las concentraciones de tratamiento utilizadas de los días 4 a 6, pero tienden a igualarse al Testigo, de modo que ninguna concentración muestra diferencia significativa respecto al Testigo en el día 8.

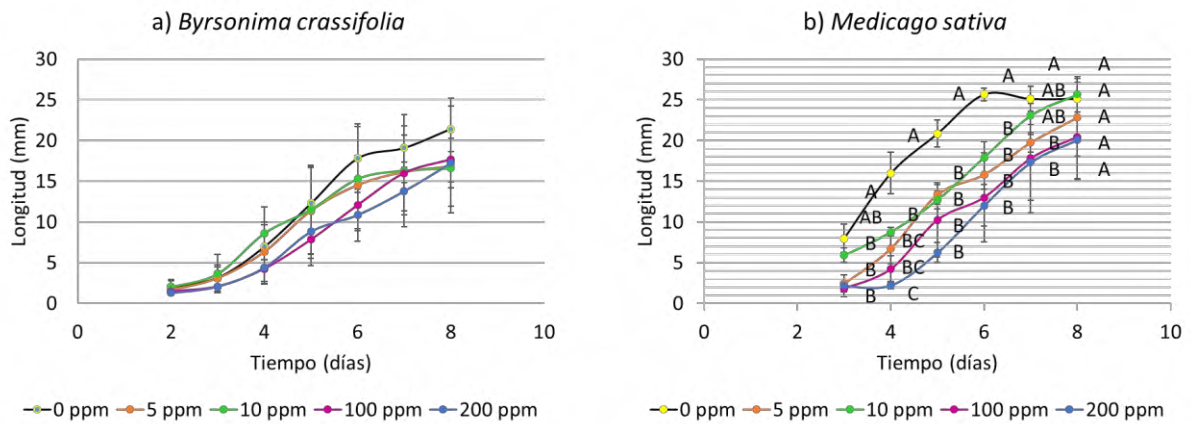


Figura 7. Efecto de diferentes concentraciones de extracto etanólico de *B. crassifolia* (a), y *M. sativa* (b) sobre la longitud de la raíz principal de plántulas de *B. brizantha* (Organismo diana). Se observa que ninguno de los tratamientos de *B. crassifolia* tuvieron efecto significativo con respecto al Testigo (-●-) en ninguno de los tiempos evaluados. Para *M. sativa*, todas las concentraciones evaluadas disminuyeron significativamente ($P \leq 0.05$) la longitud de la raíz principal entre el día 4 y 6, pero en días posteriores tiende a igualarse al Testigo. Letra A significativamente mayor, letras distintas indican diferencias con Fisher, $n \geq 60$.

Con el extracto etanólico de *B. crassifolia*, ninguna concentración tuvo efecto significativo sobre la longitud máxima o velocidad de crecimiento de la raíz principal, la cual se calcula mediante el tiempo de crecimiento 50 de raíz principal, como se muestra en la Tabla 10. Para el extracto etanólico de *M. sativa*, tampoco se observa un efecto sobre la longitud máxima de la raíz, sin embargo, disminuye significativamente la velocidad de crecimiento de la raíz a todas las concentraciones utilizadas, calculada mediante el tiempo de crecimiento 50, aunque esto solo afecta a la planta en los primeros días evaluados, ya que se recupera. La recuperación es dependiente de la concentración, concentraciones mayores siguen mostrando efecto significativo hasta el día 7. Aunque en el día final ya no se observan diferencias significativas, se observa en la Figura 7a, que la tendencia central del promedio es menor para 100 y 200 ppm.

Tabla 10. Cuadro comparativo de los parámetros de crecimiento de la raíz principal de *B. brizantha* (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto etanólico *B. crassifolia* o *M. sativa* evaluados en el tiempo final (día 8).

Concentración (ppm)	<i>Byrsonima crassifolia</i>		<i>Medicago sativa</i>	
	Longitud máxima de raíz principal (mm)	Velocidad de crecimiento (días)**	Longitud máxima de raíz principal (mm)	Velocidad de crecimiento (días)**
0	21.4 ± 3.8	4.9 ± 0.6	25.1 ± 2.0	3.2 ± 0.5
5	16.8 ± 1.9	5.0 ± 0.8	22.8 ± 4.8	5.3 ± 0.3 *
10	16.6 ± 4.7	5.1 ± 1.9	25.7 ± 2.2	4.8 ± 0.1 *
100	17.7 ± 6.5	5.4 ± 1.1	20.4 ± 5.3	6.1 ± 1.5 *
200	17.2 ± 3.0	5.6 ± 0.8	20.1 ± 4.8	6.2 ± 0.6 *

* Indica diferencia significativa respecto al Testigo, con Fisher.

** Obtenida a partir del tiempo de crecimiento 50, como se indica en la Tabla 5.

Brachiaria brizantha es más sensible a los extractos etanólico de *M. sativa* que a los de *B. crassifolia* en cuanto a raíz principal, ya que, a pesar de que ninguno de los dos tratamientos muestra diferencias respecto al Testigo en la longitud máxima, todas las concentraciones utilizadas con el extracto de *M. sativa* disminuyen la velocidad de crecimiento de la raíz, mientras que ninguna con el extracto de *B. crassifolia* lo hace.

Otros autores como Elshamy et al. (2019) y Chon et al. (2002) han utilizado plantas del mismo orden y subclase que *B. crassifolia* y reportado con ellas una disminución de la longitud de la raíz principal de otras plantas monocotiledóneas, como *Echinochloa crus-galli*, pertenecientes a la misma tribu que *B. brizantha*, que fueron de 84.6% y aproximadamente 90%, respectivamente. Estas diferencias en Chon et al. (2002) podría deberse a que la concentración utilizadas para el experimento fue de 30,000 ppm, una concentración 150 veces superior a la mayor utilizada en este trabajo, ya que en este trabajo se buscaba igualar las concentraciones utilizadas con *B. crassifolia*; además, *B. brizantha* cultivar Marandú ha sido seleccionada para ser una planta altamente productiva, cosa que no ocurre con *Echinochloa crus-galli*, utilizada en Chon et al. (2002). Con Elshamy et al. (2019) se utiliza una concentración aproximada a 100 ppm que se encuentra entre el rango de las concentraciones utilizadas, pero al ser un aceite esencial en lugar de un extracto, pueden obtenerse grupos de compuestos distintos, como compuestos volátiles (Elshamy et al., 2019), a los cuales podría deberse su actividad.

Ya se ha reportado previamente que los extractos de *M. sativa* disminuyen la longitud de la raíz de otras plantas monocotiledóneas pertenecientes a la misma tribu que *B. brizantha*, como en Chon et al. (2002) con un porcentaje de inhibición de cerca del 90% a una concentración de 30,000 ppm. La diferencia de efecto con lo reportado podría deberse a la diferencia de concentración, ya que el presente trabajo la mayor concentración utilizada fue 200 ppm, o el vigor de *B. brizantha* cultivar Marandú, que ha sido seleccionada para ser una planta altamente productiva, cosa que no ocurre con *Echinochloa crus-galli*, utilizada en Chon et al. (2002).

8.3.1.2. Efecto del extracto etanólico sobre el crecimiento de las raíces laterales de *B. brizantha*.

En la Figura 8a, vemos que el extracto etanólico de *B. crassifolia* no tiene efecto sobre el porcentaje de plántulas con raíces laterales de *Brachiaria brizantha* a ninguna de las concentraciones utilizadas a ningún tiempo evaluado. Con el extracto etanólico de *M. sativa* (Figura 8b), disminuye el porcentaje de plantas con raíces laterales de *Brachiaria brizantha* a las concentraciones de 5 y 200 ppm hasta el día 7, pero en la concentración de 5 ppm, el promedio de plántulas con raíces laterales aumenta hasta no presentar diferencia con el Testigo a días posteriores, de modo que únicamente con la concentración de 200 ppm se mantiene la disminución significativa en el día 8; con esta última concentración, aparecen raíces laterales hasta el día 7.

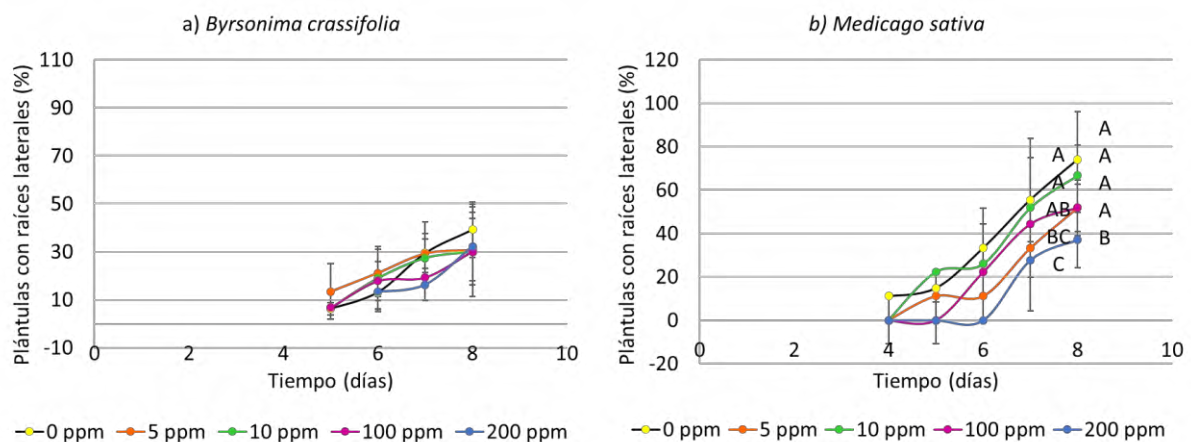


Figura 8. Efecto de diferentes concentraciones de extracto etanólico de *B. crassifolia* (a), y *M. sativa* (b) sobre el porcentaje de plántulas con raíces laterales de *B. brizantha* (Organismo diana). Se observa que ninguno de los tratamientos de *B. crassifolia* tuvieron efecto significativo con respecto al Testigo (-●-) en

ninguno de los tiempos evaluados. Para *M. sativa*, las concentraciones de 5 y 200 ppm hasta el día 7 disminuyeron significativamente el porcentaje de plántulas con raíces laterales, pero únicamente 200 ppm se mantuvo hasta el día 8. Letra A significativamente mayor, letras distintas indican diferencias con Fisher, $n \geq 60$.

En la Tabla 11 se ve que el extracto etanólico de *B. crassifolia* no muestra diferencias sobre el porcentaje de plántulas con raíces laterales a tiempo final a ninguna concentración con respecto al Testigo, tampoco sobre la de longitud máxima de la raíz lateral más larga, pero a 200 ppm disminuye en un 21% el número de raíces laterales por planta. Mientras tanto con el extracto de *M. sativa* se observa que ninguna concentración tiene efecto sobre la de longitud máxima de la raíz lateral más larga o el número de raíces laterales por planta, pero que 200 ppm tiene efecto sobre el porcentaje de plantas con raíces laterales a tiempo final, el cual es del 50%.

Tabla 11. Cuadro comparativo de los parámetros de crecimiento de las raíces laterales de *B. brizantha* (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto etanólico *B. crassifolia* o *M. sativa* evaluados en el tiempo final (día 8).

Concentración (ppm)	<i>Byrsonima crassifolia</i>			<i>Medicago sativa</i>		
	Plantas con raíz (%)	Numero de raíces por planta	Longitud máxima de raíz más larga (mm)	Plantas con raíz (%)	Numero de raíces por planta	Longitud máxima de raíz más larga (mm)
0	39.2 ± 11.6	1.9 ± 0.3	10.1 ± 2.0	74.1 ± 6.4	2.1 ± 0.3	9.8 ± 2.5
5	30.7 ± 19.2	2.3 ± 0.5	9.8 ± 0.8	51.9 ± 12.8	1.7 ± 0.1	8.8 ± 0.7
10	30.0 ± 13.8	1.6 ± 0.5	9.2 ± 0.9	66.7 ± 29.4	2.0 ± 1.0	10.1 ± 1.7
100	30.0 ± 18.7	1.4 ± 0.4	9.7 ± 2.6	51.9 ± 17.0	2.0 ± 0.6	8.8 ± 0.2
200	32.2 ± 14.2	1.5 ± 0.2 *	9.3 ± 2.2	37.0 ± 12.8 *	1.7 ± 0.6	7.9 ± 2.3

* Indica diferencia significativa respecto al Testigo, con Fisher.

No es posible determinar a qué extracto etanólico es más sensible *Brachiaria brizantha* en cuanto a raíces laterales, ya que los efectos de ambos fueron distintos, siendo con extracto de *B. crassifolia* sobre el número de raíces a tiempo final y con extracto de *M. sativa* sobre el porcentaje de plantas con raíces laterales a tiempo final, y ocurrieron a la misma concentración; pero el efecto con extracto de *M. sativa* fue en mayor intensidad que el de *B. crassifolia*, inhibiendo en un 50% y del 21%, respectivamente.

No se encontró en la bibliografía consultada un análisis sobre plantas cuyo extracto inhibiera el crecimiento de la raíz lateral, ni en plantas monocotiledóneas, ni dicotiledóneas, por lo cual no

puede contrastarse con reportes previos. Si bien esto podría deberse a que pocos extractos tengan efectos sobre el número de raíces laterales, también podría deberse a que pocos estudios consideren este parámetro, aunque, la formación adecuada del sistema radicular es un paso fundamental en el establecimiento de las plantas.

8.3.2. Efecto del extracto obtenido con acetato de etilo de *Byrsonima crassifolia* y *Medicago sativa* sobre las raíces de *Brachiaria brizantha*

8.3.2.1. Efecto del extracto obtenido con acetato de etilo sobre el crecimiento de la raíz principal de *B. brizantha*.

En la Figura 9a, se observa que el extracto obtenido con acetato de etilo de *B. crassifolia* disminuye la longitud de la raíz principal a las concentraciones de 5, 100 y 200 ppm en los días 4, 6 y 7, pero las plantas tienden a igualarse al Testigo, de modo que únicamente 100 y 200 ppm disminuyen la longitud al día 8. Por otro lado, el extracto obtenido con acetato de etilo de *M. sativa* (Figura 9b) disminuye la longitud de la raíz principal de *B. brizantha* a todas las concentraciones utilizadas del día 4 al 6, pero el efecto es transitorio ya que tienden a igualarse al Testigo y ninguna concentración presenta diferencia significativa al tiempo final

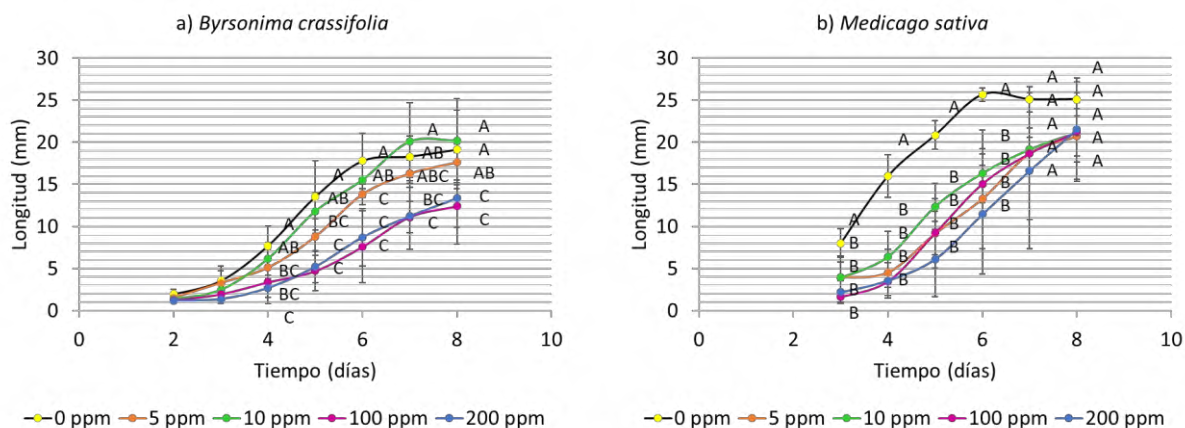


Figura 9. Efecto de diferentes concentraciones de extracto obtenido con acetato de etilo de *B. crassifolia* (a), y *M. sativa* (b) sobre la longitud de la raíz principal de plántulas de *B. brizantha* (Organismo diana).

Se observa que de los tratamientos de *B. crassifolia*, las concentraciones de 5, 100 y 200 ppm disminuyeron significativamente ($P \leq 0.05$) la longitud de la raíz principal con respecto al Testigo (-●-) a la mayoría de los tiempos entre el día 4 y 8, pero 5 ppm tiende a igualarse al Testigo. Para *M. sativa*, todas las concentraciones evaluadas disminuyeron significativamente ($P \leq 0.05$) la longitud de la raíz principal entre

el día 2 y 6, pero en días posteriores tiende a igualarse al Testigo. Letra A significativamente mayor, letras distintas indican diferencias con Fisher, $n \geq 60$.

En la Tabla 12 se muestra que la longitud máxima de la raíz principal de *Brachiaria brizantha* disminuye a 100 y 200 ppm, pero solo 200 ppm disminuye la velocidad de crecimiento de la raíz principal, calculado mediante el tiempo de crecimiento 50 de raíz principal. Los tratamientos no muestran diferencias significativas entre ellos en la medida de la longitud máxima, pero se considera que el mejor tratamiento fue 200 ppm ya que afectó todos los parámetros evaluados, seguido por 100 ppm que disminuyó la longitud máxima. En cuanto al extracto obtenido con acetato de etilo de *M. sativa*, ninguna concentración afecta la longitud máxima, pero todas disminuyen la velocidad de crecimiento de la raíz principal.

Tabla 12. Cuadro comparativo de los parámetros de crecimiento de la raíz principal de *B. brizantha* (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto obtenido con acetato de etilo *B. crassifolia* o *M. sativa* evaluados en el tiempo final (día 8).

Concentración (ppm)	<i>Byrsonima crassifolia</i>		<i>Medicago sativa</i>	
	Longitud máxima de raíz principal (mm)	Velocidad de crecimiento (días)**	Longitud máxima de raíz principal (mm)	Velocidad de crecimiento (días)**
0	21.4 ± 3.8	4.6 ± 0.6	25.1 ± 2.0	3.2 ± 0.5
5	17.6 ± 2.1	3.6 ± 4.5	20.7 ± 5.2	5.9 ± 1.4 *
10	20.2 ± 4.5	5.0 ± 0.5	21.2 ± 3.6	5.4 ± 0.5 *
100	12.4 ± 2.5 *	7.5 ± 1.3	21.2 ± 2.8	5.8 ± 0.3 *
200	14.6 ± 2.3 *	7.8 ± 2.4 *	21.5 ± 6.2	6.2 ± 1.5 *

* Indica diferencia significativa respecto al Testigo, con Fisher.

** Obtenida a partir del tiempo de crecimiento 50, como se indica en la Tabla 5.

En este sentido el extracto obtenido con acetato de etilo de *B. crassifolia* afecta más a *B. brizantha* que el extracto de *M. sativa*, ya que con el extracto de *B. crassifolia*, a diferencia de con el extracto de *M. sativa*, las raíces de las plantas tratadas con 100 y 200 ppm no se recuperan con el tiempo, como puede verse en la Figura 18.

El extracto de *B. crassifolia* a concentraciones de 100 y 200 ppm presentó una inhibición del 42.1 y 31.8% de la longitud de la raíz principal, respectivamente. Este porcentaje de inhibición es

inferior al obtenido por Elshamy et al. (2019) y por Chon et al. (2002) sobre otras plantas monocotiledóneas pertenecientes a la misma tribu que *B. brizantha*, que fueron de 84.6% y aproximadamente 90%, respectivamente. La discusión sobre este resultado es como la mencionada previamente con los extractos etanólicos de *B. crassifolia* y *M. sativa*. Adicionalmente, en Chon et al. (2002) se hizo una extracción acuosa en la que probablemente se encontrarían compuestos mayoritariamente polares, mientras que este es un extracto obtenido por acetato de etilo con compuestos medianamente polares, podría ser que el mayor efecto sea por compuestos polares no presentes en el extracto obtenido con acetato de etilo.

Debido a que ningún tratamiento de *M. sativa* disminuyó la longitud máxima de la raíz principal, el efecto es distinto al previamente reportado por Chon et al. (2002), donde los extractos de *M. sativa* disminuyen la longitud de la raíz de otras plantas monocotiledóneas pertenecientes a la misma tribu que *B. brizantha* con un porcentaje de inhibición de cerca del 90% a una concentración de 30,000 ppm. La diferencia de efecto con lo reportado se explica del mismo modo que lo discutido con el extracto etanólico de *M. sativa*. La variación también podría deberse al tipo de extracto, ya que en Chon et al. (2002) se utilizaba un extracto acuoso en el cual potencialmente se encuentran compuestos mayoritariamente polares, y en el extracto obtenido con acetato de etilo los medianamente polares.

8.3.2.2. Efecto del extracto obtenido con acetato de etilo sobre el crecimiento de las raíces laterales de *B. brizantha*.

En la Figura 10a, se observa que el extracto obtenido con acetato de etilo de *B. crassifolia* disminuye el porcentaje de plantas con raíces laterales de *Brachiaria brizantha* a las concentraciones de 5, 100 y 200 ppm en el día 7, pero 5 y 200 ppm se igualan al Testigo, de modo que únicamente a la concentración de 100 ppm disminuye el porcentaje en el día 8. Mientras tanto, el extracto obtenido con acetato de etilo de *M. sativa* (Figura 10b) disminuye el porcentaje de plantas con raíces laterales de *Brachiaria brizantha* a la concentración de 100 ppm en el día 6, pero a días posteriores su desviación estándar es muy grande, por lo cual ninguna concentración presenta diferencia significativa al día 8.

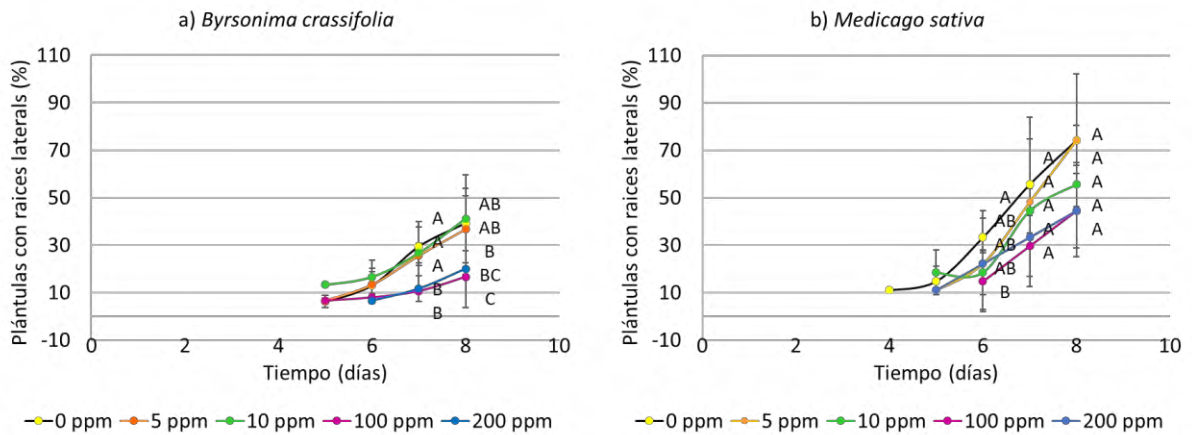


Figura 10. Efecto de diferentes concentraciones de extracto obtenido con acetato de etilo de *B. crassifolia* (a), y *M. sativa* (b) sobre el porcentaje de plántulas con raíces laterales de *B. brizantha* (Organismo diana). Se observa que con el extracto de *B. crassifolia*, las concentraciones de 5, 100 y 200 ppm disminuye su porcentaje de manera significativa ($P \leq$) con respecto al Testigo (-●-) en el día 7 y a 100 ppm en el día 8. Para *M. sativa*, la concentración de 100 ppm disminuyó significativamente el porcentaje de plantas con raíces laterales al día 6, pero a días posteriores no hay diferencia significativa. Letra A significativamente mayor, letras distintas indican diferencias con Fisher, $n \geq 60$.

En la Tabla 13 se muestra que del extracto obtenido con acetato de etilo de *B. crassifolia*, la concentración de 200 ppm disminuye la longitud máxima de la raíz lateral más larga y únicamente 100 ppm disminuye el porcentaje de plantas con raíces laterales a tiempo final, pero ninguna concentración tiene efecto sobre el número de raíces laterales por planta a tiempo final. No es posible saber la mejor concentración para obtener un efecto sobre las raíces laterales en este caso, ya que ambas concentraciones mostraron efectos distintos. También puede verse que, con el extracto de *M. sativa*, ninguna concentración del extracto afectó la longitud máxima de la raíz lateral más larga, el porcentaje de plantas con raíz lateral a tiempo final o el número de raíces por planta a tiempo final.

Tabla 13. Cuadro comparativo de los parámetros de crecimiento de las raíces laterales de *B. brizantha* (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto obtenido con acetato de etilo *B. crassifolia* o *M. sativa* evaluados en el tiempo final (día 8).

Concentración (ppm)	<i>Byrsonima crassifolia</i>			<i>Medicago sativa</i>		
	Plantas con raíz (%)	Numero de raíces por planta	Longitud máxima de raíz lateral más larga (mm)	Plantas con raíz (%)	Numero de raíces por planta	Longitud máxima de raíz más larga (mm)
0	39.2 ± 11.6	1.9 ± 0.3	10.1 ± 2.0	74.1 ± 6.4	2.1 ± 0.3	9.8 ± 2.5
5	36.7 ± 17.2	4.6 ± 7.2	9.2 ± 2.1	74.1 ± 28.0	2.4 ± 0.1	10.3 ± 1.7
10	41.1 ± 18.6	1.6 ± 0.3	10.3 ± 3.7	55.6 ± 38.5	2.3 ± 0.4	11.8 ± 2.2
100	16.7 ± 10.1 *	2.1 ± 1.1	11.2 ± 5.0	44.4 ± 19.2	1.8 ± 0.5	10.1 ± 0.9
200	20.0 ± 16.0	1.4 ± 0.5	6.8 ± 1.2 *	44.4 ± 15.7	1.4 ± 0.4	9.0 ± 0.7

* Indica diferencia significativa respecto al Testigo, con Fisher.

Las raíces de *Brachiaria brizantha* son más sensibles al extracto obtenido con acetato de etilo de *B. crassifolia* que al de *M. sativa* en cuando a raíz lateral, ya que con el extracto de *B. crassifolia* si puede verse efectos en los parámetros considerados a 100 y 200 ppm.

En la bibliografía consultada, no se encontraron reportes sobre extractos de *M. sativa* que inhibiera el crecimiento de la raíz lateral, ni en plantas monocotiledóneas ni dicotiledóneas, tampoco de plantas relacionadas con *B. crassifolia*, por lo cual no pueden contrastarse con la literatura. Si bien esto podría deberse a que pocos extractos tengan efectos sobre el número de raíces laterales, también podría deberse a que pocos estudios consideren este parámetro.

8.3.3. Efecto del extracto hexánico de *Byrsonima crassifolia* y *Medicago sativa* sobre las raíces de *Brachiaria brizantha*.

8.3.3.1. Efecto del extracto hexánico sobre el crecimiento de la raíz principal de *B. brizantha*.

En la Figura 11a, se observa que el extracto hexánico de *B. crassifolia* disminuye la longitud de la raíz principal de *B. brizantha* a la concentración de 200 ppm en el día 4, a 10, 100 y 200 ppm el día 5, a 10 y 200 ppm el día 6, todos los tratamientos tienden a igualarse al Testigo, dejando únicamente a la concentración de 10 ppm con disminución significativa el día 8. Si bien el promedio de las longitudes entre tratamientos no varía mucho, el cambio de la significancia entre tiempos varía principalmente por el tamaño de la desviación estándar. 10 ppm es el único tratamiento que muestra disminución significativa desde el día 4 y no se recupera. De manera similar, el extracto hexánico de *M. sativa* (Figura 11b) disminuye la longitud de la raíz principal de

B. brizantha a todas las concentraciones utilizadas al día 3 y 4, pero los tratamientos tienden a recuperarse para tener una longitud similar a la del Testigo, de modo que entre los días 5 y 6 solo 100 y 200 ppm tienen diferencia, al día 7 únicamente 200 ppm y al día 8 ningún tratamiento tiene efecto significativo sobre la longitud.

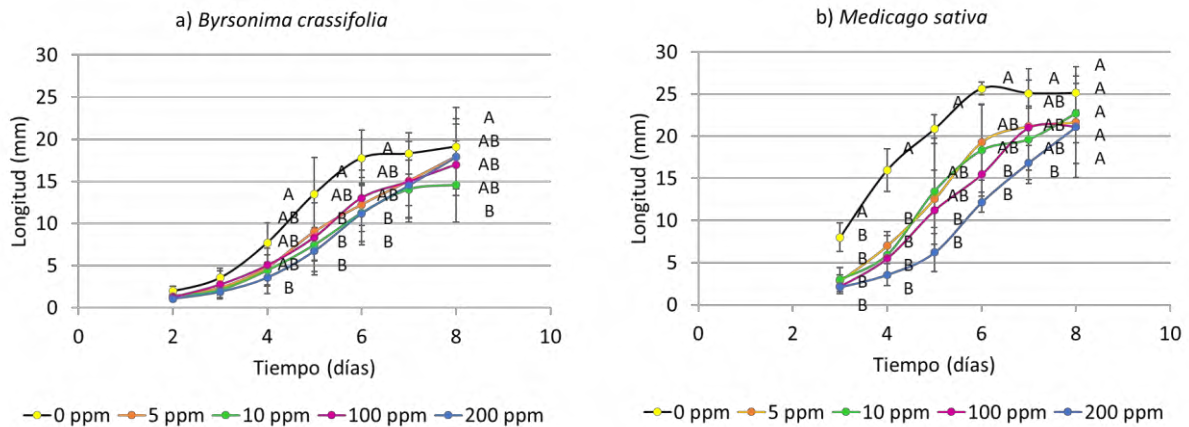


Figura 11. Efecto de diferentes concentraciones de extracto hexánico de *B. crassifolia* (a), y *M. sativa* (b) sobre la longitud de la raíz principal de plántulas de *B. brizantha* (Organismo diana). Se observa que en el caso de *B. crassifolia* las concentraciones de 10, 100 y 200 ppm disminuyeron significativamente ($P \leq 0.05$) la longitud de la raíz principal con respecto al Testigo (-●-) a distintos tiempos entre el día 4 y 8. Para *M. sativa*, todas las concentraciones evaluadas disminuyeron significativamente ($P \leq 0.05$) la longitud de la raíz principal a todas las concentraciones evaluadas entre los días 3 y 4, aunque tendieron a igualarse con el Testigo en días posteriores. Letra A significativamente mayor, letras distintas indican diferencias con Fisher, $n \geq 60$.

En la Tabla 14 puede que el extracto hexánico de *B. crassifolia* disminuyó la longitud máxima de la raíz principal de manera significativa únicamente a la concentración de 10 ppm con respecto al Testigo, pero tanto 10 como 200 ppm disminuyen su velocidad de crecimiento, calculada por el tiempo de crecimiento 50. Con el extracto hexánico de *M. sativa*, el efecto no es sobre la longitud máxima de la raíz principal, si no sobre la velocidad de crecimiento, pues todas las concentraciones utilizadas la disminuyen.

Tabla 14. Cuadro comparativo de los parámetros de crecimiento de la raíz principal de *B. brizantha* (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto hexánico *B. crassifolia* o *M. sativa*.

Concentración (ppm)	<i>Byrsonima crassifolia</i>		<i>Medicago sativa</i>	
	Longitud máxima de raíz principal (mm)	Velocidad de crecimiento (días)**	Longitud máxima de raíz principal (mm)	Velocidad de crecimiento (días)**
0	21.4 ± 3.8	4.6 ± 0.6	25.1 ± 2.0	3.2 ± 0.5
5	17.9 ± 3.9	5.7 ± 1.0	21.7 ± 6.6	5.4 ± 1.0 *
10	14.6 ± 4.4 *	6.4 ± 1.4 *	22.7 ± 3.5	5.2 ± 0.7 *
100	17.0 ± 2.9	5.8 ± 1.4	21.2 ± 5.1	5.5 ± 0.7 *
200	17.9 ± 4.5	6.1 ± 10 *	21.1 ± 4.4	6.1 ± 0.3 *

* Indica diferencia significativa respecto al Testigo, con Fisher.

** Obtenida a partir del tiempo de crecimiento 50, como se indica en la Tabla 5.

Con el extracto hexánico de *B. crassifolia*, 10 ppm fue el mejor tratamiento, disminuyendo la longitud máxima de la raíz en un 31.8%, lo cual deja esta concentración como la mejor concentración de extracto de *B. crassifolia* junto con el extracto obtenido con acetato de etilo a 200 ppm para inhibir el crecimiento de la raíz principal en *B. brizantha*, pero el tratamiento de extracto hexánico a concentración de 10 ppm sería una mejor opción en uso si se considera únicamente el parámetro de inhibición de la raíz principal, ya que está 20 veces más diluido que el extracto obtenido con acetato de etilo a 200 ppm. El efecto del extracto hexánico de *B. crassifolia* es preferible al de *M. sativa*, ya que no se revierte a 200 ppm.

El extracto de *B. crassifolia* a concentraciones de 10 ppm presentó una inhibición del 31.8% de la longitud de la raíz principal. Este porcentaje de inhibición es inferior al obtenido por Elshamy et al. (2019) y por Chon et al. (2002) sobre otras plantas monocotiledóneas pertenecientes a la misma tribu que *B. brizantha*, que fueron de 84.6% y aproximadamente 90%, respectivamente. La discusión sobre este resultado es como la mencionada previamente con los extractos etanólicos de *B. crassifolia* y *M. sativa*. Adicionalmente, en Chon et al. (2002) se hizo una extracción acuosa en la que probablemente se encontraron compuestos mayoritariamente polares, mientras que con el hexano se extrajeron principalmente componentes no polares, por lo cual los extractos utilizados no tuvieron el mismo tipo de moléculas.

8.3.3.2. Efecto del extracto hexánico sobre el crecimiento de las raíces laterales de *B. brizantha*. En la Figura 12a, se observa que el extracto hexánico de *B. crassifolia* disminuyó el porcentaje de plantas con raíces laterales de *Brachiaria brizantha* a las concentraciones de 100 y 200 ppm en el día 6 y 7 y únicamente a 200 ppm en el día 8. 100 ppm aumentó su promedio hasta ser similar al del Testigo, pero 200 ppm no se recupera con el tiempo. En el caso del extracto hexánico de *M. sativa* (Figura 12b), disminuye el porcentaje de plantas con raíces laterales de *Brachiaria brizantha* a la concentración de 100 ppm en el día 6, a 100 y 200 ppm en el día 7 y a 200 ppm en el día 8.

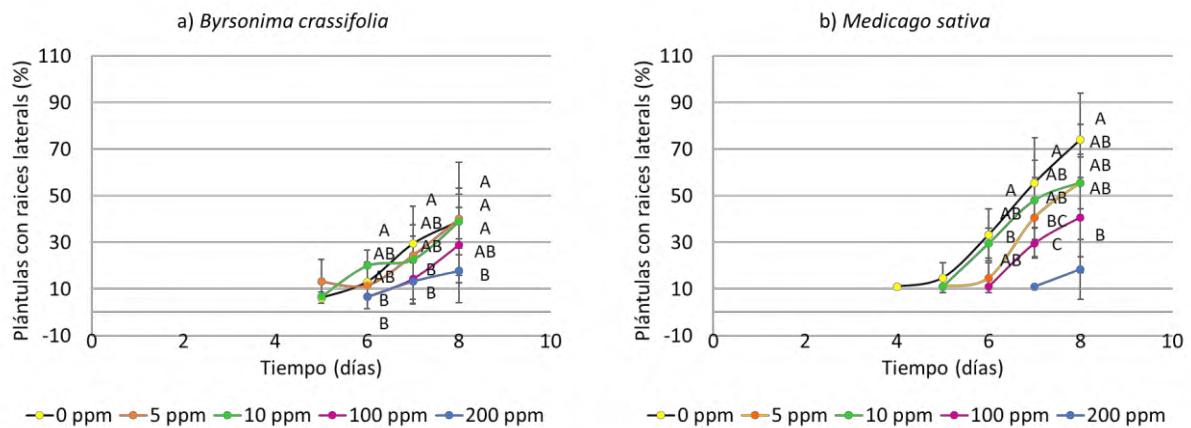


Figura 12. Efecto de diferentes concentraciones de extracto hexánico de *B. crassifolia* (a), y *M. sativa* (b) sobre el porcentaje de plántulas con raíces laterales de *B. brizantha* (Organismo diana). Se observa que con el extracto hexánico de *B. crassifolia* la concentración de 200 ppm disminuyó significativamente el porcentaje de plantas con raíces laterales de manera significativa ($P \leq 0.05$) con respecto al Testigo (-●-) entre los días 6 y 8, y 100 ppm a los días 6 y 7. Para *M. sativa*, las concentraciones de 100 y 200 ppm disminuyeron significativamente el porcentaje de raíces laterales a algunos tiempos entre el día 6 y 8. Letra A significativamente mayor, letras distintas indican diferencias con Fisher, $n \geq 60$.

En la Tabla 15 se muestra que a la concentración de 200 ppm se disminuye el porcentaje de plantas con raíz lateral a tiempo final, pero a ninguna concentración se ve afectada la longitud máxima de la raíz lateral más larga ni el número de raíces laterales por planta a tiempo final. El extracto hexánico de *M. sativa* se comporta de manera similar que el extracto hexánico de *B. crassifolia*, disminuye el porcentaje de plantas con raíz lateral a tiempo final a la concentración de 200 ppm, pero a ninguna concentración se ve afectada la longitud máxima de la raíz lateral más larga ni el número de raíces laterales por planta a tiempo final.

Tabla 15. Cuadro comparativo de los parámetros de crecimiento de las raíces laterales de *B. brizantha* (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto hexánico *B. crassifolia* o *M. sativa* evaluados en el tiempo final (día 8).

Concentración (ppm)	<i>Byrsonima crassifolia</i>			<i>Medicago sativa</i>		
	Plantas con raíz (%)	Numero de raíces por planta	Longitud máxima de raíz lateral más larga (mm)	Plantas con raíz (%)	Numero de raíces por planta	Longitud máxima de raíz más larga (mm)
0	39.2 ± 11.6	1.9 ± 0.3	10.1 ± 2.0	74.1 ± 6.4	2.1 ± 0.3	9.8 ± 2.5
5	40.0 ± 24.2	2.3 ± 1.1	9.8 ± 2.6	55.6 ± 11.1	1.8 ± 0.5	8.4 ± 2.2
10	38.9 ± 14.2	1.7 ± 0.6	8.1 ± 1.5	55.6 ± 38.5	2.0 ± 0	8.8 ± 2.3
100	28.9 ± 16.2	1.3 ± 0.2	10.4 ± 2.8	40.7 ± 17.0	1.7 ± 0.4	11.7 ± 4.0
200	17.8 ± 13.8 *	1.6 ± 0.7	14.3 ± 7.2	18.5 ± 12.8 *	2.0 ± 1.7	6.5 ± 1.8

* Indica diferencia significativa respecto al Testigo, con Fisher.

El extracto hexánico de *B. crassifolia* a 200 ppm inhibió el porcentaje de plantas con raíz lateral a tiempo final en un 54.6%, mientras que el extracto hexánico de *M. sativa* a la misma concentración lo hizo en un 75%, por lo cual el extracto de *M. sativa* tiene un mayor efecto que el de *B. crassifolia* en el parámetro de las raíces laterales, y se considera que su efecto está focalizado en el crecimiento de la raíz lateral. Al igual que con el extracto etanólico y de acetato de etilo, este parámetro no puede contrastarse con la bibliografía.

8.3.4. Efecto de los extractos de *Byrsonima crassifolia* sobre el crecimiento de la parte aérea de *B. brizantha*.

En esta sección se evalúa el desarrollo de la parte aérea de la plántula, incluyendo tallo y hojas. Se cuantificó la longitud total de la parte aérea, el porcentaje de plántulas con 1 o 2 hoja y se expresó como porcentaje. Así mismo se calculó el tiempo de crecimiento 50 de la parte aérea, es decir, el tiempo en que cada tratamiento llegó al 50% de la longitud promedio del Testigo a tiempo final (día 8).

8.3.4.1. Efecto del extracto etanólico sobre la parte aérea de *B. brizantha*.

En la Figura 13a, se muestra que el extracto etanólico de *B. crassifolia* disminuye el porcentaje de plantas con una hoja de *Brachiaria brizantha* a 100 y 200 ppm en el día 7 y a todas las concentraciones utilizadas en el día 8. En cuanto a este parámetro, los tratamientos no se

recuperan, si no que su efecto se marca más con el tiempo. Por otro lado, el extracto etanólico de *M. sativa* (Figura 13b) también disminuye el porcentaje de plantas con una hoja a 5, 100 y 200 ppm en el día 5; al día 6 todas las concentraciones muestran disminución, sin embargo, las plantas tienden a igualarse con el Testigo, de modo que en el día 8, únicamente persiste el efecto en las concentraciones de 5 y 200 ppm. Esto indica que el efecto sobre el porcentaje de plántulas a las concentraciones de 10 y 100 ppm de *M. sativa*, en transitorio, a diferencia del extracto de *B. crassifolia*, donde ningún tratamiento se recupera.

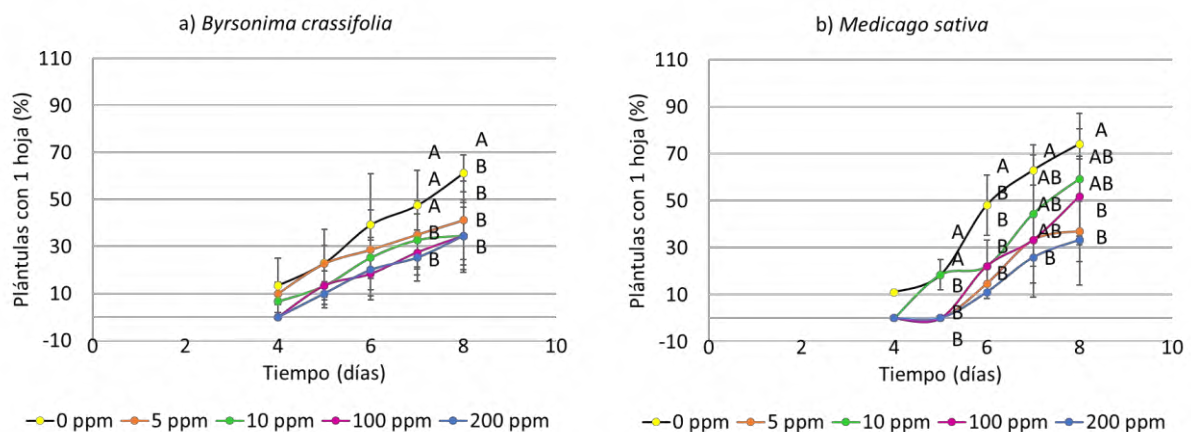


Figura 13. Efecto de diferentes concentraciones de extracto etanólico de *B. crassifolia* (a), y *M. sativa* (b) sobre la aparición de la primera hoja de plántulas de *B. brizantha* (Organismo diana). Se observa que todos de los tratamientos de *B. crassifolia* disminuyeron el porcentaje de plántulas con 1 hoja de manera significativa con respecto al Testigo (-●-). Para *M. sativa*, la concentración de 200 ppm disminuyó significativamente el porcentaje de plantas con una hoja en todos los tiempos, mientras que 5 y 100 ppm mostraron disminución significativa solo a algunos tiempos. Letra A significativamente mayor, letras distintas indican diferencias con Fisher, $n \geq 60$.

En la Tabla 16 se observa que tanto 100 como 200 ppm de extracto etanólico de *B. crassifolia* disminuyen la longitud máxima y la velocidad de crecimiento de la parte aérea, parámetro que se calcula con su tiempo de crecimiento 50, pero todas las concentraciones disminuyen el porcentaje de plantas con una hoja a tiempo final y ningún tratamiento distinto al Testigo presentó plantas con 2 hojas, lo cual implica que retrasan el establecimiento, pero con los tiempos evaluados no puede afirmarse aún que lo reduce, ya que en el Testigo solo se alcanzó el 6.7%. Mientras tanto, con el extracto etanólico de *M. sativa*, todas las concentraciones utilizadas disminuyeron la

longitud máxima de la parte aérea, pero solo 100 y 200 ppm disminuyeron la velocidad de crecimiento de esta. Solo 5 y 200 disminuyen el porcentaje de plantas con una hoja a tiempo final y ningún tratamiento distinto al Testigo presentó plantas con 2 hojas lo cual implica que el extracto retrasa el establecimiento, pero con los tiempos evaluados no puede afirmarse aún que lo reduce, ya que en el Testigo solo se alcanzó el 11.1%.

Tabla 16. Cuadro comparativo de los parámetros de crecimiento de la parte aérea de *B. brizantha* (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto etanólico *B. crassifolia* o *M. sativa* evaluadas a tiempo final (días 8).

Concentración (ppm)	<i>Byrsonima crassifolia</i>				<i>Medicago sativa</i>			
	Longitud máxima (mm)	Velocidad de crecimiento (días)**	Plántulas (%)		Longitud máxima (mm)	Velocidad de crecimiento (días)**	Plántulas (%)	
			1 hoja	2 hojas			1 hoja	2 hojas
0	25.7 ± 3.6	4.8 ± 2.2	61.1 ± 7.8	6.7 ± 0	27.5 ± 2.0	4.7 ± 0.2	74.1 ± 6.4	11.1 ± 0
5	24.1 ± 6.8	4.4 ± 2.7	41.1 ± 16.6 *	-	20.1 ± 1.8 *	6.5 ± 0.4	37.0 ± 12.8 *	-
10	20.1 ± 4.8	5.4 ± 1.0	34.4 ± 15.4 *	-	21.9 ± 3.2 *	5.7 ± 0.3	59.3 ± 28.0	-
100	19.7 ± 5.3 *	6.5 ± 1.0 *	34.4 ± 12.2 *	-	20.4 ± 2.3 *	6.7 ± 1.0 *	51.9 ± 17.0	-
200	18.1 ± 3.3 *	6.5 ± 0.7 *	34.4 ± 14.2 *	-	14.5 ± 4.2 *	8.5 ± 2.1 *	33.3 ± 19.2 *	-

* Indica diferencia significativa respecto al Testigo, con Fisher.

** Obtenida a partir del tiempo de crecimiento 50, como se indica en la Tabla 5.

Con el extracto etanólico de *B. crassifolia*, ninguno de los parámetros mostró diferencia significativa entre los tratamientos con efecto, por lo cual la disminución del porcentaje de plantas con 1 hoja a tiempo final no es dependiente de la concentración, pero se considera que los mejores tratamientos fueron 200 ppm y 100 ppm, ya que ambos afectaron todos los parámetros evaluados para parte aérea y no presentaron diferencias significativas entre ellos, seguidos por 5 y 100 ppm sin diferencia entre ellos, ya que ambos afectan el porcentaje de plantas con 1 hoja a tiempo final.

El mejor tratamiento del extracto etanólico de *M. sativa* fue a la concentración de 200 ppm ya que afectó todos los parámetros evaluados para parte aérea, además disminuir significativamente la longitud con respecto a los demás tratamientos; fue seguido por 5 ppm que

disminuyó longitud máxima y porcentaje de plantas con 1 hoja a tiempo final, y después 100 ppm ya que afecta la longitud máxima de parte aérea y disminuyó la velocidad de crecimiento. Estos últimos tratamientos no muestran diferencia significativa entre ellos, solo se ordenaron de acuerdo a la cantidad y tipo de parámetro que afectan.

Estos resultados indicaron que tanto los extractos etanólicos de *B. crassifolia* como los de *M. sativa* afectan el crecimiento de la parte aérea de *Brachiaria brizantha*, pero no es posible evaluar a cuál de los dos extractos presenta mayor sensibilidad, ya que ambos afectaron desde 5 ppm, pero a parámetros distintos; el extracto de *B. crassifolia* tuvo efecto principalmente sobre la longitud de la parte aérea y el extracto de *M. sativa* sobre el porcentaje de plantas con 1 hoja.

Los extractos de *B. crassifolia* a las concentraciones de 100 y 200 ppm presentaron un porcentaje de inhibición del crecimiento de la parte aérea de 23.3% y 29.6%, respectivamente (Tabla 16). Este porcentaje de inhibición es superior al obtenido por Kowthar et al. (2019), quien reportó valores de 25 y 30%, utilizando extractos de otras Malpighiales sobre *Echinochloa colonum* de la misma tribu que *B. brizantha*). Adicionalmente, utilizó una concentración de 300,000 ppm de extracto, (1,500 veces superior a la mayor utilizada en el trabajo experimental de esta tesis); por lo cual los extractos de *B. crassifolia* tienen la ventaja de inhibir la parte aérea en un modo similar a menores concentraciones. Aunque el porcentaje de inhibición fue inferior al reportado por Elshamy et al. (2019), quienes obtuvieron 57.6% con una concentración similar a 100 ppm, sin embargo, esta se obtuvo con aceites esenciales en lugar de extracto, lo cual abre la posibilidad de que se deba a compuestos volátiles que no pueden recuperarse con el método de extracción utilizado en este estudio.

Se ha reportado previamente la inhibición de la parte aérea de plantas pertenecientes a la misma familia que *B. brizantha* (Abdul-Rahman y Habib, 1989), donde se reportó que la tierra en la que previamente se sembró *M. sativa* disminuía en un 88% la longitud de la parte aérea de *Imperata cylindrica*, el efecto inhibitorio en este trabajo de tesis es menor, sin embargo, es difícil hacer una comparación cuantitativa ya que no es posible saber la concentración equivalente en extracto que tendría, pues utilizaron tierra para realizar el tratamiento. Además, la tierra de la *M. sativa* tiene potencialmente una mayor variedad de compuestos presentes en la planta, ya que no se separaron por afinidad a solventes.

8.3.4.2. Efecto del extracto obtenido con acetato de etilo sobre la parte aérea de *B. brizantha*.

En la Figura 14a, se muestra que el extracto obtenido con acetato de etilo de *B. crassifolia* disminuye el porcentaje de plantas con 1 hoja en *Brachiaria brizantha* a las concentraciones de 100 y 200 ppm al día 4 y 7, a 200 y 5 ppm en el día 5, y a 5, 100 y 200 ppm en el día 6 y 8. Los lotes de plantas tratadas con estas 3 concentraciones no se regeneran con el tiempo en cuanto a su porcentaje de plantas con 1 hoja. En la Figura 14b se muestra que el extracto obtenido con acetato de etilo de *M. sativa* disminuye el porcentaje de plantas con 1 hoja en *Brachiaria brizantha* a la concentración de 100 en los días 5 y 6, a días posteriores se recupera, pero simultáneamente la concentración de 200 ppm disminuye su aumento en porcentaje de plantas con 1 hoja, por lo cual muestra disminución significativa con respecto al Testigo al día 7 y 8, y la aumenta con 5 ppm al día 5.

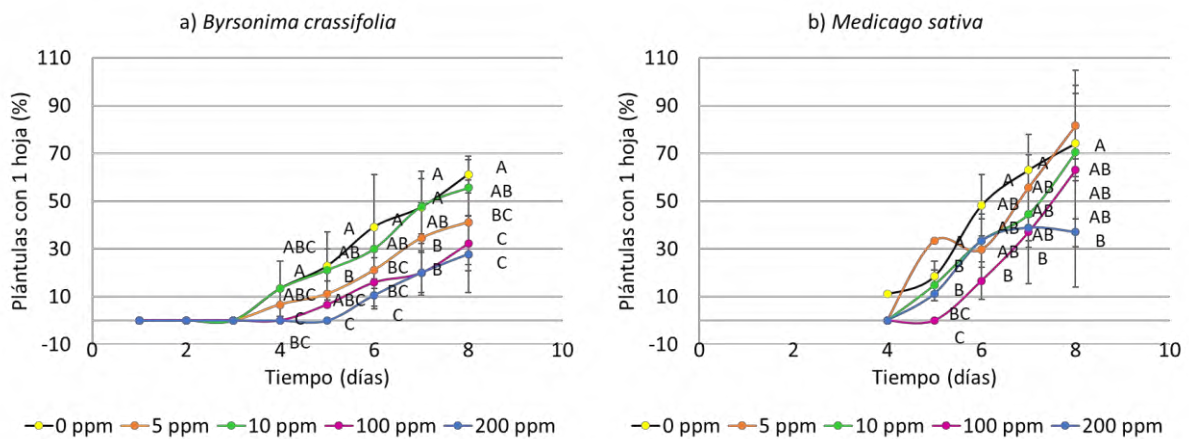


Figura 14. Efecto de diferentes concentraciones de extracto obtenido con acetato de etilo de *B. crassifolia* (a), y *M. sativa* (b) sobre la aparición de la primera hoja de plántulas de *B. brizantha* (Organismo diana). Se observa que las concentraciones de 5, 100 y 200 ppm de *B. crassifolia* disminuyeron el porcentaje de plántulas con 1 hoja de manera significativa con respecto al Testigo (-●-). en la mayoría de los tiempos entre los 4 y 8 días. Para *M. sativa*, la concentración de 100 ppm disminuyó significativamente el porcentaje de plantas con 1 hoja entre los días 5 y 6 y 200 ppm a los días 7 y 8. Letra A significativamente mayor, letras distintas indican diferencias con Fisher, $n \geq 60$.

En la Tabla 17 se observa que, con el extracto obtenido con acetato de etilo de *B. crassifolia*, tanto 100 como 200 ppm disminuyen la longitud máxima de la parte aérea y la velocidad de crecimiento

de la parte aérea, calculado por el tiempo de crecimiento 50 de la parte aérea. 5, 100 y 200 ppm disminuyen el porcentaje de plantas con 1 hoja a tiempo final. En el caso del extracto de *M. sativa*, únicamente la concentración de 200 ppm disminuye la longitud máxima de la parte aérea, disminuye la velocidad de crecimiento de la misma y disminuyen el porcentaje de plantas con 1 hoja a tiempo final. En ningún tratamiento con ninguno de los 2 extractos se presentaron plantas con 2 hojas. La falta de aparición de la segunda hoja implica el retraso del establecimiento y la posibilidad de inhibición del mismo, pero no puede asegurarse sin mayor tiempo de estudio posterior, ya que en el Testigo solo se alcanzó el 6.7% en los extractos de *B. crassifolia* y 11.1% en los extractos de *M. sativa*.

Tabla 17. Cuadro comparativo de los parámetros de crecimiento de la parte aérea de *B. brizantha* (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto obtenido con acetato de etilo *B. crassifolia* o *M. sativa* evaluadas a tiempo final (días 8).

Concentración (ppm)	<i>Byrsonima crassifolia</i>				<i>Medicago sativa</i>			
	Longitud máxima (mm)	Velocidad de crecimiento (días)**	Plántulas (%)		Longitud máxima (mm)	Velocidad de crecimiento (días)**	Plántulas (%)	
			1 hoja	2 hojas			1 hoja	2 hojas
0	25.7 ± 3.6	4.8 ± 2.2	61.1 ± 7.8	6.7 ± 0	27.5 ± 2.0	4.7 ± 0.2	74.1 ± 6.4	11.1 ± 0
5	23.4 ± 2.6	5.0 ± 2.5	41.1 ± 17.6 *	-	22.0 ± 3.0	6.0 ± 0.4	81.5 ± 23.1	-
10	27.9 ± 2.1	5.5 ± 0.2	55.6 ± 11.7	-	28.1 ± 9.5	5.5 ± 0.8	70.4 ± 28.0	-
100	17.2 ± 5.9 *	7.2 ± 1.7 *	32.2 ± 11.5 *	-	20.6 ± 1.2	6.6 ± 0.5	63.0 ± 32.1	-
200	17.7 ± 4.1 *	7.2 ± 0.8 *	27.8 ± 16.0 *	-	16.4 ± 8.6 *	8.8 ± 4.1 *	37.0 ± 23.1*	-

* Indica diferencia significativa respecto al Testigo, con Fisher.

** Obtenida a partir del tiempo de crecimiento 50, como se indica en la Tabla 5.

Se consideró que los mejores tratamientos con el extracto de *B. crassifolia* fueron 100 y 200 ppm, ya que ambas afectaron todos los parámetros evaluados y no presentan diferencias significativas entre ellos, pero son quienes presentan mayor diferencia respecto al Testigo, seguidas por 5 ppm que solo disminuye el porcentaje de plantas con una hoja a tiempo final. La parte aérea de *B. brizantha* es más sensible al extracto obtenido con acetato de etilo de *B. crassifolia* que al de *M.*

sativa, ya que el de *B. crassifolia* afecta de manera similar al de *M. sativa* de 200 ppm tanto a la misma concentración como a 100 ppm, que es 50% más diluido.

Los extractos de *B. crassifolia* a concentraciones de 100 y 200 ppm presentaron un porcentaje de inhibición del crecimiento de la parte aérea de 33.1% y 33.5%, respectivamente. Este porcentaje de inhibición es superior al obtenido por Kowthar et al. (2019) e inferior al reportado por Elshamy et al. (2019), de modo que, al igual que con el extracto etanólico de *B. crassifolia*, se puede ver la ventaja de un mayor porcentaje de inhibición de longitud de parte aérea a menor concentración que en Kowthar et al. (2019) y una posible diferencia de efecto en Elshamy et al. (2019) debido al método de extracción.

A 200 ppm, el extracto obtenido con acetato de etilo de *M. sativa* inhibió el crecimiento de la parte aérea de *B. brizantha* en un 40%. Abdul-Rahman y Habib (1989) utilizaron plantas componteadas de *M. sativa* sobre en unas plantas pertenecientes a la misma familia, donde se reportó la inhibición en un 88% con respecto al Testigo, embargo, es difícil hacer una comparación cuantitativa directa, ya que no se obtuvieron extractos.

8.3.4.3. Efecto del extracto hexánico sobre la parte aérea de *B. brizantha*

En la Figura 15a se observa que el extracto hexánico de *B. crassifolia* disminuyó el porcentaje de plantas con 1 hoja en *Brachiaria brizantha* a 10, 100 y 200 ppm al día 5, pero los tratamientos se igualaron al Testigo, hasta que únicamente la concentración de 200 ppm disminuyó de manera significativa el porcentaje de plantas con 1 hoja a tiempo final. Mientras que, el extracto hexánico de *M. sativa* (Figura 15b) disminuyó el porcentaje de plantas con 1 hoja en *Brachiaria brizantha* con la concentración de 100 ppm al día 6, al día 7 con las concentraciones de 100 y 200 ppm, pero el porcentaje se igualó al Testigo hasta que en el día 8 ninguna de las concentraciones utilizadas muestra diferencias significativas, debido a su gran desviación estándar.

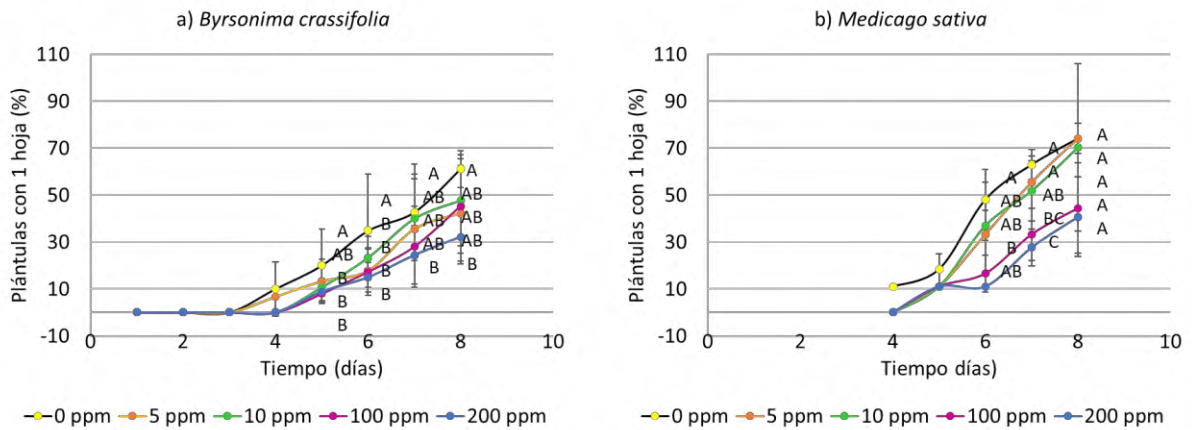


Figura 15. Efecto de diferentes concentraciones de extracto hexánico de *B. crassifolia* (a), y *M. sativa* (b) sobre la aparición de la primera hoja de plántulas de *B. brizantha* (Organismo diana). Se observa que algunas de las concentraciones de *B. crassifolia* disminuyeron significativamente ($P \leq 0.05$) el porcentaje de plántulas con 1 hoja de manera significativa con respecto al Testigo (-●-) a algunos días entre el día 5 y 8, solo 200 ppm la disminuyó en todos los tiempos. Para *M. sativa*, la concentración de 200 ppm disminuyó significativamente ($P \leq 0.05$) el porcentaje de plantas con una hoja a los días 6 y 7, y la de 100 ppm al día 6. Letra A significativamente mayor, letras distintas indican diferencias con Fisher, $n \geq 60$.

En la Tabla 18 se muestra que tanto 100 como 200 ppm disminuyeron la longitud máxima de la parte aérea, pero únicamente 200 ppm disminuyó la velocidad de crecimiento de la parte aérea, calculada por el tiempo de crecimiento 50, esta misma concentración también disminuye el porcentaje de plantas con 1 hoja a tiempo final. Con el extracto hexánico de *M. sativa*, únicamente 200 ppm disminuyó tanto la longitud máxima de la parte aérea como su velocidad de crecimiento, pero ninguna concentración afecta el porcentaje de plantas con 1 hoja a tiempo final ni presentaron plantas con 2 hojas. La falta de plantas con 2 hojas en los tratamientos, pero presencia en el Testigo, implica un retraso en el establecimiento en todos los tratamientos, pero se requiere estudiar por más días para poder confirmar si lo inhibe, ya que en el Testigo solo se alcanzó en promedio un 8.9% de establecimiento.

Tabla 18. Cuadro comparativo de los parámetros de crecimiento de la parte aérea de *B. brizantha* (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto hexánico de *B. crassifolia* o *M. sativa* evaluadas a tiempo final (días 8).

Concentración (ppm)	<i>Byrsonima crassifolia</i>				<i>Medicago sativa</i>			
	Longitud máxima (mm)	Velocidad de crecimiento (días)**	Plántulas (%)		Longitud máxima (mm)	Velocidad de crecimiento (días)**	Plántulas (%)	
			1 hoja	2 hojas			1 hoja	2 hojas
0	25.7 ± 3.6	4.8 ± 2.2	61.1 ± 7.8	6.7 ± 0	27.5 ± 2.0	4.7 ± 0.2	74.1 ± 6.4	11.1 ± 0
5	22.3 ± 2.5	6.2 ± 0.6	42.2 ± 20.5	-	21.5 ± 5.9	6.1 ± 0.9	74.1 ± 6.4	-
10	23.5 ± 2.3	5.8 ± 0.6	47.8 ± 19.5	-	29.6 ± 3.3	5.4 ± 0.6	70.4 ± 35.7	-
100	21.4 ± 1.8 *	6.2 ± 0.4	45.3 ± 20.2	-	20.8 ± 3.8	6.5 ± 1.0	44.4 ± 19.2	-
200	16.4 ± 4.7 *	7.3 ± 1.0 *	32.2 ± 11.5 *	-	15.2 ± 4.2 * *	8.6 ± 2.1 * *	40.7 ± 17.0	-

* Indica diferencia significativa respecto al Testigo, con Fisher.

** Obtenida a partir del tiempo de crecimiento 50, como se indica en la Tabla 5.

En el extracto hexánico de *B. crassifolia*, el mejor tratamiento fue 200 ppm, ya que afectó de manera significativa todos los parámetros considerados para parte aérea, seguido por 100 ppm, que disminuyó la longitud máxima de la parte aérea. El efecto del extracto hexánico de *B. crassifolia* sobre la parte aérea es preferible al del extracto de *M. sativa*, ya que a 200 ppm *B. crassifolia* afecta todos los parámetros evaluados y también afecta la longitud máxima de la parte aérea a 100 ppm, mientras que *M. sativa* solo afecta la longitud y velocidad de crecimiento de parte aérea con 200 ppm.

El extracto hexánico de *B. crassifolia* con concentración de 200 ppm es el que tuvo mayor promedio de inhibición de la longitud de la parte aérea de *B. brizantha* entre los extractos de *B. crassifolia* utilizados en la parte experimental de esta tesis, con porcentaje promedio de inhibición de 36.2%, seguida por el de acetato de etilo con concentración de 100 ppm con 33.1% y el etanólico a concentración de 200 ppm de 29.6%, a pesar de que no muestran diferencia significativa entre ellos. La comparación de la actividad del extracto hexánico a 200 ppm es igual a la comparación realizada previamente para los extractos con actividad de acetato de etilo y etanólico, en la cual su porcentaje de inhibición es superior al obtenido por Kowthar et al. (2019) e inferior al obtenido por Elshamy et al. (2019).

A 200 ppm, el extracto hexánico de *M. sativa* inhibió el crecimiento de la parte aérea de *B. brizantha* en un 45.7%, lo cual es menor a lo reportado por Abdul-Rahman y Habib (1989) en una planta perteneciente a la misma familia, la discusión de este resultado es la misma que la mencionada previamente para con el extracto obtenido con acetato de etilo de *M. sativa* a 200 ppm.

8.4. Prueba de toxicidad sobre un cultivo de interés agronómico (PTCIA).

Se realizó una prueba de toxicidad en cultivo de interés agronómico (PTCIA), para evaluar el efecto de los extractos en el cultivo de interés con respecto a la maleza. Para esto se propuso *Zea mays*, otra planta monocotiledónea. Se evaluaron las mismas concentraciones del ensayo con *B. brizantha*.

8.4.1. Efecto del extracto de *Byrsonima crassifolia* sobre la germinación de *Zea mays* (PTCIA)

En la Figura 16a, se muestra que el extracto etanólico de *B. crassifolia* disminuyó el porcentaje de germinación de semillas de *Z. mays*, como prueba de toxicidad en cultivo de interés agronómico (PTCIA), a 100 y 5 ppm el primer día, a todas las concentraciones a las 30 horas y a 100 y 200 ppm al día 2 y 3. Por otro lado, el extracto obtenido con acetato de etilo de *B. crassifolia* (Figura 16b) mostró disminución de la germinación de semillas de *Z. mays* a todas las concentraciones utilizadas al día 1 y 2, pero 5, 10 y 200 ppm se igualaron al Testigo a partir del día 2, por lo cual al tiempo final únicamente 100 ppm mantuvo el efecto al día 8.

El extracto hexánico (Figura 16c) de *B. crassifolia* disminuyó el porcentaje de germinación de semillas de *Z. mays* con las concentraciones de 5, 10 y 100 ppm al día 1 y 2, a 100 ppm a las 30 horas, pero 5 ppm se igualó al Testigo, de modo que solo las concentraciones de 10 y 100 ppm muestran disminución significativa del porcentaje de germinación al día 3. La concentración de 100 ppm mostró una disminución significativa en todos los tiempos evaluados.

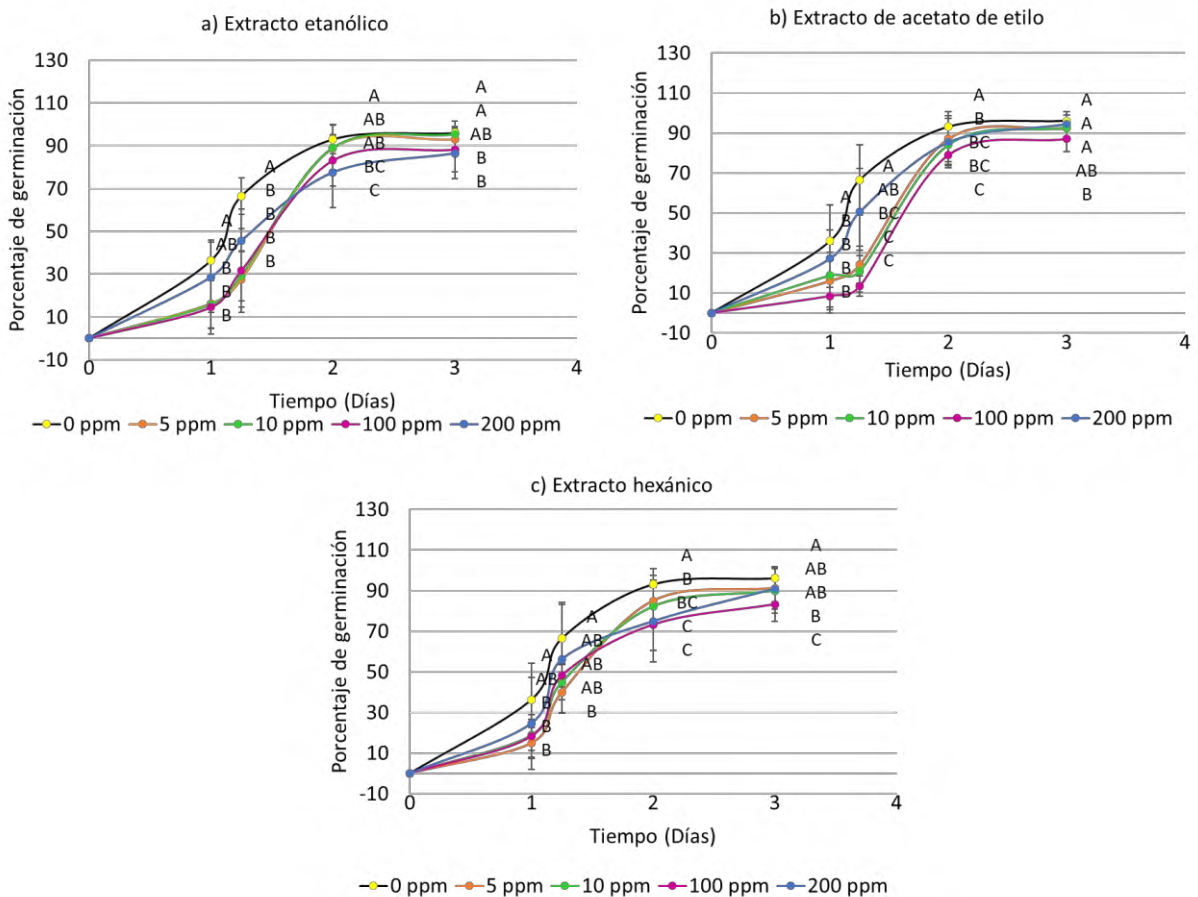


Figura 16. Efecto de diferentes concentraciones de extracto etanólico (a), de acetato de etilo (b) y hexánico (c) de *B. crassifolia* sobre el porcentaje de germinación diaria de semillas de *Z. mays* (PTCIA). Se observa que algunos tratamientos del extracto etanólico (a), de acetato de etilo (b) y hexano (c) disminuyeron significativamente ($P < 0.05$) el porcentaje de germinación con respecto al Testigo (-●-) en algunos tiempos entre el día 1 y 3. Letra A significativamente mayor, letras distintas indican diferencias con Fisher, $n \geq 60$.

En la Tabla 19 se observa que el extracto etanólico, disminuyó la velocidad de germinación, (calculada mediante el tiempo de germinación 50) en todas las concentraciones; pero como a las concentraciones de 5 y 10 ppm las semillas tendieron a igualarse con el Testigo, únicamente las concentraciones de 100 y 200 ppm disminuyen el porcentaje de germinación máxima y aumentaron la tasa de inhibición. Si bien los tratamientos de extracto etanólico mostraron diferencias significativas respecto al Testigo no muestran diferencias significativas entre ellos, el

menor promedio de germinación máxima y mayor de tasa de inhibición se obtuvo con 200 ppm, seguido por 100 ppm.

Con el extracto obtenido con acetato de etilo, únicamente 200 ppm disminuyen significativamente porcentaje de germinación respecto al Testigo y por lo tanto también un aumento en su tasa de inhibición; sin embargo, las concentraciones entre 5 y 100 ppm disminuyeron la velocidad de germinación.

Con el extracto hexánico, únicamente las concentraciones de 10 y 100 ppm muestran disminución en la germinación máxima y aumento en la tasa de inhibición, pero todas las concentraciones disminuyeron la velocidad de germinación. De acuerdo al análisis estadístico, el mejor tratamiento con este extracto fue el de la concentración de 100 ppm, seguido por 10 ppm.

Tabla 19. Cuadro comparativo de los parámetros de germinación de semillas de *Z. mays* (PTCIA) tratadas con distintas concentraciones de extracto de *B. crassifolia* evaluados en el tiempo final.

Extracto	Etanólico			De acetato de etilo			Hexánico		
	Germinación máxima (%)	Velocidad de germinación (días)**	Tasa de inhibición (%)	Germinación máxima (%)	Velocidad de germinación (días)	Tasa de inhibición (%)	Germinación máxima (%)	Velocidad de germinación (días)**	Tasa de inhibición (%)
0	96.1 ± 2.5	1.0 ± 0.1	0 ± 0.7	96.1 ± 4.6	1.0 ± 0.1	0 ± 0.7	96.1 ± 4.6	1.0 ± 0.1	0 ± 0.7
5	92.9 ± 6.2	1.5 ± 0.1 *	3.3 ± 3.0	92.5 ± 6.4	1.6 ± 0.2 *	3.9 ± 2.6	91.3 ± 10.5	1.6 ± 0.0 *	5 ± 5.2
10	95.4 ± 6.1	1.5 ± 0.2 *	0.7 ± 3.0	92.7 ± 6.3	1.6 ± 0.1 *	3.5 ± 2.2	90 ± 11.1 *	1.6 ± 0.2 *	6.3 ± 3.4 *
100	88.3 ± 10.6 *	1.6 ± 0.2 *	8.0 ± 2.7 *	87 ± 6.1 *	1.7 ± 0.2 *	9.4 ± 2.1 *	83.3 ± 8.6 *	1.7 ± 0.2 *	13.2 ± 2.0 *
200	86.4 ± 11.6 *	1.6 ± 0.4 *	10.1 ± 0.3 *	84.4 ± 6.4	1.3 ± 0.3	2.3 ± 3.6	91.0 ± 6.6	1.5 ± 0.5 *	5.2 ± 4.4

* Indica diferencia significativa respecto al Testigo, con Fisher.

** Obtenida a partir del tiempo de germinación 50, como se indica en la Tabla 4.

Los datos anteriores sugieren que *Z. mays* es menos sensible al extracto etanólico de *B. crassifolia* que *B. brizantha*, ya que solo se ve afectado de manera considerable a las concentraciones más altas, 100 y 200 ppm, mientras que *B. brizantha* se ve afectada a todas las concentraciones, además las tasas de inhibición con diferencia significativa en *Z. mays* son de 8 y 10.1 %, mientras que en *B. brizantha* son entre 35.8 y 39.7%, afectando así en un 417.1% a *B. brizantha* más de lo que afecta a *Z. mays*. Con esto podemos ver que el extracto de etanólico de *B. crassifolia* podría

utilizarse en un cultivo de *B. brizantha* y *Z. mays* a 5 o 10 ppm, con lo que inhibiría la germinación de *B. brizantha*, pero no la de *Z. mays*.

Z. mays es menos sensible al extracto obtenido con acetato de etilo de *B. crassifolia* que *B. brizantha*, ambas solo se ven afectadas de manera considerable a concentraciones altas, 100 y 200 ppm para *B. brizantha* y 100 ppm para *Z. mays*, pero las tasas de inhibición con diferencia significativa en *Z. mays* son de 9.4%, mientras que en *B. brizantha* son de 23.2% a la misma concentración y de 40.7% a 200 ppm, afectando así en un 246.8 y 433% más a *B. brizantha*. Con esto podemos ver que el extracto obtenido con acetato de etilo de *B. crassifolia* podría utilizarse para inhibir el crecimiento de *B. brizantha* y *Z. mays* a 200 ppm, que es la mejor concentración para inhibir la germinación para *B. brizantha*, pero no afecta la de *Z. mays*.

Z. mays es menos sensible al extracto hexánico de *B. crassifolia* que *B. brizantha*, *B. brizantha* se ven afectadas de manera considerable a concentraciones altas, 100 y 200 ppm y, 10 y 100 ppm para *Z. mays*, pero las tasas de inhibición con diferencia significativa en *Z. mays* son de 6.3 y 13.2 %, mientras que en *B. brizantha* a 100 ppm es de 44.2%, afectando así en un 334.8 % más a *B. brizantha*. Como el extracto hexánico de *B. crassifolia* afecta principalmente a 100 ppm a ambos cultivos, no sería posible con la información que se tiene proponer una manera de utilizarlo en un cultivo con ambas plantas en la que no afecte a *Z. mays*, por lo cual sería mejor utilizar el extracto etanólico.

En cuanto a los parámetros de germinación podemos concluir que en general *B. brizantha* es más sensible a los extractos de *B. crassifolia* que *Z. mays*.

En contraste, se ha reportado previamente que *M. sativa* reduce el rendimiento de granos de *Z. mays* entre el 23 y 53%. Esto fue utilizando *M. sativa* como cobertura para *Z. mays*, como los cultivos se sembraron en conjunto en lugar de aplicarse un extracto, no podría compararse una concentración utilizada (Ghosheh, Bsoul y Abdullah, 2004).

8.4.2. Efecto de los extractos de *Byrsonima crassifolia* sobre el establecimiento de *Zea mays* (PTCIA).

Al igual que con las pruebas de efecto de extractos de *B. crassifolia* sobre la germinación, en el establecimiento también es importante realizar pruebas de toxicidad sobre cultivos de interés

agronómico (PTCIA) para evitar utilizar un producto que dañe el establecimiento de la maleza, pero afecte del mismo modo al cultivo. Estas se realizaron con *Z. mays*.

8.4.2.1. Efecto del extracto de *Byrsonima crassifolia* sobre el crecimiento de la raíz principal de *Zea mays* (PTCIA)

En la Figura 17 (a, b y c) se muestra que ninguna concentración de ningún tipo de extracto de *B. crassifolia* afectó de manera significativa la longitud de la raíz principal a ninguno de los tiempos evaluados.

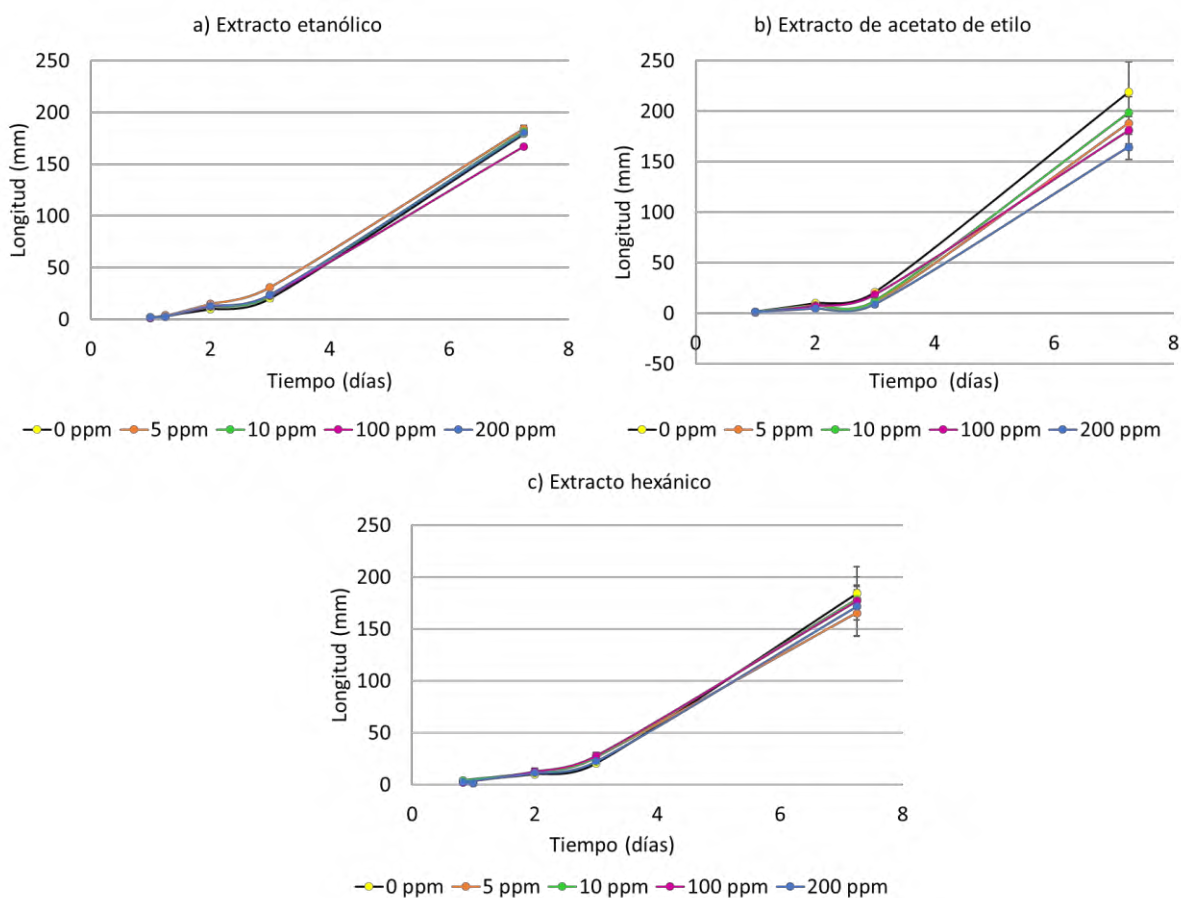


Figura 17. Efecto de diferentes concentraciones de extracto de *B. crassifolia* etanólico (a), de acetato de etilo (b) y hexánico (c) sobre la longitud de la raíz principal de plántulas de *Z. mays* (PTCIA). Se observa que ninguno de los tratamientos de *B. crassifolia* tuvieron efecto significativo con respecto al Testigo (-●) en ninguno de los tiempos evaluados. Letra A significativamente mayor, letras distintas indican diferencias con Fisher, $n \geq 60$.

En la Tabla 20 se muestra que ninguna concentración de ningún tipo de extracto de *B. crassifolia* afectó de manera significativa ninguno de los parámetros evaluados del crecimiento de la raíz principal.

Tabla 20. Cuadro comparativo de los parámetros de crecimiento de la raíz principal de *Z. mays* (PTCIA) tratadas con distintas concentraciones de extracto etanólico, de acetato de etilo y hexánico de *B. crassifolia* evaluados en el tiempo final.

Extracto	Etanólico		De acetato de etilo		Hexánico	
Concentración (ppm)	Longitud máxima (mm)	Velocidad de crecimiento (días)**	Longitud máxima (mm)	Velocidad de crecimiento (días)**	Longitud máxima (mm)	Velocidad de crecimiento (días)**
0	179.5 ± 30.1	4.6 ± 0.5	179.5 ± 30.1	4.6 ± 0.5	179.5 ± 30.1	4.6 ± 0.5
5	184.2 ± 19.2	4.3 ± 0.3	188.1 ± 26.3	4.5 ± 0.4	165.4 ± 22.1	4.9 ± 0.2
10	181.8 ± 29.2	4.5 ± 0.5	198.7 ± 19.5	4.4 ± 0.3	178.5 ± 13.4	4.5 ± 0.2
100	197.0 ± 20.6	4.7 ± 0.3	181.1 ± 13.5	4.6 ± 0.2	176.8 ± 14.3	4.5 ± 0.3
200	180.5 ± 11.2	4.4 ± 0.2	164.4 ± 12.5	4.9 ± 0.2	171.7 ± 28.5	4.7 ± 0.5

* Indica diferencia significativa respecto al Testigo, con Fisher.

** Obtenida a partir del tiempo de crecimiento 50, como se indica en la Tabla 5.

Como el extracto de *B. crassifolia* no afecta los parámetros del crecimiento de la raíz principal sobre *Z. mays*, se comporta del mismo modo que sobre *B. brizantha*, donde tampoco los afectaba significativamente. Con esto se puede afirmar que, bajo las condiciones utilizadas, el extracto etanólico de *B. crassifolia* no presenta efecto sobre el crecimiento de la raíz principal. Por otro lado, las raíces principales de *B. brizantha* son más sensibles al extracto obtenido con acetato de etilo y hexánico de *B. crassifolia* que *Z. mays*, ya que el extracto obtenido con acetato de etilo si afecta negativamente a *B. brizantha* a concentraciones de 100 y 200 ppm, y el hexánico si afecta negativamente a *B. brizantha* a concentraciones de 10 y 200 ppm. Gracias a esto, la raíz principal de *B. brizantha* podría ser inhibida selectivamente bajo este sistema.

8.4.2.2. Efecto del extracto de *Byrsonima crassifolia* sobre el crecimiento de las raíces laterales de *Zea mays* (PTCIA)

En la Figura 18a, se ve que el extracto etanólico de *B. crassifolia* a las concentraciones de 5 y 200 ppm aumenta la longitud de la raíz lateral más larga de *Zea mays* al día 3. En la Figura 18b se muestra que el extracto obtenido con acetato de etilo de *B. crassifolia* disminuye la longitud

máxima de la raíz lateral más larga de *Zea mays* a las concentraciones de 100 y 200 ppm al día 2 de imbibición y a 5, 100 y 200 ppm al día 3. El extracto hexánico de *B. crassifolia* (Figura 19c) se comporta de manera similar al etanólico, aumenta la longitud de la raíz lateral más larga de *Z. mays* a las concentraciones de 10 y 200 ppm en el día 2 y a 10 y 100 ppm en el día 3.

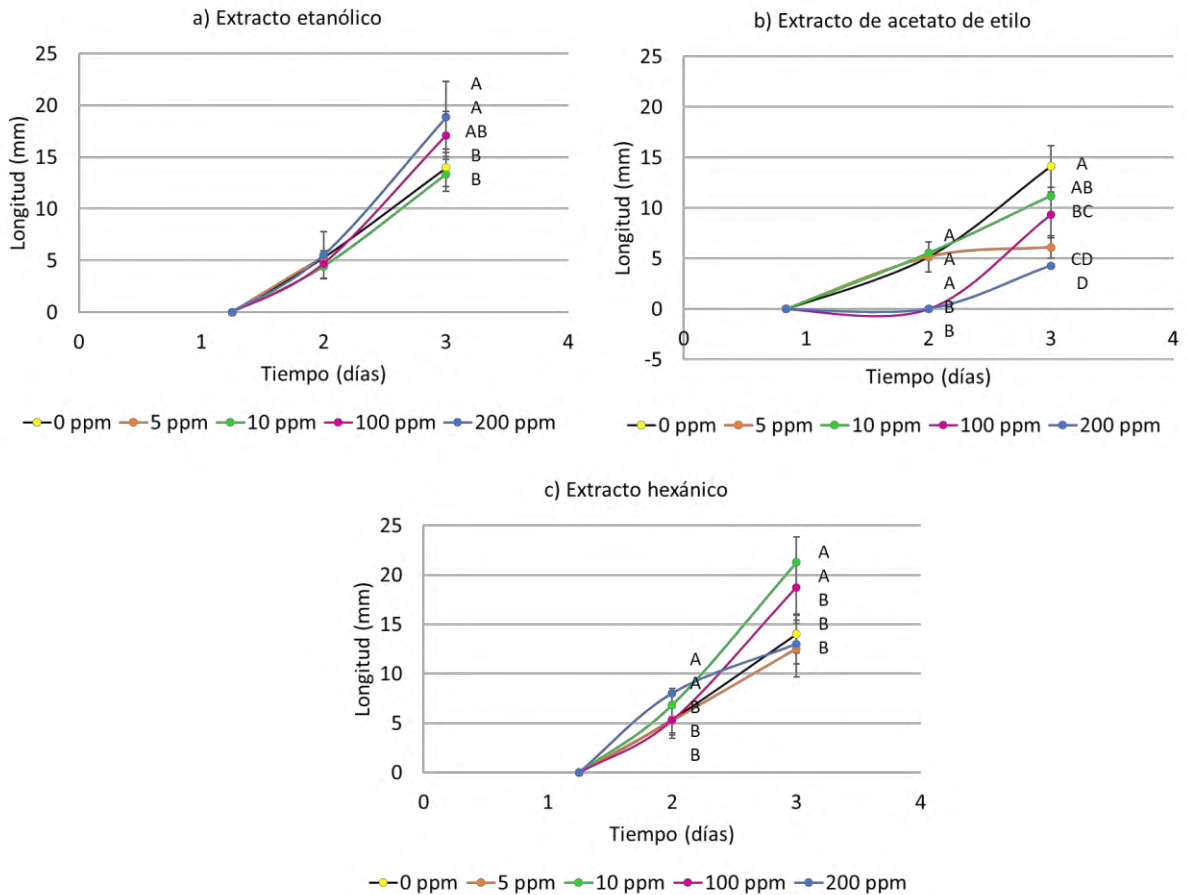


Figura 18. Efecto de diferentes concentraciones de extracto etanólico de *B. crassifolia* etanólico (a), de acetato de etilo (b) y hexánico (c) sobre el porcentaje de plántulas con raíces laterales de *Z. mays* (PTCIA). Se observa que algunos de los tratamientos de *B. crassifolia* tuvieron efecto significativo con respecto al Testigo (-●-), las concentraciones de 100 y 200 ppm del extracto etanólico (a), aumentaron significativamente la longitud de la raíz lateral más larga. El extracto obtenido con acetato de etilo (b) la disminuyó significativamente en el día 2 a las concentraciones de 100 y 200 ppm, y al día 3 a 5, 100 y 200 ppm. el extracto hexánico (c) la aumentó significativamente a 10, 100 y 200 ppm en algunos tiempos entre los días 2 y 3. Letra A significativamente mayor, letras distintas indican diferencias con Fisher, $n \geq 60$.

En la Tabla 21 se muestra que etanólico de *B. crassifolia* a las concentraciones de 5 y 200 ppm aumenta manera significativa con respecto al Testigo la longitud máxima de la raíz lateral más larga y su velocidad de crecimiento, calculada por el tiempo de crecimiento 50. En el caso del extracto obtenido con acetato de etilo, a concentraciones de 5, 100 y 200 ppm disminuye la longitud máxima de la raíz lateral más larga, pero solo disminuye la velocidad de crecimiento a 200 ppm. Similar al extracto etanólico, el extracto hexánico aumentan la longitud máxima de la raíz lateral más larga con respecto al Testigo a las concentraciones de 10 y 100 ppm y aumentan la velocidad de crecimiento de esta a las mismas concentraciones, pero ninguna concentración afecta el número de raíces laterales por planta a tiempo final. Ninguna concentración evaluada de ningún extracto de *B. crassifolia* afecta el número de raíces laterales por planta a tiempo final.

Tabla 21. Cuadro comparativo de los parámetros de crecimiento de las raíces laterales de *Z. mays* (PTCIA) (organismo diana) tratadas con distintas concentraciones de extracto etanólico, de acetato de etilo y hexánico de *B. crassifolia* evaluados en el tiempo final.

Extracto	Etanólico			De acetato de etilo			Hexánico		
	Longitud máxima (mm)	Velocidad de crecimiento (días)**	Numero de raíces por planta	Longitud máxima (mm)	Velocidad de crecimiento (días)	Numero de raíces por planta	Longitud máxima (mm)	Velocidad de crecimiento (días)**	Numero de raíces por planta
0	14.0 ± 1.8	2.6 ± 0.1	5.4 ± 1.8	14.0 ± 1.8	2.6 ± 0.1	5.4 ± 1.8	14.0 ± 1.8	2.6 ± 0.1	5.4 ± 1.8
5	18.7 ± 2.9 *	2.4 ± 0.1 *	5.3 ± 1.9	6.1 ± 1.1 *	3.9 ± 0.5	5.2 ± 2.0	12.5 ± 2.9	2.6 ± 0.1	5.7 ± 2.1
10	13.4 ± 1.7	2.7 ± 0.1	5.0 ± 2.1	11.2 ± 5.0	2.9 ± 0.5	4.8 ± 1.7	21.3 ± 2.6 *	2.3 ± 0.1 *	5.2 ± 2.1
100	17.1 ± 2.3	2.5 ± 0.1	4.7 ± 2.1	9.3 ± 2.2 *	3.4 ± 0.4	5.0 ± 1.9	18.8 ± 2.8 *	2.4 ± 0.1 *	5.4 ± 2.1
200	18.9 ± 3.4 *	2.4 ± 0.2 *	5.0 ± 2.3	4.3 ± 1.7 *	5.6 ± 1.7 *	5.0 ± 1.8	13.0 ± 2.1	2.5 ± 0.1	5.3 ± 1.9

* Indica diferencia significativa respecto al Testigo, con Fisher.

** Obtenida a partir del tiempo de crecimiento 50, como se indica en la Tabla 5.

El efecto del extracto etanólico y hexánico es positivo sobre las raíces laterales de *Zea mays*, por lo tanto, en caso de tratar un cultivo de *Zea mays* con *Brachiaria brizantha* utilizando el extracto a una concentración de 200 ppm con cualquiera de los 2 extractos, las raíces de *B. brizantha* se verían afectadas negativamente, pero las de *Z. mays* no.

Las raíces laterales de *Zea mays* son más sensibles al extracto que las de *Brachiaria brizantha*, ya que únicamente afecta la longitud máxima de *B. brizantha* a 200 ppm, mientras que a *Z. mays* la afecta desde 5 ppm. Además, la longitud máxima de la raíz lateral más larga con extracto etanólico que se ve afectada, se inhibe en un 32.7% respecto al promedio del Testigo, mientras que, a esa

misma concentración, en *Z. mays* se ve inhibida en un 69.3%. Por esto, de usar este extracto, debería buscarse una concentración a la que el efecto negativo sobre las raíces laterales de *Z. mays* sea mínimo o no exista como a 100 ppm, o evaluar la viabilidad de utilizarlo a pesar de que las longitudes de las raíces laterales se verán afectadas.

8.4.2.3. Efecto del extracto de *Byrsonima crassifolia* sobre la parte aérea de *Zea mays* (PTCIA).

En la Figura 19 (a, b y c) se muestra que ninguna concentración de ningún tipo de extracto de *B. crassifolia* afectó de manera significativa el porcentaje de establecimiento a ninguno de los tiempos evaluados.

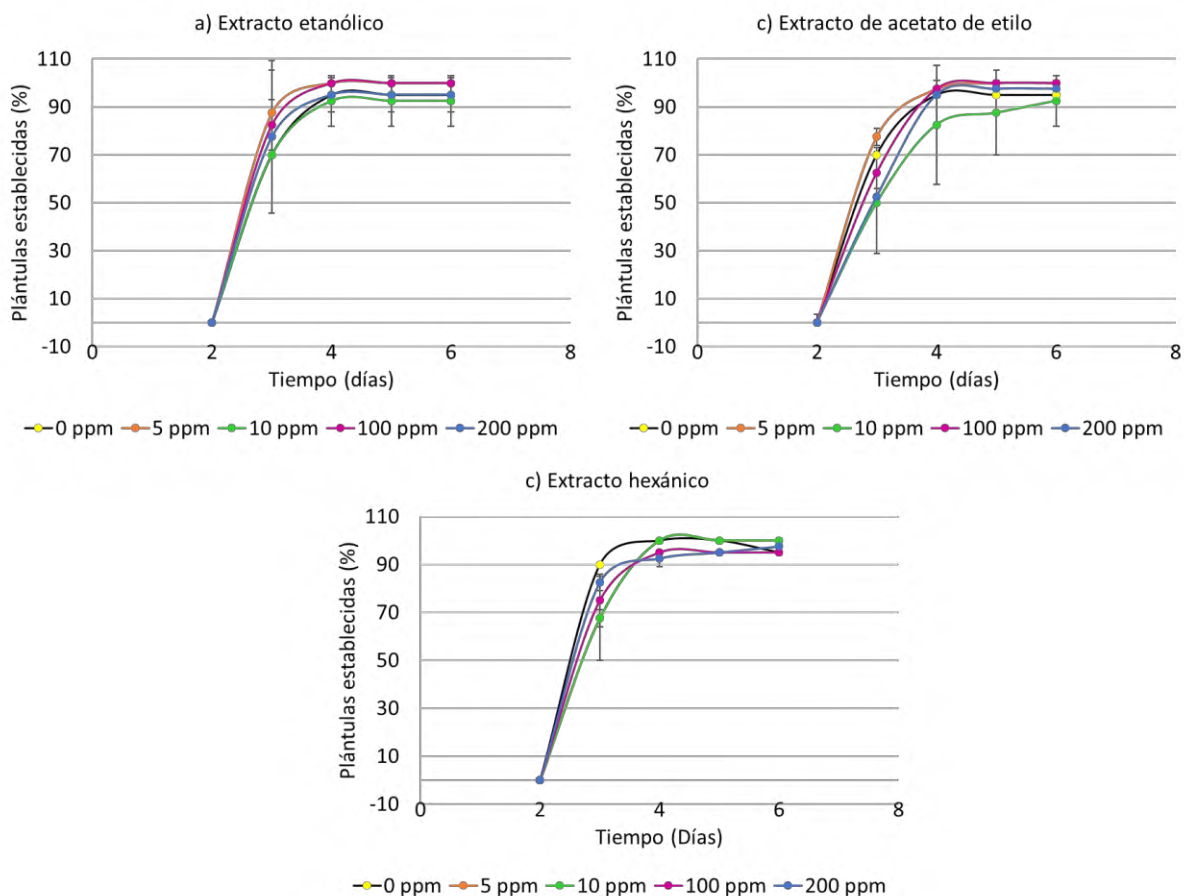


Figura 19. Efecto de diferentes concentraciones de extracto etanólico de *B. crassifolia* etanólico (a), de acetato de etilo (b) y hexánico (c) sobre la aparición de la primera hoja de plántulas de *Z. mays* (PTCIA). Se observa que ninguno de los tratamientos de *B. crassifolia* disminuyeron el porcentaje de establecimiento de manera significativa con respecto al Testigo (-●-). Letra A significativamente mayor, letras distintas indican diferencias con Fisher, $n \geq 60$.

En la Tabla 22 se muestra que ninguna concentración del extracto etanólico o hexánico de *B. crassifolia* afectó de manera significativa sobre ningún parámetro establecimiento evaluado, sin embargo, el acetato de etilo a la concentración de 5 ppm aumentó la longitud máxima de la parte aérea, y la concentración de 200 ppm disminuyó su longitud máxima y su velocidad de crecimiento, al aumentar su tiempo de crecimiento 50.

Tabla 22. Cuadro comparativo de los parámetros de crecimiento de la parte aérea de *Z. mays* (PTCIA) tratadas con distintas concentraciones de extracto etanólico, de acetato de etilo y hexánico de *B. crassifolia* evaluados en el tiempo final.

Extracto	Etanólico		De acetato de etilo		Hexánico	
	Longitud máxima (mm)	Velocidad de crecimiento (días)**	Longitud máxima (mm)	Velocidad de crecimiento (días)	Longitud máxima (mm)	Velocidad de crecimiento (días)**
0	217.2 ± 3.8	4.8 ± 0.0	217.2 ± 3.8	4.8 ± 0.0	217.2 ± 3.8	4.8 ± 0.0
5	231.1 ± 8.6	4.7 ± 0.1	232.7 ± 7.9 *	4.7 ± 0.1	231.6 ± 4.1	4.7 ± 0.0
10	225.7 ± 4.2	4.7 ± 0.0	204.3 ± 16.8	5.0 ± 0.2	231.6 ± 4.1	4.7 ± 0.1
100	218.0 ± 10.2	4.8 ± 0.1	207.3 ± 5.9	5.0 ± 0.1	225.9 ± 12.2	4.8 ± 0.2
200	214.7 ± 23.3	4.9 ± 0.3	199.0 ± 11.6 *	5.1 ± 0.2 *	234.6 ± 27.8	4.7 ± 0.3

* Indica diferencia significativa respecto al Testigo, con Fisher.

** Obtenida a partir del tiempo de crecimiento 50, como se indica en la Tabla 5.

En la Tabla 23 se muestra que ninguna concentración de ningún tipo de extracto de *B. crassifolia* afectó de manera significativa sobre ningún parámetro establecimiento evaluado.

Tabla 23. Cuadro comparativo de los parámetros de establecimiento de *Z. mays* (PTCIA) tratadas con distintas concentraciones de extracto etanólico, de acetato de etilo y hexánico de *B. crassifolia* evaluados en el tiempo final.

Extracto	Etanólico		De acetato de etilo		Hexánico	
	Establecimiento máximo	Velocidad de establecimiento (días)**	Establecimiento máximo	Velocidad de establecimiento (días)**	Establecimiento máximo	Velocidad de establecimiento (días)**
0	95.0 ± 0	3.0 ± 0	95.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	95.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0
5	100.0 ± 0	2.8 ± 0.1	100.0 ± 0.0	2.9 ± 0.1	100.0 ± 0.0	2.9 ± 0.0
10	92.5 ± 10.6	2.9 ± 0.1	92.5 ± 10.6	3.4 ± 0.5	100.0 ± 0.0	2.9 ± 0.1
100	100.0 ± 0	2.8 ± 0.1	100.0 ± 0.0	3.1 ± 0.1	95.0 ± 0.0	2.9 ± 0.0
200	95.0 ± 7.1	2.9 ± 0.3	97.5 ± 3.5	3.2 ± 0.0	97.5 ± 3.5	2.8 ± 0.0

* Indica diferencia significativa respecto al Testigo, con Fisher.

** Obtenida a partir del tiempo de establecimiento 50, como se indica en la Tabla 5.

El contraste del efecto de *M. sativa* sobre el establecimiento de *Z. mays* es el mismo que el mencionado previamente en la discusión del efecto de *M. sativa* sobre la germinación de *Z. mays*.

Con el extracto etanólico y hexánico de *B. crassifolia* no se ve afectado ningún parámetro evaluado de crecimiento de parte aérea o establecimiento de *Z. mays*, pero los *B. brizantha* sí. Con estos extractos podría inhibirse de manera selectiva la parte aérea de *B. brizantha* en un cultivo de *Z. mays*. En el caso del extracto hexánico, afecta negativamente la parte aérea a 200 ppm de *Z. mays*, por lo cual sería recomendable utilizarlo a 100 ppm, concentración a la que afecta significativamente de manera negativa a *B. brizantha*, pero no tiene efecto sobre *Z. mays*.

Tomando en cuenta todo lo anterior, se considera que el mejor tratamiento fue extracto etanólico de *Byrsonima crassifolia* a 10 ppm. Este extracto mostró una tasa de inhibición de germinación en *B. brizantha* (Organismo diana) del 38.8% y no inhibe la de *Z. mays* (PTCIA), no afecta a raíz principal ni laterales de *B. brizantha* (Organismo diana), pero tampoco de *Z. mays* (PTCIA) y en *B. brizantha* (Organismo diana) afecta el establecimiento, ya que disminuye el porcentaje de plántulas con 1 hoja, llegando a tener el 56.4% del Testigo, este efecto no se observa en la parte aérea de *Z. mays* (PTCIA).

En cuanto al desarrollo de plantas, la parte aérea y raíces son de igual importancia, ya que la parte aérea es la responsable de captar dióxido de carbono y fotones para la fotosíntesis, mientras que las raíces captan el agua, también necesaria para la fotosíntesis, y minerales necesarios para su correcto desarrollo (Sánchez-Díaz y Aguirreolea, 2013). En el control de malezas también tendrían la misma importancia, ya que compiten con el cultivo de interés por estos mismos. Aunque esto depende de la etapa que se busca afectar, ya que en etapas tempranas se busca impedir la germinación o crecimiento de raíces, para evitar trabajo posterior, mientras que en herbicidas aplicados después de la emergencia de la maleza se busca afectar el crecimiento de la parte aérea y aparición de hojas. En la discusión de este trabajo solo se priorizó por cantidad de parámetros que afecta al modelo de maleza que no afecta al modelo de cultivo de interés, no por importancia de tal parámetro.

Con el trabajo realizado no es posible proponer el sistema más adecuado para aplicar el extracto en caso de que se utilice como herbicida, ya que solo se utilizó un método, pero se sugiere la posibilidad de que la aplicación directa en tierra antes de la aparición de la maleza sea un sistema

útil, al ser el más similar al utilizado en este trabajo. Pero para afirmar esto es necesario realizar pruebas en campo.

8.5. Análisis fitoquímico

8.5.1. Determinación de flavonoides por cromatografía en capa fina

Las cromatografías mostraron bandas de posibles flavonoides presentes en los extractos etanólicos de hojas de *B. crassifolia* y de *M. sativa*, que se compararon con los estándares en la misma placa u obtenidos por referencias bibliográficas de Wagner y Bladt (1996), los cuales pueden verse en la Figura A de Anexos. Las bandas encontradas y Rf calculados se muestran en la Figura 20 y 21 y la Tabla 24 y 25, respectivamente.

En la Figura 20a, se observa una banda encontrada en el carril de la quercetina y 5 en el carril de extracto a concentración de 5 mg/mL. En la Figura 20b se observa la misma banda que en la Figura 20a, para el carril de la quercetina y 3 bandas en el mismo carril de extracto a 5 mg/mL.

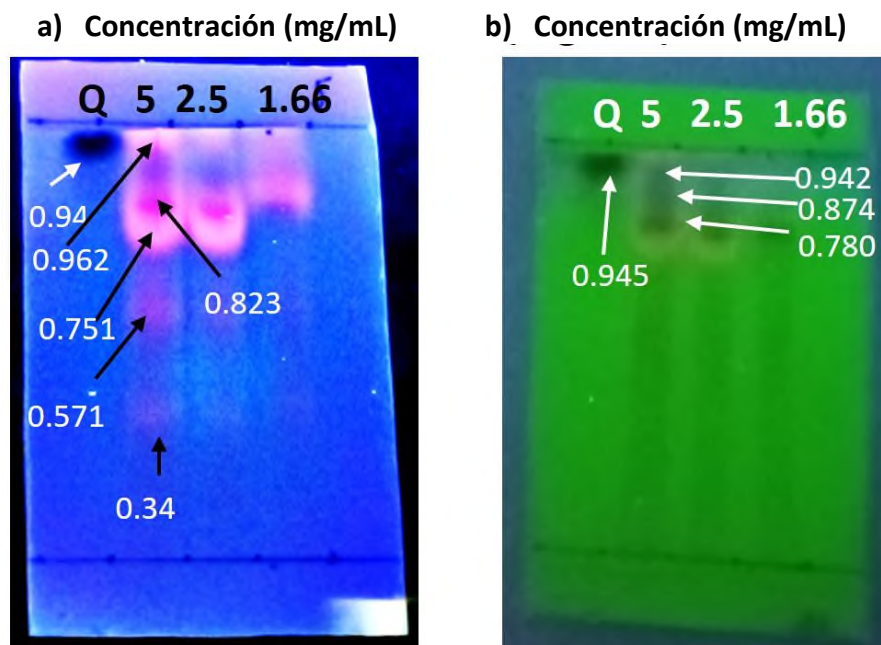


Figura 20. Cromatografía con quercetina y extracto etanólico de *Byrsonima crassifolia* a 5, 2.5 y 1.66 mg/mL vista con una lámpara de 365 nm (a), y una de 254 nm (b), utilizando la fase móvil *ad hoc* para flavonoides y sílica gel 60 como fase estacionaria. Los números indican el factor de arrastre (Rf) de la banda, y la flecha señala la banda a la que corresponde dicho Rf.

Con base las Tablas 24 y 25 se calculó su Rf y se identificaron compuestos potenciales en el extracto, mostrados en la Tabla 24. Comparando con el Rf de estándares, se consideró que el

extracto etanólico de hojas de nanche puede contener quercetina e Isorhamnetina e Isoquercetina y a que el Rf calculado de la quercetina es de 0.94 y 0.945 en las lámparas de 365 nm y 254 nm, respectivamente y en el carril de 5 mg/mL del extracto se ve una banda con Rf de 0.962 a 365 nm y de 0.942 a 254 nm, muy similares a 0.94. Con la lámpara de 365 nm también puede verse una banda con Rf de 0.751 y otra de 0.571, que juntas son muy similares a las de 0.7 y 0.6 de Isorhamnetina e Isoquercetina, lo cual los deja como compuestos probables presentes. También se vieron otras 4 bandas que no pudieron identificarse con los Rf de referencia: 2 a 365 nm con Rf de 0.823 y 0.34 y otras con lámpara de 254 nm con Rf de 0.780 y 0.874. Las primeras 3, que se marcaron con un asterisco, coinciden con las observadas previamente por Roldan-Sabino (2018). Estos compuestos son tentativos, para asegurar su presencia en el extracto, deben utilizarse técnicas que permitan la elucidación de estructuras moleculares, como la espectroscopía de resonancia magnética nuclear o espectrometría de masas.

Tabla 24. Identificación de Rf de bandas de cromatografías presentadas en Figura 39 y potenciales compuestos correspondientes a ellos.

Compuesto al que pertenece la banda	Rf 365 nm	Potencial compuesto	Rf 254 nm	Potencial compuesto
Extracto etanólico de <i>B. crassifolia</i>	0.962	Quercetina	0.942*	Quercetina
	0.823*	-	0.874	-
	0.751	Isorhamnetina e	0.780*	-
	0.571	Isoquercetina		
	0.34*	-		

A en la Figura 21 se ve que a la concentración de 10 mg/mL se presenta un bandeo distinto que a 5 mg/mL (Figura 20) en extracto etanólico de nanche y quercetina. La quercetina tuvo un Rf de 0.988 a ambas longitudes de onda y la cumarina solo se vió a 254 nm, con un Rf de 0.941.

En la Figura 21a, se muestra que con la lámpara de 365 nm se observó una banda en el carril de quercetina, 3 bandas en el carril de extracto etanólico de *B. crassifolia*, 2 en el carril de extracto etanólico de *M. sativa* y ninguna en el carril de cumarina. En la Figura 21b se observó con lámpara de 254 nm el mismo bandeo en el carril de quercetina, 4 bandas en el carril de extracto de *B. crassifolia* en distintas posiciones a las observadas en la Figura 21a, 1 banda en el carril de extracto de *M. sativa* y banda en el carril de cumarina.

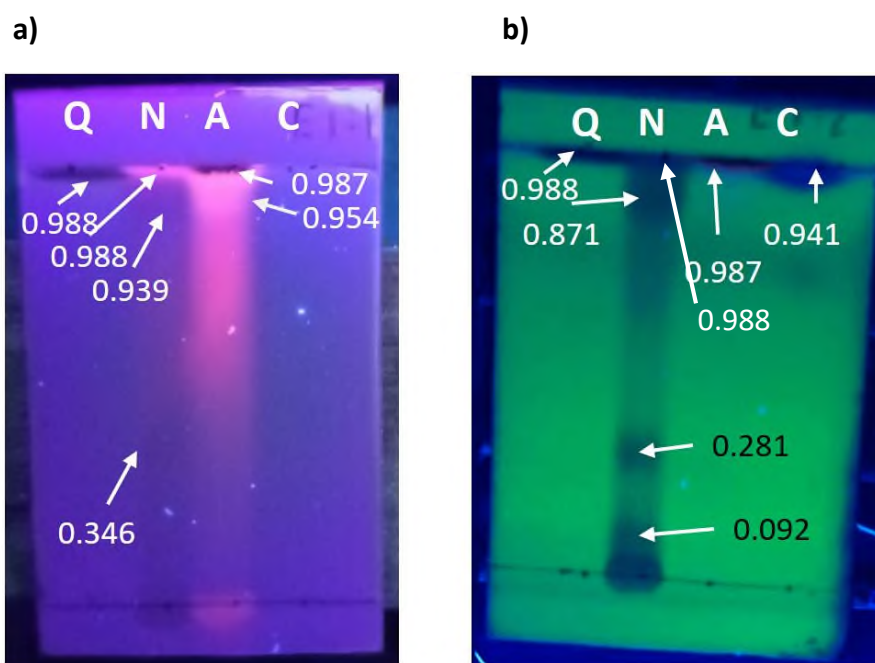


Figura 21. Cromatografía con quercetina (Q), extracto etanólico de *B. crassifolia* (N), extracto etanólico de *M. sativa* (A), y cumarina (C) a 10 mg/mL vista con una lámpara de 365 nm (a), y una de 254 nm (b), utilizando la fase móvil *ad hoc* para flavonoides y sílica gel 60 como fase estacionaria. Los números indican el factor de arrastre (Rf) de la banda, y la flecha señala la banda a la que corresponde dicho Rf.

En el extracto de *B. crassifolia* se identificaron como posibles compuestos presentes a la quercetina, ácido cafeico, rutina y Isorhamnetina-rutinosil-glucósido y en el extracto etanólico de alfalfa se identificó quercetina, como se presenta en la Tabla 26.

En el extracto etanólico de *B. crassifolia*, hay una banda con el mismo Rf que la quercetina que se vio en ambas lámparas. Se vio una banda con Rf de 0.346 con la lámpara de 365 nm, similar al Rf reportado para la rutina de 0.4 por Wagner y Bladt (1996) y otra de 0.939, similar al Rf reportado de 0.9 de ácido cafeico. Con la lámpara de 254 nm se identificó una banda con Rf de 0.251, muy similar al Rf de 0.2 de Isorhamnetina-rutinosil-glucósido reportado por Wagner y Bladt (1996). Se vieron otras 2 bandas que no pudieron identificarse, una con Rf de 0.871 y otra de 0.092, ambas en la lámpara de 254 nm. Las bandas con Rf de 0.939, 0.346, 0.871 y 0.092 son similares a las observadas previamente por Roldan-Sabino (2018). Con el extracto etanólico de *M. sativa* pudo verse una banda con Rf de 0.987 con ambas lámparas, muy similar a la obtenida por quercetina con Rf de 0.988 y con la lámpara de 365 nm se evidenció una banda con Rf de 0.954, similar al reportado por Wagner y Bladt (1996) de 0.9 para el ácido cafeico.

Tabla 25. Identificación de Rf de bandas de cromatografías presentadas en Figura 40 y potenciales compuestos correspondientes a ellos.

Extracto al que pertenece la banda	Rf 365 nm	Potencial compuesto	Rf 254 nm	Potencial compuesto
Extracto etanólico de <i>B. crassifolia</i>	0.988	Quercetina	0.988	Quercetina
	0.939*	Ácido cafeico	0.871*	-
	0.346*	Rutina	0.251*	Isorhamnetina-rutinosil-glucósido
			0.092*	-
Extracto etanólico de <i>M. sativa</i>	0.987	Quercetina	0.987	Quercetina
	0.954	Ácido cafeico		

8.5.2. Barrido de extractos por espectrofotometría

En la Figura 22 se muestran los resultados del barrido espectrofotométrico del extracto etanólico de *B. crassifolia*. Se observan tres picos de absorbancia principales a 390, 430, 480 y 590 nm. Comparte el pico a 430 nm con quercetina y atropina, pero se le atribuyó a la quercetina ya que también comparten el pico a 390 nm. El pico a 480 nm no se encontró en ninguno de los estándares utilizados, por lo cual no puede identificarse. Debido a que el pico a 590 nm se observa en todos los perfiles, no se tomó en cuenta para identificar compuestos. Las absorbancias negativas podrían explicarse porque, a la longitud de onda en que se presentan, el reactivo titulante absorbe, pero el extracto utilizado no, y debido a que los valores mostrados en las figuras se obtuvieron por la resta de la absorbancia del blanco a la absorbancia del estándar, los valores dieron negativos.

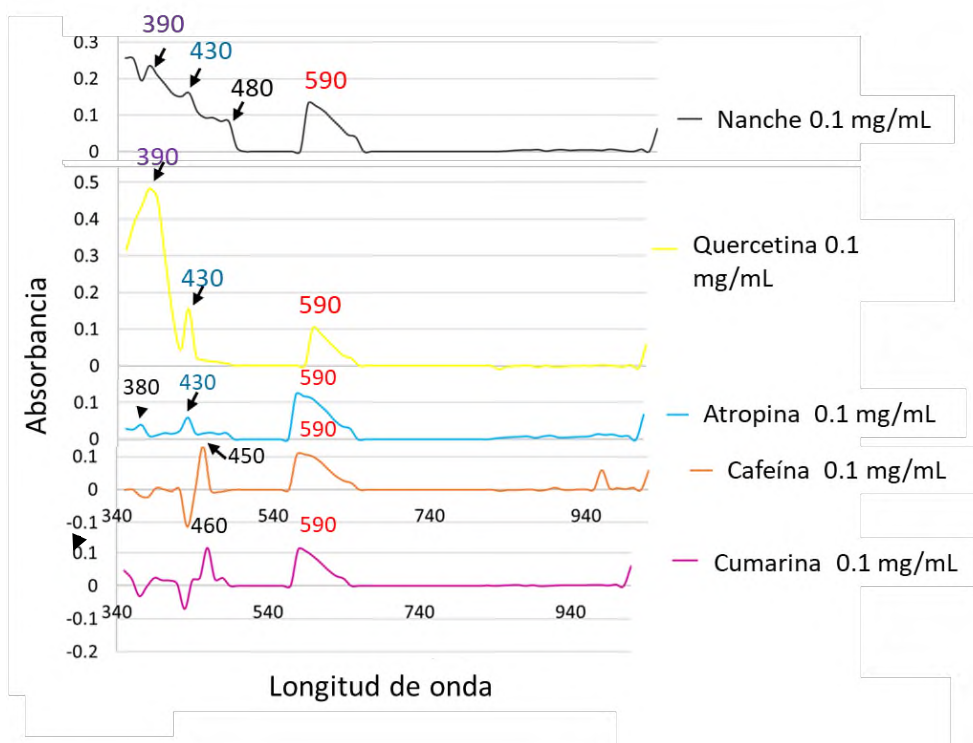


Figura 22. Perfil de extracto etanólico de *Byrsonima crassifolia* (Nanche) comparado con los de quercetina, atropina, cafeína y cumarina.

En la Figura 23 se muestra el perfil de *M. sativa*, en el cual se ven 2 picos de absorbancia distintivos a 410 y 670 nm. Estos picos no se encuentran en ninguno de los estándares utilizados, por lo cual no pudo identificarse ningún compuesto presente en el extracto etanólico de *M. sativa*. Debido a la manera en que parecieran unirse 2 picos a 390 nm y 430 nm con uno mayor en el centro, podría haber quercetina en el extracto, pero no puede saberse sin hacer otras pruebas o más separaciones. Las absorbancias negativas podrían explicarse porque, a la longitud de onda en que se presentan, el reactivo titulante absorbe, pero el extracto utilizado no, y debido a que los valores mostrados en las figuras se obtuvieron por la resta de la absorbancia del blanco a la absorbancia del estándar, los valores dieron negativos.

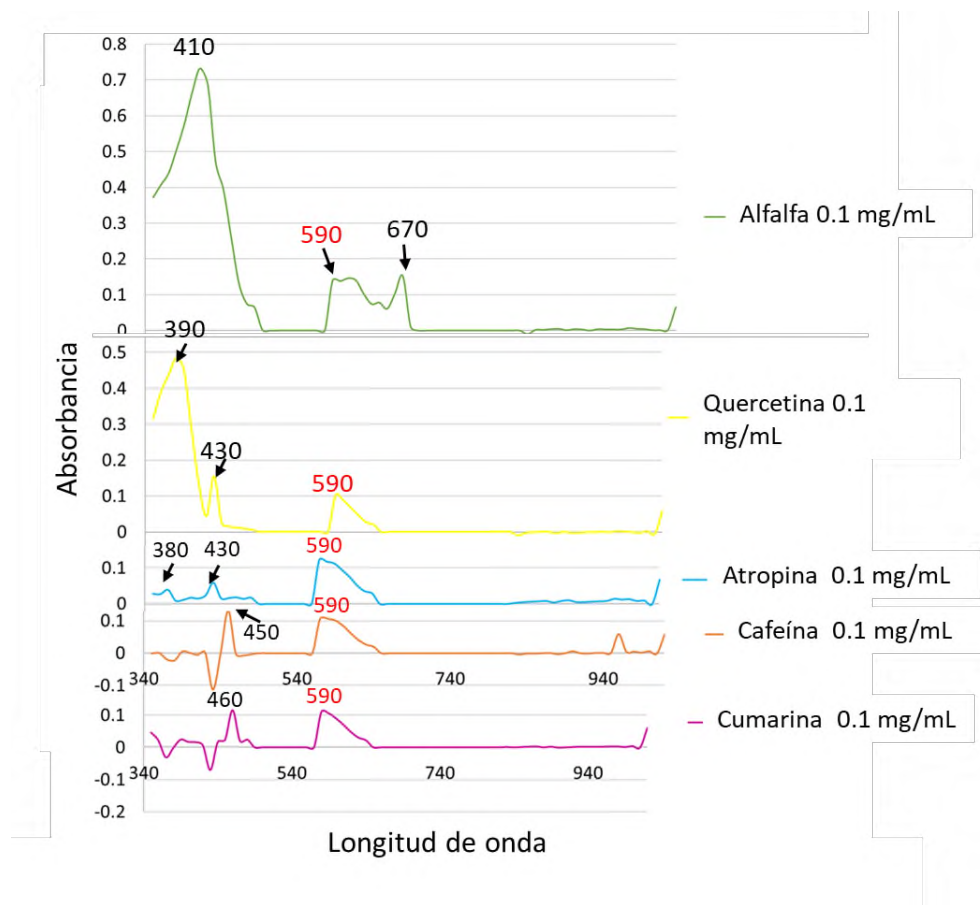


Figura 23. Perfil de extracto etanólico de *Medicago sativa* (alfalfa) comparado con los de quercetina, atropina, cafeína y cumarina.

8.5.3. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales

La curva de calibración de la lectura de fenoles totales puede verse en la Figura B de Anexos y la de flavonoides totales en la Figura C de Anexos.

La reacción para determinación de flavonoides totales da como resultado una coloración amarilla, la cual puede observarse en la curva y en el extracto etanólico y de acetato de etilo, pero no es el extracto hexánico, donde la mezcla solo se puso turbia, lo cual indica que no se encontraron fenoles totales en el extracto hexánico, esto puede verse en la Figura 24.

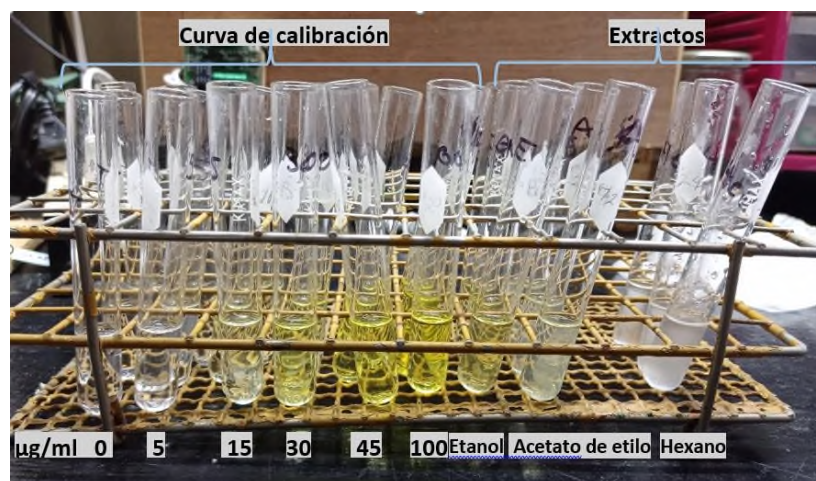


Figura 24. Fotografía de reacciones de cuantificación de flavonoides totales.

Como se muestra en la Tabla 26, hay fenoles presentes en el extracto etanólico y el de acetato de etilo de *B. crassifolia*, pero no en el extracto hexánico. La concentración de éstos es mayor en el extracto etanólico, en 366.7% a la del extracto obtenido con acetato de etilo y la diferencia es estadísticamente significativa.

La concentración de flavonoides tiene diferencia significativa entre ambos extractos y es mayor en el extracto obtenido con acetato de etilo a la presente en el extracto etanólico, en un 115.12%.

Tabla 26. Tabla de contenido de fenoles totales en extractos de *Byrsonima crassifolia*. Análisis estadístico ANOVA de una vía con Fisher como prueba como prueba *ad hoc*, con $P > 0.05$, $n=3$.

Extracto	Fenoles totales ($\mu\text{g EAG}/ \mu\text{g de extracto seco}$)	Flavonoides totales ($\mu\text{g EQ/mL}$)
Etanólico	4.4 ± 0.1^A	72.5 ± 3.2^b
Acetato de etilo	1.2 ± 0.0^B	83.5 ± 0.6^a
Hexano	No hubo reacción ^C	No hubo reacción ^c

Considerando el rendimiento de extracción, esto daría una concentración de fenoles totales en el extracto etanólico de 344.0 mg EAG/g de peso seco de planta y en extracto obtenido con acetato de etilo de 10.3 mg EAG/g de peso seco de planta. El contenido de fenoles totales es mucho mayor en extracto etanólico de *B. crassifolia* que el obtenido por solventes de polaridad similar en *M. sativa*, reportado de 0.26 mg EAG/g de peso seco de planta por Caunii, Pribac, Grozea, Gaitin y Samfira (2012) y de 5.8 a 8.1 mg EAG/g de peso seco de planta por Gjoroska et al. (2018).

En este trabajo se vio que el extracto etanólico es el que inhibe la germinación a menor concentración y a mayor espectro de concentraciones, también es el que tiene la mayor cantidad de fenoles totales; seguida en ambos aspectos por el extracto obtenido con acetato de etilo y extracto hexánico, donde no se encontraron fenoles. Con estos resultados no se puede concluir que los fenoles sean los responsables de las diferentes actividades del crecimiento vegetal en los modelos estudiados, existe controversia y a que otros autores han adjudicado de manera tentativa esta actividad a compuestos distintos como monoterpenos y sesquiterpenos, presentes principalmente en aceite esenciales (Elshamy et al. 2019).

9. CONCLUSIONES

Todos los extractos obtenidos de *B. crassifolia* mostraron actividad inhibidora, ya sea sobre el porcentaje de germinación, porcentaje de establecimiento o medidas morfológicas de *B. brizantha* (Organismo diana). Específicamente, el extracto etanólico de *B. crassifolia* inhibió el porcentaje de germinación de *B. brizantha* (Organismo diana), en todas las concentraciones utilizadas. La tasa de inhibición del porcentaje de germinación se encuentra entre 23.2 y 44.2%, también disminuyeron el porcentaje de plántulas con 1 hoja. Aunque, en *Z. mays* (PTCIA), este extracto solo disminuyó la germinación entre 100 y 200 ppm, sin afectar ningún parámetro de la parte aérea. El extracto obtenido con acetato de etilo de *B. crassifolia*, a las concentraciones más altas utilizadas (100 y 200 ppm), inhibió la germinación de *B. brizantha* (Organismo diana), el crecimiento de su raíz principal, el porcentaje de plántulas con raíces laterales, y el porcentaje de plántulas con 1 hora, afectando esto último también a 5 ppm. En *Z. mays* (PTCIA), disminuye la germinación máxima y el crecimiento de raíz principal a concentraciones similares, mas no afecta a la aparición de raíces laterales ni el establecimiento. El extracto hexánico afectó negativamente tanto el porcentaje de germinación máxima, crecimiento de raíz principal y porcentaje de plántulas con raíces laterales y 1 hoja en *B. brizantha* (Organismo diana), con al menos una concentración utilizada, sin una tendencia entre ellas, pero afectó a *Z. mays* (PTCIA) de modo similar y a concentraciones similares en los parámetros de germinación y longitud de raíz principal.

Se considera que el mejor tratamiento fue extracto etanólico de *Byrsonima crassifolia* a 10 ppm. Este extracto mostró una tasa de inhibición de germinación en *B. brizantha* (Organismo diana) del 38.8% y no inhibe la de *Z. mays* (PTCIA), no afecta a raíz principal ni laterales de *B. brizantha* (Organismo diana), pero tampoco de *Z. mays* (PTCIA) y en *B. brizantha* (Organismo diana) afecta el establecimiento, ya que disminuye el porcentaje de plántulas con 1 hoja a tiempo final, llegando a tener el 56.4% del Testigo, este efecto no se observa en la parte aérea de *Z. mays* (PTCIA).

La planta usada como modelo de maleza *B. brizantha* es más sensible a los extractos de *B. crassifolia* que *Zea mays* (especie de interés agronómico).

En el extracto etanólico de *B. crassifolia* se identificaron como posibles componentes a la quercetina, rutina, ácido cafeico, Isorhamnetina-rutinosil-glucósido, Isorhamnetina e Isoquercetina. En el de *M. sativa* se identificaron como posibles componentes a la quercetina y ácido cafeico. Se encontró que el extracto de *B. crassifolia* con mayor contenido de fenoles totales es el etanólico con $4.4 \pm 0.1 \mu\text{g EAG}/\mu\text{g ES}$ seguido por el de acetato de etilo con $1.2 \pm 0.1 \mu\text{g EAG}/\mu\text{g ES}$. En cambio, en el contenido de flavonoides totales, el extracto con mayor concentración fue el de acetato de etilo con $83.5 \pm 0.6 \mu\text{g EQ/mL}$, el etanólico tuvo $72.5 \pm 3.2 \mu\text{g EQ/mL}$. El extracto hexánico no presentó ninguno de los dos. Con la información obtenida en el trabajo no se le podría adjudicar la actividad a ningún compuesto.

En este trabajo se demostró que los extractos de *Byrsonima crassifolia* variedad de fruto ácida presentan una actividad potencial como herbicida y se continuará estudiando en el laboratorio.

10. PERSPECTIVAS

Se considera importante continuar con el estudio de potenciales moléculas vegetales con actividad herbicida. Se propone continuar con la evaluación del extracto etanólico de *Byrsonima crassifolia* para determinar su mecanismo de acción, aislar e identificar los componentes activos.

A futuro, también sería importante ampliar el estudio a otros cultivos, realizar pruebas de toxicidad sobre organismos de interés y de persistencia en suelo y agua.

11. LITERATURA

1. Abdul-Rahman, A. y Habib, S. (1989). Allelopathic effect of alfalfa (*Medicago sativa*) on bladygrass (*Imperata cylindrica*). *Journal of chemical ecology*, 15(9), 2289-300. doi: <https://doi.org/10.1007/BF01012082>
2. Aktar, M. W., Sengupta, D. y Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary toxicology*, 2(1), 1–12. doi: <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
3. Anzalone, A. (2008). Características generales de los herbicidas. En *Herbicidas: Modos y mecanismos de acción en plantas* (2-10). Venezuela: Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado.
4. Anzalone, A. (2008). Absorción y translocación de herbicidas en las plantas. En *Herbicidas: Modos y mecanismos de acción en plantas* (12-28). Venezuela: Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado.
5. Anzalone, A. (2008). Metabolismo de herbicidas en plantas. En *Herbicidas: Modos y mecanismos de acción en plantas* (31-41). Venezuela: Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado.
6. Anzalone, A. (2008). Mecanismos de acción de herbicidas. En *Herbicidas: Modos y mecanismos de acción en plantas* (43-65). Venezuela: Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado.
7. Argel, M., & Pedro, J. (2006). Contribución de los forrajes mejorados a la productividad ganadera en sistemas de doble propósito. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*.
8. Avilés-Peraza, G. (2015). Rico y popular: Importancia y usos tradicionales del nance (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth). Recuperado de: https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Desde_Herbario/2015/2015-10-15-Aviles-Peraza-Importancia_y_usos_tradicionales_del_nance.pdf
9. Baziar, M., Farahvash, F., Mirshekari, B. y Rashidi, V. (2014). Allelopathic effect of ryegrass (*Lolium persicum*) and wild mustard (*Sinapis arvensis*) on barley. *Pakistan Journal of Botany*, 46(6), 2069-2075. Recuperado de: [www.pakbs.org/pjbot/PDFs/46\(6\)/19.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/46(6)/19.pdf)
10. Cárdenas-Navarro, R., Sánchez-Yáñez, J., Farías-Rodríguez, R. y Peña-Cabriales, J. (2004). Los aportes de nitrógeno en la agricultura. *Chapingo Serie Horticultura*, 10(2), 173-178. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/235965482_Contribution_of_nitrogen_to_agriculture
11. Caunii, A., Pribac, G., Grozea, I., Gaitin, D. y Samfira, I. (2012). Design of optimal solvent for extraction of bio-active ingredients from six varieties of *Medicago sativa*. *Chemistry Central journal*, 6(1), 123-131. doi: <https://doi.org/10.1186/1752-153X-6-123>
12. Cheng, F. y Cheng, Z. (2015). Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. *Frontiers in Plant Science*, 6(1). doi: <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.01020>
13. Chévez, Coronado y Espinoza. 2014. Determinación y comparación de propiedades físico-químicas de dos aceites de pino (*Pinus oocarpas chiede*) extraídos mediante las técnicas

- de Soxhlet y Clevenger (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Nicaragua. Recuperado de: https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/02/879803/determinacion-y-comparacion-de-propiedades-fisico-quimicas-de-d_splKQjL.pdf
14. Chon, S., Choi, S., Jung, S., Jang, H., Pyo, B. y Kima, S. (2002). Effects of alfalfa leaf extracts and phenolic allelochemicals on early seedling growth and root morphology of alfalfa and barnyard grass. *Crop Protection*, 21, 1077–1082. doi: [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00092-3](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00092-3)
 15. Chung, I.M. (1994). Allelopathy and autotoxicity studies and allelochemicals isolation and identification of alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Tesis doctoral). University of Illinois at Urbana-Champaign, Illinois, Estados Unidos. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/2142/20720>
 16. Chung I.M. y Miller D.A. (1995). Effect of alfalfa plant and soil extracts on germination and growth of alfalfa. *Agronomy Journal*, 87(4), 762-767. doi: <https://doi.org/10.2134/agronj1995.00021962008700040025x>
 17. Duke, S. (1990). Overview of Herbicide Mechanisms of Action. *Environmental Health Perspectives*, 87(1), 263-271. doi: <http://doi.org/10.1289/ehp.9087263>
 18. Dumroese, R., Jacobs, D. y Wilkinson, K. (2012). Fases de cultivo: establecimiento y crecimiento rápido. En. Buamscha, M., Contardi, L., Dumroese, R., Enricci, J., Escobar, R., Gonda, H., Jacobs, D., Landis, T., Luna, T., Mexal, J. y Wilkinson, K. (Ed), Producción de plantas en viveros forestales (pp.132 - 142). Buenos Aires, Argentina: Consejo Federal de Inversiones, Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.
 19. El-Darier, S. y El-Dien, M. (2011). Biological activity of *Medicago sativa* L. (alfalfa) residues on germination efficiency, growth and nutrient uptake of *Lycopersicon esculentum* L. (tomato) seedlings. *Journal of Taibah University for Science*, 5(1), 7-13. doi: [https://doi.org/10.1016/S1658-3655\(12\)60033-8](https://doi.org/10.1016/S1658-3655(12)60033-8)
 20. Elshamy, A., Abd-ElGawad, A., El Gendy, A. y Assaeed, A. (2019). Chemical characterization of *Euphorbia heterophylla* L. essential oils and their antioxidant activity and allelopathic potential on *Cenchrus echinatus* L. *Chemistry & Biodiversity*, 16(5), 1-23. doi: <http://doi.org/10.1002/cbdv.201900051>
 21. Findura, P., Hara, P., Szparaga, A., Kocira, S., Czerwinska, E., Bartoš, P., Nowak, J. y Treder, K. (2020). Evaluation of the effects of allelopathic aqueous plant extracts, as potential preparations for seed dressing, on the modulation of cauliflower seed germination. *Agruculture*, 10(4), 120-130. doi: <http://doi.org/10.3390/agriculture10040122>
 22. García Hernández, J., Leyva Morales, J., Martínez Rodríguez, I., Hernández Ochoa, M., Aldana Madrid, M., Rojas García, A., Betancourt Lozano, M., Pérez Herrera, N. y Perera Ríos, J. (2018). Estado actual de la investigación sobre plaguicidas en México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34(1), 29-60. doi: <http://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.esp01.03>

23. Ghimire, B.K., Ghimire, B., Yu, C. y Chung, L. (2019). Allelopathic and autotoxic effects of *Medicago sativa*—derived allelochemicals. *Plants*, 8(7), 233-251. doi: <http://doi.org/10.3390/plants8070233>
24. Ghosheh, H., Bsoul, E. y Abdullah, Y. (2004). Utilization of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) as a Smother Crop in Field Corn (*Zea mays* L.). *Journal of Sustainable Agriculture*, 25(1), 5-17. doi: http://doi.org/10.1300/J064v25n01_03
25. Gjoroska, V., Krstik, M., Klincarska, I., Cvetanovska, A., Cvetanovska, L. y Gudeva, L. (2018). Evaluation of total phenols in alfalfa (*Medicago sativa* L.) collected from different localities in Republic of Macedonia. *Journal of agriculture and plant sciences*, 16(1), 45-54. Disponible en: <https://core.ac.uk/reader/162193110>
26. Gulzar, A. y Siddiqui, M. (2017). Allelopathic effect of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. on growth and antioxidant activity of *Brassica oleracea* var. botrytis. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16(4), 375-382. doi: <http://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.12.003>
27. ISTA. (2016). Reglas internacionales para el análisis de semillas. Bassersdorf, Suiza: The International Seed Testing Association.
28. Editado por Ricardo Hausmann y 5 otros. (2019). The atlas of economic complexity: mapping paths to prosperity. Cambridge, MA: The MIT Press.
29. Heap, I. 2021. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponible online en <http://www.weedscience.org>. Consultado por última vez: 07/06/2021.
30. Hernández-Guzmán, F., Quero-Carrillo, A., Pérez-Rodríguez, P., Velázquez-Martínez, M. y García-de los Santos, G. (2015). Germinación y emergencia de propágulos de pasto en respuesta a pruebas de vigor. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(7), 1519-1532. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342015000700008&lng=es&tlng=es
31. Hernández-López, A., Beltrán-Peña, E., Amancio Oliveira, A., Núñez Gaona, O. y Ávila-Alejandre, A. (2018). Water preconditioning on germination and emergence of *Capsicum chinense* Jacq. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(8), 1703-1714. doi: <http://doi.org/10.29312/remexca.v9i8.1030>
32. Hou, Y., Song, X., Yin, Y., Li, Y., Yang, J. y Zheng, J. (2016). Allelopathic effects of allelochemicals of *Ginkgo biloba* leaf on fusarium wilt (*Fusarium oxysporum*) of hot pepper. *Allelopathy Journal*, 39(1), 103-114. Recuperado de: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20163333588>
33. Jiménez. A., Camargo. D. & García. D. (2020). Intelligent system for weeds management in pineapple crop with precision agriculture concepts. *Cienific Agriculture*, 17(3), 122-136. doi: <https://doi.org/10.19053/01228420.v17.n3.2020.10830>
34. Khanh, T.D., Cong, L.C., Xuan, T.D., Lee, S.J., Kong, D.S. y Chung, M. (2008). Weed suppressing potential of dodder (*Cuscuta hygrophilliae*) and its phytotoxic constituents. *Weed Science*, 56(1), 119-127. doi: <http://doi.org/10.1614/WS-07-102.1>
35. Kowthar, G., Rawia, A. y Taha, L. (2011). Allelopathic effects of croton leaves residue on jasmine trees and associated weeds. *Journal of Applied Sciences Research*, 7(6), 947-954. Recuperado de:

<https://www.researchgate.net/publication/287604964> Allelopathic effects of croton leaves residue on jasmine trees and associated weeds

36. Kwiatkowska, M., Reszka, E. Wozniak, K., Jabłonska, E., Michałowicz, J. y Bukowska B. (2017). DNA damage and methylation induced by glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Food and Chemical Toxicology*, 105(1), 93-98. doi: <http://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.051>
37. Labrada, R. y Bàrberi, P. (2004). Manejo de malezas para países en desarrollo. En *Métodos preventivos y culturales para el manejo de malezas*. 3. Roma, Italia: FAO.
38. Labrada, R., Caseley, J. y Parker, C. (1996). Herbicidas. En *Manejo de malezas para países en desarrollo*. (Estudio FAO producción y protección vegetal - 120) (200-251). Roma, Italia: FAO.
39. Li, X., Schuler, M. A. y Berenbaum, M. R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, 52(1), 231-253. doi: <http://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151104>
40. Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. y Stahl, D. (2015). Biorremediación de contaminantes orgánicos: plaguicidas y plásticos. En M. Martín-Romo (Ed), *Biología de los microorganismos* (pp. 706-708). Madrid, España: Pearson.
41. Marin-Morales, M., Ventura- Camargo, B. y Miyuki, M. (2013). Toxicity of herbicides: impact on aquatic and soil biota and human health. En Price, A., *Herbicides, current research and case studies in use* (16). Estados Unidos de América: IntechOpen. doi: <http://doi.org/10.5772/55851>
42. Medina-Torres, R., Ortíz-Catón, M. y Valdivia-Bernal, R. (2012). Propiedades medicinales y otros usos del *Nanche* [*Byrsonima crassifolia* (L.) HBK]. *Nueva época*, 11(1),16-22. Recuperado de: <http://aramara.uan.mx:8080/bitstream/123456789/900/1/Propiedades%20Medicinales%20y%20otros%20usos%20del%20Nanche.pdf>
43. Mena-Urbina, M., Hernández-Garay, A., Enríquez-Quiroz, J., Pérez-Pérez, J., Zaragoza-Ramírez, L., Velasco-Zebadua, M. y Avellaneda-Cevallos, J. (2007). Efecto de asignaciones de forraje, en pastoreo, sobre pasto insurgente y producción de vaquillas en el trópico húmedo. *Agrociencia*, 41(1), 1-12. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S140531952007000100001&lng=es&tlng=es
44. Moo-Huchin, V. M., Estrada-Mota, I., Estrada-León, R., Cuevas-Glory, L., Ortiz-Vázquez, E., Vargas, M. de L. V. y Sauri-Duch, E. (2014). Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 152(1), 508–515. doi: <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.013>
45. Moreno, G., Díaz, R. y Álvarez, M. (2015). Evaluación *in vitro* de la capacidad antioxidante del extracto del fruto del nanche (*Byrsonima crassifolia*). (Tesis de maestría). Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México.

46. Mortimer, A. D. (1996). La clasificación y ecología de las malezas. En Caseley, J. (Ed.), manejo de malezas para países en desarrollo. (Estudio FAO producción y protección vegetal – 120) (37-58). Roma: FAO.
47. Ochoa, K., Paredes, L., Bejarano, D. y Solva, R. (2014). Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd (Wiskataya). *Scientia Agropecuaria*, 3(4), 291-302. Recuperado de: <file:///C:/Users/DELL/AppData/Local/Temp/Dialnet-ExtractionCharacterizationAndEvaluationOfAntibacte-5113830.pdf>
48. Peng, X. (2019). Allelopathic effects of water extracts of maize leaf on three chinese herbal medicinal plants. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(1), 194-200. doi: <http://doi.org/10.15835/nbha47111226>
49. Perveen, S. y ousaf, M., Mushtaq, M., Sarwar, N., Khan, M. y Nadeem, S. (2019). Bioherbicidal potential of some allelopathic agroforestry and fruit plant species against *Lepidium sativum*. *Soil and Environment*, 38(1), 119-126. doi: <http://doi.org/10.25252/SE/18/71655>
50. Pileggi, M., Pileggi, S. y Sadowsky, M. (2020). Herbicide bioremediation: from strains to bacterial communities. *Heliyon*, 6(12). doi: <http://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05767>
51. Pita, J. y Pérez, F. (1998). Germinación de semillas. En Pérez, F. (Ed), Hojas divulgadoras (1-20). Madrid, España: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Recuperado de: https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1998_2090.pdf
52. Powles, S. y Yu, Q. (2010). Evolution in action: Plants resistant to herbicides. *The Annual Review of Plant Biology*, 61, 317–47. doi: <http://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112119>
53. Puig, C., Reigosa, M., Valentão P, Andrade, P. y Pedrol, N. (2018) Unravelling the bioherbicide potential of *Eucalyptus globulus* Labill: Biochemistry and effects of its aqueous extract. *PLOS ONE*, 13(2), 1-16. doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0192872>
54. Roldan-Sabino, C., Viñas-Bravo, O., Parra-Reyes, A., Galero-Martínez, N., Avila-Alejandre, A. y Hernández-López, A. (2018). Effect of sonication and pressing on recovery of compounds with antioxidant activity from leaves and bark of *Byrsonima crassifolia*. *Journal of Bioengineering and Biomedicine Research*, 2(1), 7-14. Recuperado de: <http://cmibq.org.mx/jbbr/index.php/library/Pp.7-14>
55. Roldan-Sabino, C. (2018). Estudio de la actividad antioxidante del nanche (*Byrsonima crassifolia*), variedad ácida (Tesis de maestría). Universidad del Papaloapan, San Juan Bautista Tuxtepec, México.
56. Travios, I., De Prado, R., Chachalis, D. y Bilalis, D. (2020). Editorial: Herbicide resistance in weeds: early detection, mechanisms, dispersal, new insights and management issues. *Frontiers in ecology and evolution*, 8(1), 213-218. doi: <http://doi.org/10.3389/fevo.2020.00213>
57. Veramin. (2016). Verasem semillas: Insurgente, *Brizantha* o Marandú. Veracruz, México. Recuperado en 10 de noviembre de 2020, de: <http://www.verasem.com.mx/productos-y-servicios.html>

58. Wagner, H. y Bladt, S. (1996). Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Springer Science & Business Media.
59. Wang, N., Wang, L., Feng, M. Yuan, M. y Zhu, X. (2015). Allelopathic effects of water extracts from stem and leaf of *Euphorbia helioscopia* on seed germination and seedling growth of three turfgrass species. Guizhou Agricultural Sciences, 43(5), 54-57. Recuperado de: <https://www.cabi.org/ISC/abstract/20153363003>

12. ANEXO

Figura A. Rf de estándares obtenidos de Wagner y Bladt (1996) o calculados por Roldan-Sabino (2018) a partir de Wagner y Bladt (1996).

Compuesto	Rf 365 nm	Rf 254 nm
Isorhamnetina-rutinosil-glucósido (IRG)	0.2	0.2
Rutina	0.4	0.4
Isorhamnetina e isoquercetina	0.6-0.7	0.6-0.7
Ácido cafeico o quercetina	0.9	0.9
Ácido clorogénico	0.5	0.5
Hiperósido	0.6	0.6

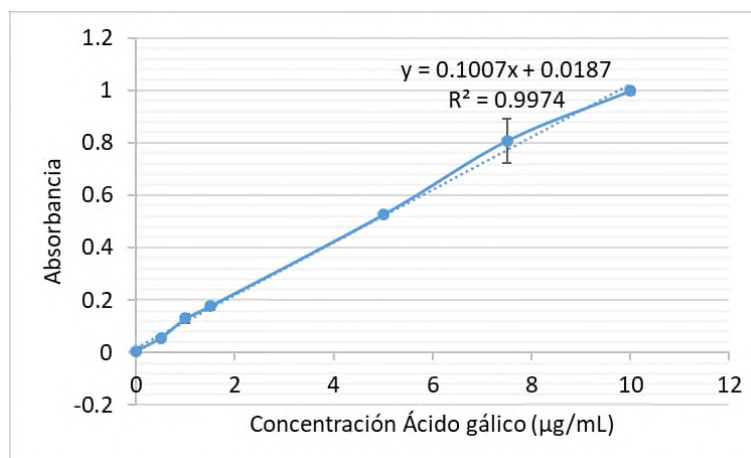


Figura B. Curva de calibración de fenoles totales con ácido gálico.

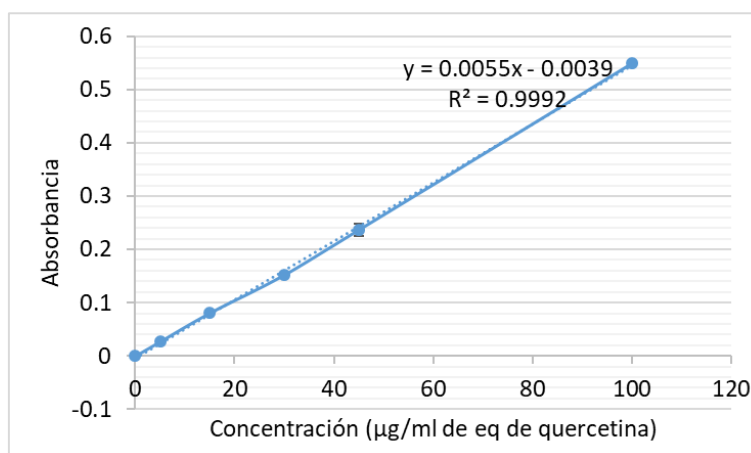


Figura C. Curva de calibración de flavonoides totales.