

Fitotoxicidad de los extractos de *Dieffenbachia amoena*, *Nerium oleander*, *Raphanus sativus* y *Brassica napobrassica*

Phytotoxicity of extracts of *Dieffenbachia amoena*, *Nerium oleander*, *Raphanus sativus* and *Brassica napobrassica*

María de los Ángeles Díaz-Mota ¹, María Rosario García-Mateos ^{1*}, Juan Martínez-Solís ¹,
Marcelo Acosta-Ramos ², Miguel Ángel Serrato-Cruz ¹, María Teresa Colinas-León ¹,
Jesús Magdaleno-Villar ¹

Originales: *Recepción*: 26/02/2016 - *Aceptación*: 09/08/2016

RESUMEN

El potencial que ofrecen las plantas como fuente de principios bioactivos ha sido poco estudiado. El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad fitotóxica de los extractos metanólicos de *Dieffenbachia amoena*, *Nerium oleander*, *Raphanus sativus* y *Brassica napobrassica* en la germinación y vigor de las plántulas de *Chenopodium album*, *Echinochloa crus-galli*, *Lactuca sativa*, *Solanum lycopersicum* y *Oryza sativa*. Las variables evaluadas fueron porcentaje de germinación y vigor de la plántula (longitud de radícula, LR y longitud de la parte aérea, LPA). Se realizó un análisis de varianza y comparaciones de medias de Tukey ($P \leq 0,05$). Los extractos de *B. napobrassica* y *R. sativus* presentaron el mayor efecto fitotóxico en comparación con los extractos de las especies restantes, al afectar la germinación de las semillas de *E. crus-galli* y *L. sativa* (96 y 99% a la concentración de 1%, y 90 y 100% a la concentración de 5%, respectivamente). Ambos extractos inhibieron el crecimiento de la LR y LPA de *C. album*, *E. crus-galli*, *L. sativa* y *O. sativa*, la excepción fue *S. lycopersicum*. Se identificó la presencia de glucosinolatos en los extractos de las especies de *Brassica napobrassica* y *Raphanus sativus*.

Palabras clave

extractos vegetales • germinación • inhibición • vigor

1 Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Km 38,5 Carretera México-Texcoco. C. P. 56230 Chapingo, Estado de México. *rosgar08@hotmail.com
2 Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo.

ABSTRACT

The potential of plants as a source of bioactive principles has been little studied. The objective of this research was to determine phytotoxic activity of methanol extracts of *Dieffenbachia amoena*, *Neriu moleander*, *Raphanus sativus* and *Brassica napobrassica* on germination and seedling vigor of *Chenopodium album*, *Echinochloa crus-galli*, *Lactuca sativa*, *Solanum lycopersicum* and *Oryza sativa*. The variables evaluated were germination percentage and seedling vigor (radicle length, RL and aerial part length, APL). An analysis of variance and Tukey's comparison of means test ($P \leq 0.05$) was performed. The methanol extracts of *B. napobrassica* and *R. sativus* showed the highest phytotoxic effect in comparison with the extracts of the other species, by affecting the germination of the seeds of *E. crus-galli* and *L. sativa* (96 and 99% at the concentration of 1%, and 90 and 100% at the concentration of 5%, respectively). Both extracts inhibited the growth of RL and APL of *C. album*, *E. crus-galli*, *L. sativa* and *O. sativa*; the only exception was *S. lycopersicum*. Glucosinolates were detected in the extracts of the *Brassica napobrassica* and *Raphanus sativus* species.

Keywords

plant extracts • germination • inhibition • vigor

INTRODUCCIÓN

En la agricultura sustentable es importante la aplicación de productos naturales para el control de algunas plagas (8, 10, 23), y en particular metabolitos con actividad fitotóxica y/o alelopática, en favor de la producción de alimentos libres de residuos derivados del uso de plaguicidas sintéticos (11).

Los aleloquímicos son considerados una alternativa para el control de malezas en la agricultura al estimular o inhibir la germinación y el crecimiento de algunos vegetales (2). Estos productos naturales son biodegradables, no contaminan el ambiente en comparación con los herbicidas sintéticos (13), son derivados biosintéticamente del metabolismo primario (7).

Los aleloquímicos son metabolitos secundarios sintetizados principalmente por vegetales como parte del mecanismo de defensa y comunicación (25). Estos productos naturales son liberados

mediante una diversidad de señales al medio ambiente por algunos vegetales (planta donadora), generando efectos fitotóxicos en las plantas receptoras de la misma o diferente especie o en los microorganismos del suelo (6).

A pesar de la gran diversidad vegetal que existe en México, el potencial fitotóxico de algunas plantas ha sido poco explorado y aprovechado. Por lo que la investigación en plantas con propiedades fitotóxicas (*in vitro*) y alelopáticas (en suelo) ha sido poco significativa, debido al reducido número de especies vegetales que han sido estudiadas.

Aunque se han reportado efectos fitotóxicos de algunos metabolitos como alcaloides y glucosinolatos (15, 32), la actividad fitotóxica y alelopática generalmente no está determinada por un tipo de metabolito, sino por la acción sinérgica de varios de ellos (2).

Sin embargo, la estructura química de algunos productos naturales con actividad fitotóxica o alelopática podría ser utilizada como modelo en la síntesis de nuevos herbicidas (13).

Desde esta perspectiva se planteó como objetivo de la investigación, evaluar el efecto fitotóxico de los extractos metanólicos de *Dieffenbachia amoena*, *Nerium oleander*, *Raphanus sativus* y *Brassica napobrassica* en la germinación y vigor de las plántulas a través del largo de radícula (LR) y largo de parte aérea (LPA) en dos tipos de malezas: *Chenopodium album* (quelite cenizo) y *Echinochloa crus-galli* (pasto dentado) y en tres especies de semillas recomendadas para evaluar fitotoxicidad: *Lactuca sativa* (lechuga), *Solanum lycopersicum* (tomate) y *Oryza sativa* (arroz) (2).

Existe poca información de la actividad fitotóxica y alelopática de especies vegetales que contienen alcaloides, como las especies *N. oleander* y *D. amoena* y glucosinolatos en *B. napobrassica* y *R. sativus*.

La presencia de estos metabolitos explica la actividad fitotóxica en la germinación de *Echinochloa*

crus-galli, *Parthenium hysterophorus* y *Cynodon dactylon* descrita en *N. oleander* y su efecto alelopático en *Lactuca sativa* (1, 24, 30, 35); el efecto alelopático de *B. napobrassica* en *Kochia arenaria* y *Sorghum halepense* y de *R. sativus* en *L. sativa* y *S. halepense* (24, 33, 35). Sin embargo, se desconoce la actividad fitotóxica y alelopática de *D. amoena* únicamente insecticida (20, 24).

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección del material vegetal

Se recolectaron aleatoriamente muestras de cuatro especies para su identificación taxonómica y preparación de los extractos de *Dieffenbachia amoena* Bull., *Nerium oleander* L., *Raphanus sativus* L. y *Brassica napobrassica* (L.) Mill., libres de plagas, enfermedades y sin daños físicos. Para la certificación taxonómica se prepararon dos ejemplares de herbario por especie, y se depositaron en el Herbario-Hortorio "Jorge Espinoza Salas" de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) (tabla1).

Tabla1. Características geográficas de los sitios de recolección, tipo de tejido y número de registro de las cuatro especies de estudio.

Table1. Geographical characteristics of the collection sites, tissue type and registration number of the four species studied.

| Especie | Familia | Lugar de recolección | Ubicación | Tejido | Número de registro* |
|------------------------------|--------------|------------------------------|-----------------------|----------------|---------------------|
| <i>Dieffenbachia amoena</i> | Araceae | Hueyapan de Ocampo, Veracruz | 18°09' LN y 95°09' LO | Tallo Hoja | 313013 |
| <i>Nerium oleander</i> | Apocynaceae | Texcoco, Estado de México | 19°31' LN y 98°53' LO | Hoja | 313015 |
| <i>Raphanus sativus</i> | Brassicaceae | Mixquiahuala, Hidalgo | 20°13' LN y 99°12' LO | Raíz | 313017 |
| <i>Brassica napobrassica</i> | Brassicaceae | Tlatlauquitepec, Puebla | 19°51' LN y 97°29' LO | Toda la planta | 313011 |

* Herbario-Hortorio "Jorge Espinoza Salas" de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

* Herbal-Hortorio "Jorge Espinoza Salas" Agricultural School of Chapingo.

Preparación del extracto crudo

El material vegetal de cada especie se secó en una estufa a temperatura constante ($50^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 48 h, después se molió en un molino Thomas-Wiley mill (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, EE.UU.).

El extracto metanólico crudo de cada especie se obtuvo mediante un equipo soxhlet durante 48 h. Posteriormente, el extracto se concentró a presión reducida en un rotaevaporador Büchi®. Por dilución seriada se prepararon diferentes concentraciones (1,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0% v/v) para las pruebas de fitotoxicidad.

Bioensayo de fitotoxicidad

Las pruebas biológicas se llevaron a cabo en semillas de *Oryza sativa* y *Solanum lycopersicum*, proporcionadas por el Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo; mientras que las de las malezas *Chenopodium album* y *Echinochloa crus-galli* fueron donadas por el Laboratorio de Malezas del Departamento de Parasitología Agrícola de la UACH.

Las semillas de *Lactuca sativa* fueron adquiridas en una casa comercial. Para evaluar la viabilidad de las semillas se realizó una prueba preliminar de germinación con base en las recomendaciones de la International Seed Testing Association (22).

El bioensayo de fitotoxicidad se llevó a cabo según el método descrito por Pérez-Leal *et al.* (2005). Se añadieron 1,5 ml de cada concentración del extracto metanólico crudo a un círculo de papel filtro Wattman No. 1 ($\varnothing = 9$ cm) de una caja Petri (Unidad Experimental).

El disolvente se dejó evaporar a temperatura ambiente, se colocaron 50 semillas por especie, después se agregaron 2,5 ml de agua destilada a cada caja. Como testigo se usó agua destilada.

Las cajas se sellaron con Parafilm y se colocaron en una cámara germinadora Seedburo® bajo condiciones de luz continua con intensidad luminosa de $15,39 \text{ mmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, humedad relativa de 80% y temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. El mismo procedimiento se repitió para realizar el bioensayo en las semillas de cada especie.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones. Para las especies de *O. sativa*, *S. lycopersicum* y *C. album* la toma de datos se realizó a los 14 días después de la siembra (dds), mientras que para *E. crus-galli* se realizó a los 10 dds y a los siete dds para *L. sativa* como lo establece el ISTA en la prueba de germinación estándar (22).

Las variables que se evaluaron fueron: porcentaje de germinación (% G) mediante el cálculo del número total de semillas germinadas (NSG; semillas con emisión de radícula), y vigor de la plántula: longitud de raíz (LR) y longitud de parte aérea (LPA) de las semillas que lograron germinar (16). La LR se midió (cm) de la base del cuello a la punta de la raíz y la LPA se midió la longitud de coleóptilo para monocotiledóneas (*E. crus-galli* y *O. sativa*) y la longitud de hipocótilo para dicotiledóneas (*C. album*, *L. sativa* y *S. lycopersicum*).

Análisis fitoquímico

Por cromatografía en capa fina (CCF) de gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck) se identificó cualitativamente la presencia de alcaloides, flavonoides, terpenoides y glucosinolatos en los extractos metanólicos crudos de cada especie.

Para la identificación de alcaloides se usó como eluyente metanol:diclorometano (8:2% v/v) y el agente cromogénico fue el reactivo Dragendorff.

La presencia de manchas color marrón en la cromatoplaaca indicaron la presencia de alcaloides.

Para la identificación de flavonoides se empleó como eluyente una mezcla de butanol:ácido acético:agua 40:10:50 (BAW), los agentes cromogénicos fueron 2-aminoetil difenilborinato (NP) y polietilenglicol 4000 (PEG); los componentes se visualizaron mediante UV a una longitud de onda de 365 nm para observar la fluorescencia de color anaranjado esperada para flavonoides (36).

Para la identificación de terpenoides se utilizó como eluyente una mezcla de tolueno : acetato de etilo (85:15% v/v), el agente cromogénico empleado fue vainillina al 1% en etanol y ácido sulfúrico al 10% en etanol, la presencia de manchas en la placa de color violeta indicó prueba positiva para terpenoides (36).

Para la identificación de glucosinolatos se utilizó como eluyente una mezcla de n-butanol : n-propanol : ácido acético:agua (3:1:1:1% v/v), la placa se asperjó con ácido tricloroacético al 25% (v/v) en cloroformo y se colocó en la estufa a 110°C por 10 min.

Posteriormente, la placa se asperjó con una mezcla de hexacianoferrato (III) de potasio al 1% (p/v) y cloruro de hierro (III) al 5%(p/v) en una proporción de 1:1, la presencia de manchas color azul en la cromatoplaaca indicó prueba positiva (36).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias (Tukey, $P \leq 0,05$) con el programa Statistical Analysis System (SAS).

Debido a que las variables están reportadas en porcentaje, para proceder

al análisis de varianza se llevó a cabo la transformación de los datos, con el objetivo de manejarlos bajo una distribución normal.

La transformación de Yates se llevó a cabo con la siguiente propuesta:

$$XT = \sqrt{\text{Arcoseno}(x/100)}$$

donde:

XT = transformación de la variable,

X = variable respuesta expresada en porcentaje.

RESULTADOS

Efecto fitotóxico de los extractos por especie de semilla

A través del análisis estadístico se identificó el efecto fitotóxico de los extractos crudos para cada especie de semilla.

El extracto metanólico crudo de *N. oleander* presentó mayor efecto fitotóxico en la germinación de las semillas y en la inhibición de la LR de *C. album* en comparación con los extractos de las especies restantes; con respecto al crecimiento de la LPA no se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre extractos, solamente con respecto al testigo.

En contraste, en las semillas de *E. crus-galli* se encontró que el extracto metanólico crudo de *B. napobrassica* afectó drásticamente el % G en comparación con las otras especies (tabla 2, pág. 308).

El porcentaje de germinación de *L. sativa* fue afectado por todos los extractos en comparación al testigo, siendo mayormente afectado por el extracto metanólico crudo de *B. napobrassica*; de igual forma, todos los extractos afectaron significativamente el crecimiento de LR y LPA.

Tabla 2. Efecto de los extractos crudos en la germinación y el vigor por especie de semilla.
Table 2. Effect of crude extracts in germination and seed vigor by species.

| Extracto | <i>L. sativa</i> | | | | |
|------------------------|------------------------|---------|-----------------|----------|------------------|
| | % G | LR (cm) | LR % Inhibición | LPA (cm) | LPA % Inhibición |
| <i>D. amoena</i> | 29 c | 0,4 b | 75,0 | 1,6 b | 27,3 |
| <i>N. oleander</i> | 51 b | 0,5 b | 68,8 | 0,95 c | 56,8 |
| <i>R. sativus</i> | 14,6 d | 0,08 c | 95,0 | 0,11 d | 95,0 |
| <i>B. napobrassica</i> | 0,4 e | 0,03 c | 99,8 | 0,14 d | 93,6 |
| Testigo | 100 a | 1,6 a | 0,0 | 2,2 a | 0,0 |
| DMSH | 6,8 | 0,2 | | 0,3 | |
| Extracto | <i>S. lycopersicum</i> | | | | |
| | % G | LR (cm) | LR % Inhibición | LPA (cm) | LPA % Inhibición |
| <i>D. amoena</i> | 30,6 c | 0,9 c | 62,5 | 1,5 c | 51,6 |
| <i>N. oleander</i> | 63,2 b | 1,9 b | 20,8 | 2,2 b | 29,0 |
| <i>R. sativus</i> | 58,5 b | 0,7 d | 70,8 | 2,3 b | 25,8 |
| <i>B. napobrassica</i> | 25,4 c | 0,7 d | 97,1 | 0,9 d | 71,0 |
| Testigo | 100 a | 2,4 a | 0,0 | 3,1 a | 0,0 |
| DMSH | 11,32 | 0,2 | | 0,2 | |
| Extracto | <i>O. sativa</i> | | | | |
| | % G | LR (cm) | LR % Inhibición | LPA (cm) | LPA % Inhibición |
| <i>D. amoena</i> | 67,4 b | 1,8 b | 33,3 | 1,4 d | 58,8 |
| <i>N. oleander</i> | 52,3 c | 0,9 c | 66,7 | 2,2 b | 35,3 |
| <i>R. sativus</i> | 60,6 cb | 0,7 d | 74,1 | 1,8 cb | 47,1 |
| <i>B. napobrassica</i> | 28,5 d | 0,8 dc | 97,0 | 1,6 cd | 52,9 |
| Testigo | 100 a | 2,7 a | 0,0- | 3,4 a | 0,0- |
| DMSH | 13,7 | 0,2 | | 0,4 | |
| Extracto | <i>C. album</i> | | | | |
| | % G | LR (cm) | LR % Inhibición | LPA (cm) | LPA % Inhibición |
| <i>D. amoena</i> | 6,6 cd | 0,33 b | 78,0 | 0,5 b | 75,0 |
| <i>N. oleander</i> | 3,8 d | 0,14 c | 90,7 | 0,49 b | 75,5 |
| <i>R. sativus</i> | 12,7 cb | 0,25 cb | 83,3 | 0,5 b | 75,0 |
| <i>B. napobrassica</i> | 17,8 b | 0,25 cb | 83,3 | 0,42 b | 79,0 |
| Testigo | 100 a | 1,5 a | 0,0 | 2,0 a | 0,0 |
| DMSH | 7,0 | 0,2 | | 0,3 | |
| Extracto | <i>E. crus-galli</i> | | | | |
| | % G | LR (cm) | LR % Inhibición | LPA (cm) | LPA % Inhibición |
| <i>D. amoena</i> | 4,4 b | 0,4 b | 84,6 | 1,0 cb | 68,8 |
| <i>N. oleander</i> | 3,8 b | 0,5 b | 80,8 | 1,2 b | 62,5 |
| <i>R. sativus</i> | 4,4 b | 0,5 b | 80,8 | 0,8 cb | 75,0 |
| <i>B. napobrassica</i> | 0,7 c | 0,4 b | 84,6 | 0,5 c | 84,4 |
| Testigo | 100 a | 2,6 a | 0,0 | 3,2 a | 0,0 |
| DMSH | 2,4 | 0,4 | | 0,5 | |

% G: porcentaje de germinación, LR: longitud de raíz, LPA: longitud de la parte aérea. DMSH: diferencia mínima significativa honesta. tMedias con la misma letra dentro de cada columna son estadísticamente iguales con base en la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

% G: percentage of germination, RL: root length, LPA: length of the aerial part. DMSH: least significant difference honest. t Medias with the same letter in columns are statistically equal based on the Tukey test ($P \leq 0.05$).

Sin embargo los extractos metanólicos crudos de *R. sativus* y *B. napobrassica* fueron significativamente diferentes a los restantes y el testigo en la misma especie de semilla (tabla2, pág. 308).

El extracto metanólico crudo de *B. napobrassica* presentó nuevamente el mayor efecto fitotóxico al afectar la LPA de las semillas de *S. lycopersicum*; aunque algunos extractos metanólicos crudos afectaron de igual forma el % G; mientras que la LR que fue afectada por algunos de los extractos metanólicos, los de *R. sativus* y *B. napobrassica* con el efecto mayor que todo el resto, entre las semillas que lograron germinar.

Así mismo, el extracto metanólico crudo de *B. napobrassica* presentó el mayor efecto fitotóxico en el % G de *O. sativa*; mientras que el extracto metanólico crudo de *D. amoena* fue el que afectó en mayor porcentaje el crecimiento de la LPA con respecto a los extractos restantes.

Los extractos metanólicos crudos de *D. amoena* y *B. napobrassica* afectaron en mayor grado el porcentaje de crecimiento de la LR de *O. sativa*. Los extractos metanólicos de las cuatro especies presentaron mayor efecto fitotóxico en comparación con los respectivos testigos.

Los resultados permitieron inferir mayor sensibilidad en las semillas de *L. sativa* por el extracto metanólico crudo de *B. napobrassica*; lo que explica que las semillas de esa especie se recomiendan para realizar evaluaciones de fitotoxicidad (2).

En el presente estudio no se analizó estadísticamente la interacción del efecto fitotóxico entre las semillas de malezas y las especies de cultivo, así como, entre dicotiledóneas y monocotiledóneas, con la finalidad de identificar alguna diferencia.

Efecto de los extractos en el porcentaje de germinación

El extracto metanólico crudo de *D. amoena*, desde la concentración más baja (1%) afectó drásticamente la germinación de las semillas de *C. album* y de *E. crus-galli* (68,1 y 100%, respectivamente).

En contraste, en las semillas de *L. sativa*, *S. lycopersicum* y *O. sativa* se presentó una inhibición gradual al ir incrementando la concentración del mismo extracto (figura 1A, pág. 310).

El extracto metanólico crudo de *N. oleander* presentó el mismo efecto que el extracto anterior en *C. album* y *E. crus-galli*; pero en las semillas de las especies restantes (*L. sativa*, *O. sativa* y *S. lycopersicum*) el % G disminuyó gradualmente (figura 1B, pág. 310).

Los extractos metanólicos crudos de *R. sativus* y *B. napobrassica* presentaron el mismo efecto de inhibición del % G en todas las especies de semillas a diferentes concentraciones que los extractos anteriores. Sin embargo, el efecto de inhibición del % de G de estos dos extractos fue más drástico en las semillas de *C. album* y *E. crus-galli* que en *O. sativa* y *S. lycopersicum* en comparación con los extractos de *D. amoena* y *N. oleander*, la excepción fue *L. sativus* (figuras 1C y 1D, pág. 310).

Efecto de los extractos en el vigor de plántulas (LR y LPA)

La figura 2 (pág. 311) y figura 3 (pág. 312), muestran el efecto de los extractos metanólicos crudos en el crecimiento de la LR y LPA de las semillas que lograron germinar.

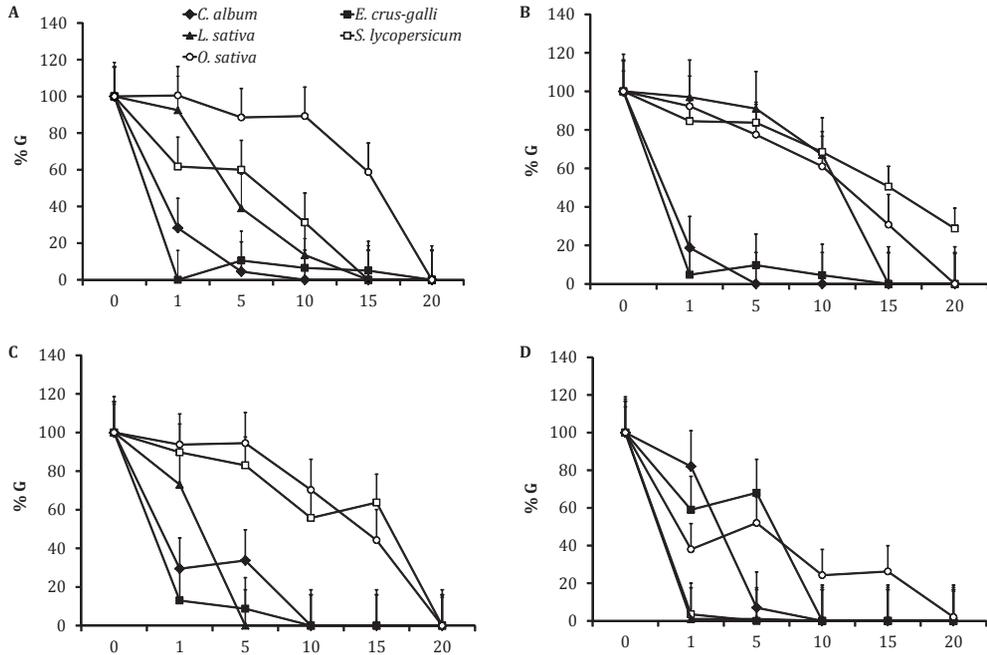


Figura 1. Efecto de cuatro extractos metanólicos crudos de: (A) *D. amoena*, (B) *N. oleander*, (C) *R. sativus* y (D) *B. napobrassica* sobre el porcentaje de germinación de cinco especies vegetales.

Figure 1. Effect of four crude methanol extracts of: (A) *D. amoena*, (B) *N. oleander*, (C) *R. sativus* y (D) *B. napobrassica* on the germination percentage five plant species.

El extracto metanólico crudo de *D. amoena* afectó principalmente el crecimiento de la LR de *C. album* y *L. sativa*. Sin embargo, en las semillas de las especies *E. crus-galli* y *O. sativa* se observó estimulación del crecimiento de la radícula (LR) en la concentración más baja (1%) (figura 2A, pág. 311).

El efecto de inhibición se repitió en el desarrollo de la LPA en las mismas especies, las excepciones fueron *E. crus-galli* y *O. sativa* (figura 3A, pág. 312).

Por otro lado, el extracto metanólico crudo de *N. oleander* afectó negativamente el desarrollo radicular (LR) de *C. album*, *E. crus-galli* y *O. sativa*, mientras que en *L. sativa* y *S. lycopersicum* se observó el efecto opuesto (figura 2B, pág. 311).

El mismo efecto de inhibición se encontró en el desarrollo de la LPA en *C. album*, *S. lycopersicum* y *O. sativa* y de estimulación en *E. crus-galli* desde la menor concentración y en *L. sativa* a las concentraciones de 1 y 5% (figura 2B, pág. 311 y figura 3B, pág. 312).

Los extractos de algunas especies solamente ocasionaron inhibición de la LR y LPA, tal es el caso del extracto metanólico crudo de *R. sativus* que inhibió el crecimiento de la radícula en todas las especies de semillas, así como el crecimiento de la LPA (figura 2C, pág. 311 y figura 3C, pág. 312), la excepción en la LPA fue *S. lycopersicum*, donde se encontró estimulación.

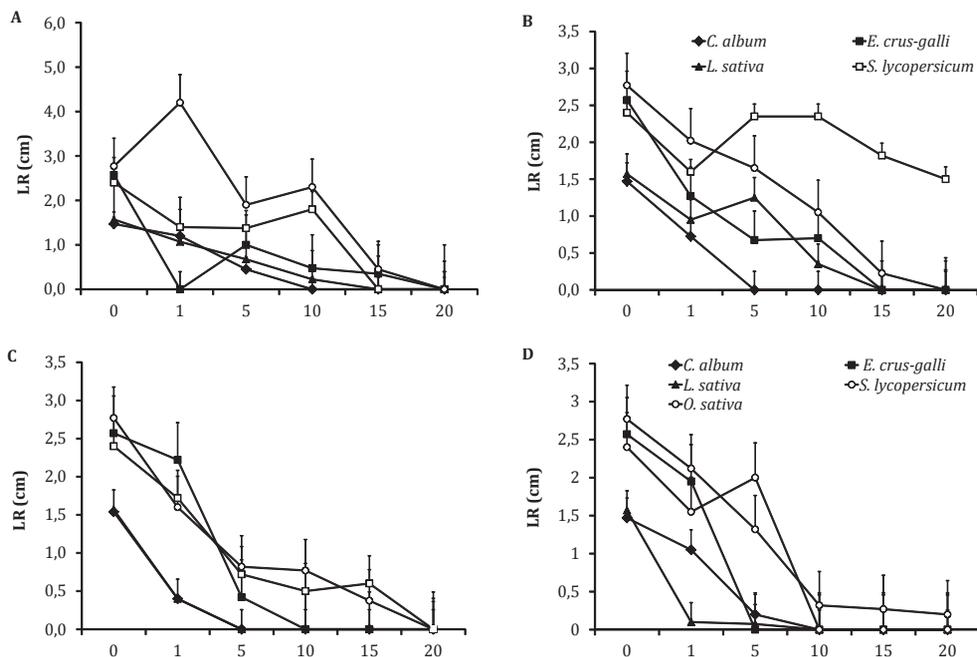


Figura 2. Efecto de cuatro extractos metanólicos crudos de: (A) *D. amoena*, (B) *N. oleander*, (C) *R. sativus* y (D) *B. napobrassica* en el crecimiento de la longitud de la raíz (LR) de cinco especies vegetales.

Figure 2. Effect of four crude methanol extracts of: (A) *D. amoena*, (B) *N. oleander*, (C) *R. sativus* y (D) *B. napobrassica* growth in root length (RL) five plant species.

Finalmente, el extracto metanólico crudo de *B. napobrassica* presentó el mismo efecto que el extracto metanólico crudo de *R. sativus*, con estimulación en *S. lycopersicum* para LR y LPA (figura 2D, y figura 3D, pág. 312).

Análisis fitoquímico

Los rendimientos de los extractos metanólicos crudos de *D. amoena*, *N. oleander*, *R. sativus* y *B. napobrassica* fueron 27,0; 16,0; 20,0 y 21,0 g 100 g⁻¹ peso

seco, respectivamente. Por cromatografía en capa fina (CCF) se identificó la presencia de glucosinolatos en los extractos de *B. napobrassica* y *R. sativus* (*Brassicaceae*).

Se detectó la presencia de terpenoides en el extracto de *D. amoena*. En el extracto metanólico crudo de hoja de *N. oleander* se encontró la presencia de alcaloides y terpenoides (tabla 3, pág. 312).

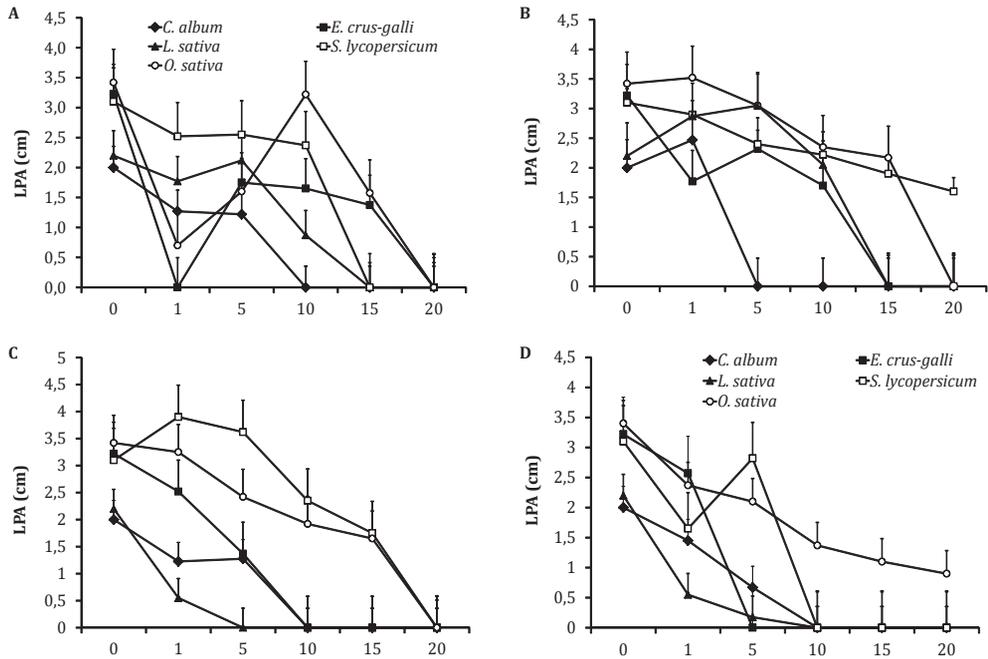


Figura 3. Efecto de cuatro extractos metanólicos crudos de: (A) *D. amoena*, (B) *N. oleander*, (C) *R. sativus* y (D) *B. napobrassica* en el crecimiento de la longitud de la parte aérea (LPA) de cinco especies vegetales.

Figure 3. Effect of four crude methanol extracts of: (A) *D. amoena*, (B) *N. oleander*, (C) *R. sativus* y (D) *B. napobrassica* in the growth of the length of the aerial part (LPA) five plant species.

Tabla 3. Análisis fitoquímico del extracto metanólico crudo de cuatro especies vegetales.

Table 3. Analysis phytochemical crude methanol extract of four plant species.

| Especie | Familia | Tipo de metabolito | | | | Referencias |
|------------------------------|---------------------|--------------------|--------|--------|----------|--------------------------------------|
| | | Alcal | Flavon | Terpen | Glucosin | |
| <i>Dieffenbachia amoena</i> | <i>Araceae</i> | - | - | + | - | Glucocalcoides y Sapogeninas (18) |
| <i>Nerium oleander</i> | <i>Apocynaceae</i> | + | - | + | - | Triterpenos (1, 27), Alcaloides (27) |
| <i>Raphanus sativus</i> | <i>Brassicaceae</i> | - | - | - | + | Glucosinolatos (30) |
| <i>Brassica napobrassica</i> | <i>Brassicaceae</i> | - | - | - | + | Glucosinolatos (30) |

(-) Ausencia; (+) Presencia; Alcal. = Alcaloides; Flavon = Flavonoides; Terpen = Terpenoides; Glucosin = Glucosinolatos.

(-) Absence; (+) Presence; Alcal. = Alkaloids; Flavon = Flavonoids; Terpen = Terpenoids; Glucosin = Glucosinolates.

DISCUSIÓN

Los productos naturales presentan metabolitos secundarios, compuestos de bajo peso molecular que tienen importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos.

Una síntesis activa de metabolitos secundarios también se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: a) el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), b) el ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos, c) la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y d) la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (31).

En este estudio, los extractos metanólicos crudos de *D. amoena* y *N. oleander* afectaron drásticamente la germinación de *C. album* y *E. crus-galli* desde la concentración más baja, así como la disminución gradual a las diferentes concentraciones en *L. sativa*, *O. sativa* y *S. lycopersicum* (figuras 1A y 1B, pág. 310).

Al respecto, Alfonso *et al.* (2005) reportaron inhibición de la germinación con los extractos acuosos de *N. oleander* en cinco especies de malezas. Asimismo, Uludag *et al.* (2006) reportaron el mismo efecto de los extractos acuosos de *N. oleander* a diferentes concentraciones en *L. sativa*.

Los extractos de *R. sativus* y *B. napobrassica* mostraron mayor efecto de inhibición del % G a ciertas concentraciones en algunas especies de semillas, específicamente las de malezas (*C. album* y *E. crus-galli*) en comparación con las semillas de especies cultivadas (*S. lycopersicum* y *O. sativa*) (figuras 1C y

1D, pág. 310) y en *L. sativus* por ser más sensible (12, 13, 23), lo que concuerda con Uludag *et al.* (2006) quienes registraron inhibición de la germinación de *L. sativa* por los extractos acuosos de *R. sativus*, resultados que coinciden con los reportados en el presente trabajo.

Así mismo, se ha reportado que extractos de algunas especies vegetales a bajas concentraciones presentan efectos de estimulación, y a concentraciones mayores se observa el efecto opuesto; es decir los aleloquímicos presentes en extractos de algunas especies pueden inhibir o estimular la germinación a concentraciones menores (2), pero a concentraciones más elevadas pueden llegar a ser fitotóxicos con acción inhibidora o herbicida (29).

Hoffmann *et al.* (2007) encontraron que los extractos de *Dieffenbachia picta* estimularon la germinación de semillas de *L. sativa* a la concentración más baja (0,0625 mg mL⁻¹). Asimismo, un efecto similar se encontró en *C. secundiflora* por García-Mateos *et al.* (2011) al estudiar el efecto de la fitotoxicidad de la especie en *Ipomoea purpurea*. Xuan *et al.* (2003) encontraron que el extracto acuoso de *Azadirachta indica* estimuló la germinación de las semillas y el crecimiento de los brotes de *O. sativa* a una concentración de 0,05 mg mL⁻¹.

Se encuentra reportado que el efecto de estimulación en algunos extractos se debe a la presencia de metabolitos específicos como alcaloides y terpenoides (14, 29).

Los extractos metanólicos crudos de *R. sativus* y *B. napobrassica* provocaron inhibición de la LR y LPA. Al respecto, Moyer y Huang (1997) señalan que el extracto acuoso de *B. napobrassica* fue uno de los más efectivos en la inhibición del

crecimiento de las raíces de *Kochia arenaria* a la concentración de 1%; mientras que, Uludag *et al.* (2006) indicaron que varias especies (*Brassica napobrassica*, *Brassica campestris* subsp *rapa* y *Raphanus sativus*) de la familia *Brassicaceae* presentaron estimulación en *Sorgum halepense* (L.) Pers.

Los resultados mostraron que los extractos metanólicos crudos de *R. sativus* y *B. napobrassica* afectaron la raíz en la mayoría de las especies, lo cual permitió asumir que fue la parte más sensible en comparación con los hipocótilos y coleótilos de las dicotiledóneas y monocotiledóneas, respectivamente. Estos daños se caracterizaron por raíces primarias raquílicas o ausentes, atrofiadas o ahiladas; hipocótilos o coleótilos cortos, gruesos o deformados. Estos resultados concuerdan con los de Gatti *et al.* (2008) quienes señalan que la presencia de anomalías en las raíces ocurre con mayor frecuencia debido a que estos órganos son más sensibles a la acción fitotóxica o alelopática, que las partes aéreas de la planta.

García-Mateos *et al.* (2011) mencionan que plántulas anormales por daños en la LR y LPA no podrán sobrevivir en condiciones de campo abierto. Para los fines de este trabajo una planta anormal (2014) es aquella que no presenta capacidad para desarrollarse a pesar de crecer en condiciones favorables y que tiene una de sus partes deterioradas.

Hoffmann *et al.* (2007) reportaron que algunos extractos acuosos disminuyen la velocidad de desplazamiento y translocación de los componentes nutritivos desde la radícula de *L. sativa*, así como en el hipocótilo de algunas especies de semillas (*L. sativa* y *Bidens pilosa*), afectando la movilización de las reservas de alimentos.

En el presente estudio los extractos fueron de polaridad semejante a los

acuosos, lo que podría explicar los daños observados en la radícula.

Las diferencias observadas en las variables % G, LR y LPA en las semillas de todas las especies por los diferentes extractos metanólicos podría deberse a: a) diferente composición de los extractos de cada especie vegetal (18); b) presencia únicamente de metabolitos polares por el disolvente de extracción (metanol) (28); c) un efecto sinérgico de los diversos componentes del extracto (14, 18); d) a modo o mecanismo de acción de cada tipo de metabolito presente en el extracto (28); y e) respuesta diferencial de cada especie de semilla (29).

Por otro lado, el mecanismo de acción de algunos metabolitos producidos por una planta se puede manifestar principalmente a través de la inhibición del crecimiento radicular, lo que significa que se está afectando de manera específica a diversas organelas celulares relacionadas con el funcionamiento de mitocondrias (respiración), cloroplastos (fotosíntesis), meristemas primarios y secundarios (división y elongación celular), propiedades de las membranas, cinética enzimática, síntesis de proteínas, estructuras cromosómicas, entre otros (28).

Otros factores pueden afectar la capacidad de dispersión y acumulación en los compartimentos intracelulares, lo que también altera la germinación y el crecimiento de la plántula (19, 26).

Con respecto al análisis fitoquímico de los extractos metanólicos crudos de *B. napobrassica* y *R. sativus* (*Brassicaceae*) mostraron la presencia de glucosinolatos, pero la primera presentó mayor fitotoxicidad al afectar el porcentaje de germinación principalmente de *E. crus-galli*, *L. sativa*, *S. lycopersicum* y *O. sativa*, y ambas el vigor de las plántulas (LR y LPA)

de la mayoría de las especies de semillas (tabla 2, pág. 308).

Auger y Thibout (2004) señalan la diversa actividad biológica de glucosinolatos y otros compuestos azufrados (insecticida, herbicida, fungicida y bactericida), lo cual podría explicar los efectos fitotóxicos encontrados en el presente trabajo. Este tipo de metabolitos presentan actividad alelopática (33, 35) porque afectan la germinación y el crecimiento de especies cultivadas (32) y de algunas malezas en su hábitat (27).

Aunque el efecto fitotóxico observado en *R. sativus* y *B. napobrassica* podría deberse también a la naturaleza de otros compuestos activos presentes en los extractos, sin embargo, en análisis por CCF se encontró que los compuestos azufrados son los más abundantes (4).

Las especies de la familia *Brassicaceae* sintetizan otros compuestos secundarios, como cucurbitacinas y brasininas cuyo potencial fitosanitario no se puede ignorar (5). Ambas sustancias no fueron analizadas en el presente estudio; sin embargo, en caso de estar presentes podrían actuar de manera sinérgica e incrementar la actividad del extracto.

Aunque, Auger y Thibout (2004) señalan que las plantas de la familia *Brassicaceae* presentan actividad herbicida por la presencia de sustancias azufradas (glucosinolatos).

En el presente trabajo el extracto metanólico crudo de *D. amoena* presentó terpenoides, aunque existen pocos estudios fitoquímicos de *D. amoena* que expliquen su toxicidad. Sin embargo, Hunter y Becerra (1976) identificaron en extractos acuosos de *D. amoena* la presencia de glucoalcaloides esteroidales y sapogeninas esteroidales.

Por otra parte, Brielmann *et al.* (2006) mencionan que algunos tipos de

terpenoides inhiben el crecimiento de malezas en suelo (alelopatía), por lo que la presencia de estos compuestos podría explicar los efectos fitotóxicos observados en el % G y LPA en *S. lycopersicum*, *C. album* y *O. sativa* y en el crecimiento de la raíz de *E. crus-galli*.

En el extracto metanólico crudo de *N. oleander* se detectaron alcaloides y terpenoides. Varios reportes señalan la presencia de glicósidos cardiotónicos, alcaloides y triterpenoides en la misma especie (1, 30).

Hoffmann *et al.* (2007) señalan que la germinación se puede ver afectada negativamente por la presencia de saponinas en los extractos de *N. oleander* debido a que estos terpenoides parecen actuar como inhibidores de diversas reacciones enzimáticas en algunas especies de semilla. También algunos alcaloides, presentan propiedades alelopáticas (12). En esto, García-Mateos *et al.* (2010) y Aniszewski (2007) mencionan que las concentraciones de algunos alcaloides en plantas pueden influir como reguladores de crecimiento estimulando el crecimiento en ciertas especies de dicotiledóneas.

La actividad biológica de algunas plantas se atribuye a la presencia de diversos metabolitos de diferente naturaleza química, lo que aumenta la eficacia de los extractos botánicos como resultado de un efecto sinérgico (34), una ventaja de su uso es la aparición tardía de resistencias frente a los extractos puros (21).

Es importante señalar que los efectos fitotóxicos de los extractos observados *in vitro* no permite hacer inferencias, o incluso extender los resultados a las condiciones de campo a causa de la aparición simultánea de factores bióticos y abióticos que pueden influir en la actividad de los extractos o compuestos puros alelopáticos (2, 28).

CONCLUSIONES

Todos los extractos afectaron el % de G, LR y LPA principalmente de las semillas de malezas (*E. crus-galli* y *C. album*) en comparación de las cultivadas (*S. lycopersicum* y *O. sativa*). El extracto metanólico de *B. napobrassica* presentó el mayor efecto fitotóxico respecto de los extractos de las especies restantes, al inhibir la germinación de la mayoría de las semillas (*E. crus-galli*, *L. sativa*, *S. lycopersicum* y *O. sativa*).

El extracto metanólico de *N. oleander* mostró menor toxicidad que el anterior, al afectar el porcentaje de germinación de las semillas de todas las especies.

Los extractos de las especies restantes mostraron menor efecto fitotóxico que los anteriores.

El extracto de *B. napobrassica* fue el que afectó negativamente el crecimiento de LR y LPA de la mayoría de las especies.

En contraste, el extracto de *N. oleander* fue el único que inhibió el crecimiento de la LR de *C. album* y el mismo efecto se observó por el extracto metanólico de *R. sativus* en el crecimiento de la LPA de *L. sativa*. Únicamente las semillas de *S. lycopersicum* mostraron estimulación en el crecimiento de la LR y LPA por el extracto de *B. napobrassica*.

El análisis fitoquímico mostró la presencia de glucosinolatos en los extractos que mostraron mayor fitotoxicidad (*B. napobrassica* y *R. sativus*).

BIBLIOGRAFÍA

1. Alfonso, M. R.; Villasana, Y.; Lorenzo, M. E.; Álvarez, D.; Pérez, D.; Uranga, H. 2005. Análisis fitoquímico de cinco plantas con actividad alelopática. Memorias XVII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas. Varadero, Matanzas, Cuba. 592-595.
2. Anaya, A. L. 2003. Alelopatía. En: Anaya, A. L. (Ed.). Ecología Química. Plaza y Valdés. México. 255-298.
3. Aniszewski, T. 2007. Biological significance of alkaloids. In: Aniszewski, T. (Ed.). Alkaloids Secrets of Life. Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role. Elsevier: Oxford, RU. 141-180.
4. Auger, J.; Thibout, E. 2004. Sustancias azufradas de los *Allium* y de las crucíferas: potencial fitosanitario. En: Regnault-Roger, C.; Philogene, B. J. R.; Vincent, Ch. (Eds.). Biopesticidas de Origen Vegetal. Mundi-Prensa, Madrid, España. 77-92.
5. Baur, R.; Staedler, F.; Monde, K.; Takasugi, M. 1998. Phytoalexins from *Brassica* (Cruciferae) as oviposition stimulants the cabbage root fly, *Delia radicum*. Chemoecology. 8: 163-168.
6. Benyas, E.; Hassanpouraghdam, M. B.; Zehtabsalmasi, S.; Khatamian-Oskoei, O. S. 2010. Allelopathic effects of *Xanthium strumarium* L. shoot aqueous extract on germination, seedling growth and chlorophyll content of lentil (*Lens culinaris* Medic.). Romain Biotechnological Letters. 15: 5223-5228.
7. Bhowmik, P. C.; Inderjit. 2003. Challenges and opportunities in implementing allelopathy for natural weed management. Crop Protection. 22: 661-671.
8. Boiteux, J. J.; Hapon, M. V.; Fernández, M. de los A.; Lucero, G. C.; Pizzuolo, P. H. 2015. Efecto del extracto acuoso de chañar (*Geoffroea decorticans* Burkart) sobre *Botrytis cinerea*, como posible alternativa para su control durante poscosecha de uva de mesa. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina. 47(1): 241-250.

9. Briellmann, H. L.; Setzer, W. N.; Kaufman, P. B.; Kirakosyan, A.; Cseke, L. J. 2006. Phytochemicals: The chemical components of plants. In: Cseke, L. J.; Kirakosyan, A.; Kaufman, P. B.; Warber, S. L.; Duke, J. A.; Briellmann, H. L. (Eds.). *Natural Products from Plants*. CRC-Press, Boca Raton, FL. EEUU. 1-49.
10. Castellanos González, L.; Lorenzo Nicao, M. E.; Muiño, B. L.; Hernández Pérez, R.; Guillen Sánchez, D. 2015. Efecto in vitro de plaguicidas comerciales sobre *Trichoderma harzianum* cepa A-34. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina. 47(2): 185-196.
11. Chiapusio, G.; Gallet, C.; Dobremez, J. F.; Pellisier, F. 2004. Compuestos alelopáticos: ¿herbicidas del futuro? En: Regnault-Roger, C.; Philogene, B. J. R.; Vincent, Ch. (Eds.). *Biopesticidas de Origen Vegetal*. Mundi-Prensa, Madrid, España. 153-171.
12. Cordell, G. A. 2013. Fifty years of alkaloid biosynthesis in Phytochemistry. *Phytochemistry*. 91: 29-51.
13. Duke, S. O.; Scheffler, B. E.; Dayan, F. E. 2002. Allelochemical as herbicides. In: Reigosa, M. J.; Pedrol, N. (Eds.). *Allelopathy from Molecules to Ecosystems*. Enfield (NH), EEUU. 183-195.
14. García-Mateos, M. R.; Pérez-Laínez, D.; Soto-Hernández, M.; Rodríguez-Pérez, J. E.; Kite, G. 2010. Phytotoxic activity of *Calia secundiflora* (Ortega) Yakovlev. *Allelopathy Journal*. 26: 23-34.
15. García-Mateos, M. R.; Castillo, A. M.; Zárate-Hernández, J. M.; Barrón-Yáñez, R. M. 2011. Extractos de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev con potencial actividad fitotóxica. *Interiencia*. 36: 779-784.
16. García-Mateos, M. R.; Sánchez-Navarro, C.; Martínez-Solís, J.; Pérez-Grajales, M. 2013. Actividad fitotóxica de los extractos de chile manzano (*Capsicum pubescens* R & P). *Revista Chapingo, Serie Horticultura*. 19: 23-33.
17. Gatti, A. B.; Lima, M. I. S.; Pérez, S. C. J. G. A. 2008. Allelopathic potential of *Ocotea odorifera* (Vell) Rohwer on the germination and growth of *Lactuca sativa* L. and *Raphanus sativus* L. *Allelopathy Journal*. 21: 73-82.
18. Ghayal, N.; Dhupal, K.; Deshpande, N.; Ruikar, A.; Phalgune, U. 2013. Phytotoxic effects of leaf leachates of an invasive weed *Synedrella nodiflora* and characterization of its allelochemical. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 19: 79-86.
19. Hoffmann, C. E.; Neves, L. A. S.; Bastos, C. F.; Wallau, G. L. 2007. Atividade alelopática de *Nerium oleander* L. e *Dieffenbachia picta* Schott em sementes de *Lactuca sativa* L. e *Bidens pilosa* L. *Revista de Ciências Agroveterinárias*. 6: 11-21.
20. Hunter, Z. E.; Becerra, C. V. 1976. Estudios químicos y aspectos farmacológicos de un anticonceptivo vegetal. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*. 2: 5-35.
21. Isman, M. B. 1997. Neem insecticides. *Pesticide Outlook*. 8: 32-38.
22. ISTA. 2014. Certificates. International Rules for Seed Testing. The International Seed Testing Association. Bassesdorf, Switzerland. 1-12 p.
23. Martinotti, M. D.; Castellanos, S. J.; González, R.; Camargo, A.; Fanzone, M. 2016. Efecto nematocida de extractos de ajo, orujo de uva y alperujo de aceituna; sobre *Meloidogyne incognita*, en vid, cv Chardonnay. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina. 48(1): 211-224.
24. Moyer, J. R.; Huang, H. C. 1997. Effect of aqueous extracts of crop residues on germination and seedling growth of ten weed species. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 38: 131-139.
25. Pannacci, E.; Pettorossi, D.; Tei, F. 2013. Phytotoxic effects of aqueous extracts of sunflower on seed germination and growth of *Sinapis alba* L., *Triticum aestivum* L. and *Lolium multiflorum* Lam. *Allelopathy Journal*. 32: 23-36.
26. Pérez-Leal, R.; García-Mateos, M. R.; Vásquez, T. R.; Colinas-León, M. T. 2005. Allelopathic potential of *Petiveria alliacea* L. *Agronomy for Sustainable Development*. 25:177-182.

27. Petersen, J.; Belz, R.; Walker, F.; Hurlle, K. 2001. Weed suppression by release of isothiocyanates from turnip-rape mulch. *Agronomy Journal*. 93: 37-43.
28. Prichoa, F. C.; Leyser, G.; Vladimir-Oliveira, J.; Cansian, R. L. 2013. Comparative allelopathic effects of *Cryptocarya moschata* and *Ocotea odorifera* aqueous extracts on *Lactuca sativa*. *Acta Scientiarum*. 35: 197-202.
29. Qasem, J. R. 2002. Plants as sources of natural herbicides against branched broomrape (*Orobanche ramosa* L.). In: Reigosa, M. J.; Pedrol, N. (Eds.). *Allelopathy from Molecules to Ecosystems*. Enfield (NH), EEUU. p. 153-182.
30. Santhi, R.; Lakshami, G.; Priyadarshini, A. M.; Anandraj, L. 2011. Phytochemical screening of *Nerium oleander* leaves and *Momordica charantia* leaves. *International Research Journal of Pharmacy*. 2: 131-35.
31. Sepúlveda-Jiménez, G.; Porta-Ducoing, H.; Sosa-Rocha, M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21: 355-363.
32. Soltys, D.; Krasuska, U.; Bogatek, R.; Gniazdowska, A. 2013. Allelochemicals as bioherbicides. present and perspectives. In: Price, A. J.; Kelton, J. A. (Eds.). *Herbicides. Current Research and Case Studies in Use*. Wydawnictwo InTech, Chorzow. 517-542.
33. Sonderby, I. E.; Geu-Flores, F.; Halkier, B. A. 2010. Biosynthesis of glucosinolates-genes discovery and beyond. *Trends in Plant Science*. 15: 283-290.
34. Spelman, K.; Duke, J. A.; Bogenschutz-Godwin, M. J. 2006. The synergy principle at work with plants, pathogens, insects, herbivores, and humans. In: Cseke, L. J.; Kirakosyan, A.; Kaufman, P. B.; Warber, S. L.; Duke, J. A.; Brielmann, H. L. (Eds.). *Natural Products from Plants*. CRC-Press, Boca Raton, FL. EEUU. 475-497.
35. Uludag, A.; Uremis, I.; Arslan, M.; Gozcu, D. 2006. Allelopathy studies in weed science in Turkey-a review. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 20: 419-426.
36. Wagner, H.; Bladt, S. 1996. *Plant Drug Analysis: A thin layer chromatography atlas*. Springer, Berlin, Alemania. 386 p.
37. Xuan, T. D.; Eiji, T.; Hiroyuki, T.; Mitsuhiro, M.; Khanh, T. D.; Chung, I. M. 2003. Evaluation on phytotoxicity of neem (*Azadirachta indica*. A. Juss) to crops and weeds. *Crop Protection*. 23: 335-345.