

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

FACTORES SUELO Y PLANTA EN LA EXPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD  
ALELOPÁTICA EN CULTIVARES DE CEBADA

por

Mathías COLLARES DISSIMOZ

TESIS presentada como uno de  
los requisitos para obtener el  
título de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2018

Tesis aprobada por:

Director: -----  
Ing. Agr. (Dra.) Grisel Fernández

-----  
Ing. Agr. (Dra.) Juana Villalba

-----  
QF (Dra.) Verónica Cesio

Fecha: 1 de noviembre de 2018

Autor: -----  
Mathías Collares Dissimoz

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a la Ing. Agr. Grisel Fernández, por su dedicación y disponibilidad para que este trabajo saliera adelante, así como también por el estímulo continuo para nuestra formación como profesionales y personas.

A mis padres que me dieron la oportunidad de estudiar y me dieron su apoyo incondicional.

A Daniela, a mis hijas y amigos que de una u otra forma fueron parte de este camino.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....	2
2.1. DEFINICIÓN DE ALELOPATÍA.....	2
2.2. GENERALIDADES DEL FENÓMENO DE LA ALELOPATÍA.....	2
2.3. TIPOS DE ALELOQUÍMICOS Y MODOS DE ACCIÓN.....	4
2.4. USOS POTENCIALES DE LA ALELOPATÍA.....	6
2.5. ALELOPATÍA EN CEBADA.....	8
2.5.1. <u>Aleloquímicos presentes en la cebada</u> .....	9
2.5.2. <u>Antecedentes en Uruguay</u> .....	9
2.6. EFECTO DEL SUELO Y DEL ESTADO FENOLÓGICO DE LA PLANTA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA ALELOPATÍA.....	10
2.6.1. <u>Efecto de las propiedades físico-químicas del suelo</u> .....	10
2.6.2. <u>Efecto de los microorganismos del suelo</u> .....	11
2.6.3. <u>Densidad dependencia</u> .....	13
2.6.4. <u>Efecto del momento de liberación</u> .....	15
2.7. BIOENSAYOS Y DIFICULTADES EN LA INVESTIGACIÓN.....	17
2.7.1. <u>Bioensayos de germinación de semillas</u> .....	18
2.7.2. <u>Bioensayos con extractos/lixiviados o material vegetal</u> .....	18
2.7.3. <u>Experimentos con carbón activado</u> .....	20

2.7.4. <u>Diseño de los bioensayos</u> .....	21
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	23
3.1. EXPERIMENTO 1 .....	23
3.1.1. <u>Metodología de instalación</u> .....	23
3.1.2. <u>Tratamientos y diseño experimental</u> .....	24
3.1.3. <u>Determinaciones</u> .....	26
3.1.4. <u>Procesamiento de los datos</u> .....	26
3.2. EXPERIMENTO 2 .....	26
3.2.1. <u>Metodología de instalación</u> .....	26
3.2.2. <u>Tratamientos y diseño experimental</u> .....	27
3.2.3. <u>Determinaciones</u> .....	28
3.2.4. <u>Procesamiento de los datos</u> .....	29
3.3. EXPERIMENTO 3 .....	29
3.3.1. <u>Metodología de instalación</u> .....	29
3.3.2. <u>Tratamientos y diseño experimental</u> .....	30
3.3.3. <u>Determinaciones</u> .....	31
3.3.4. <u>Procesamiento de los datos</u> .....	31
3.4. EXPERIMENTO 4 .....	32
3.4.1. <u>Metodología de instalación</u> .....	32
3.4.2. <u>Tratamientos y diseño experimental</u> .....	32
3.4.3. <u>Determinaciones</u> .....	33
3.4.4. <u>Procesamiento de los datos</u> .....	34
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u> .....	35

4.1 EXPERIMENTO 1 y 2.....	35
4.2 EXPERIMENTO 3 .....	40
4.3 EXPERIMENTO 4 .....	43
5. <u>CONCLUSIONES</u> .....	45
6. <u>RESUMEN</u> .....	46
7. <u>SUMMARY</u> .....	47
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	48

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Características de los cultivares utilizado.....	24
2. Descripción de los tratamientos .....	25
3. Características de los cultivares utilizados.....	27
4. Descripción de los tratamientos .....	28
5. Descripción de los tratamientos .....	30
6. Descripción de los tratamientos .....	33
7. Medias del largo de raíz de raigrás según cultivar de cebada.....	36
8. Medias del largo de raíz de raigrás según cultivar y sustrato .....	38
9. Promedio de largo de raíz de raigrás medida en mm según relación cebada/raigrás y cultivar de cebada.....	40
Figura No.	
1. Actividad Alelopática Potencial (AAP) en los cultivares ensayados .....	35
2. Promedio de largo de raíz de raigrás medida en mm para los diferentes tratamientos correspondientes a tipo de sustrato.....	37
3. Actividad Alelopática Potencial (AAP) en los cultivares ensayados .....	39
4. Promedio de largo de raíz de raigrás medida en mm para los cultivares utilizados (Ambev 23 y CLE 202) en los tratamientos de relaciones de densidad cebada/raigrás ensayados.....	42
5. Largo de raíz de raigrás según día de emergencia post-cebada.....	43

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos tiempos se ha constatado un creciente interés en el estudio de los fenómenos alelopáticos. En particular, y en paralelo al incremento de los problemas ocasionados por la generación de resistencias a herbicidas, se registra un alto interés en la posibilidad de utilizar cultivos alelopáticos para suprimir el crecimiento de malezas en zonas agrícolas (Putnam y Duke, citados por Weston, 2005).

La existencia de dificultades de tipo metodológico ha limitado el desarrollo de las investigaciones en alelopatía. La falta de ajustes metodológicos no ha permitido que los bioensayos de laboratorio, que son los procedimientos integrales más utilizados en la materia, predigan adecuadamente las respuestas observadas a campo

Inderjit y Weston (2000) en su revisión al respecto, señalan una lista de factores de importancia a considerar en el diseño de bioensayos. Entre otros, citan la necesidad de estudiar y ajustar el tipo de sustrato con el que se realizan, así como la relación de densidades de especies dadoras y receptoras de aleloquímicos.

Con la finalidad de contribuir en el conocimiento de los ajustes que permitan mejorar los resultados de los estudios en alelopatía, se llevó a cabo el presente trabajo de tesis, que tuvo por objetivo determinar el efecto del sustrato, la relación entre las densidades de cebada y raigrás como especie dadora y receptora respectivamente, así como también el efecto del estado de desarrollo en la expresión de los efectos alelopáticos en variedades de cebada.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. DEFINICIÓN DE ALELOPATÍA

El término alelopatía (del griego allelon = uno al otro, del griego pathos = sufrir; efecto injurioso de uno sobre otro) fue utilizado por primera vez por Molisch (1937) para referirse a la influencia de un individuo sobre otro, sea perjudicando o favoreciéndolo. Se sugiere que dicho efecto es realizado por biomoléculas denominadas aleloquímicos, las cuales son producidas por una planta y liberadas al ambiente, ya sea de forma acuosa a la solución del suelo o como sustancias gaseosas volatilizadas en el aire que se encuentra cercano a las plantas (Rizvi et al., citados por Ferreira y Aquila, 2000).

La definición de la alelopatía más tradicionalmente usada es la postulada por Rice (1974), que la define como “cualquier efecto directo o indirecto causado por una planta (incluyendo microorganismos) sobre otras a través de la producción de compuestos químicos que escapan al medio ambiente”.

La Sociedad Internacional de Alelopatía, citado por Oliveros-Bastidas et al. (2008), en una definición más amplia con el objetivo de englobar muchas otras interacciones, la describe como “*cualquier proceso que involucre metabolitos secundarios producidos por plantas, algas, bacterias y hongos, que influyen en el crecimiento y desarrollo de sistemas biológicos y agrícolas*”.

Müller, citado por Sampietro (2003), utiliza el término alelopatía para referirse a los efectos nocivos de un compuesto químico producido por una planta superior sobre otra planta superior.

### 2.2. GENERALIDADES DEL FENÓMENO DE LA ALELOPATÍA

En todo fenómeno alelopático existe una planta (donante) que libera al medio ambiente por una determinada vía (lixiviación, descomposición de residuos, etc.) compuestos químicos, los cuales al ser incorporados por otra planta (receptora) provocan un efecto perjudicial o benéfico sobre la germinación, crecimiento o desarrollo de esta última. Los compuestos que desencadenan el proceso se denominan compuestos, agentes o sustancias alelopáticas.

Es necesario puntualizar que muchas sustancias con actividad alelopática tienen efectos benéficos a muy bajas concentraciones y, superado

un determinado umbral actúan negativamente sobre la planta receptora (Sampietro, 2003).

Al analizar las interacciones entre plantas superiores existe cierta confusión en el uso de los términos alelopatía y competencia. Algunos biólogos han considerado que la alelopatía es parte de la competencia. La competencia entre plantas involucra la reducción en la disponibilidad de algún factor del entorno, debido a su utilización por un individuo vegetal, que es requerido también por otra planta que comparte el mismo hábitat. Entre estos factores se encuentran el agua, los nutrientes minerales y la luz. En cambio, la alelopatía implica la liberación al entorno por parte de una planta de un compuesto químico que ocasiona un efecto sobre otra. Por tanto, el efecto perjudicial en crecimiento y desarrollo en la competencia es debido a la reducción en la disponibilidad de recursos comunes, mientras que en la alelopatía el efecto tiene su origen en compuestos químicos liberados por una planta que afectan a otra u otras. Estos conceptos son diferentes entre sí, pero desde un punto de vista ecofisiológico se pueden considerar estrechamente ligados y complementarios en su efecto. Se utiliza el término interferencia para designar el efecto total de una planta sobre otra, es decir, la suma de efectos debidos a los fenómenos de competencia y alelopatía (Sampietro, 2003).

Los mecanismos a partir de los cuales las plantas interactúan con su entorno pueden ser de tipo físico o químico. A diferencia de los mecanismos de tipo físicos, los químicos son susceptibles de ser modificados con cambios del entorno de la planta (Hartmann, citado por Oliveros-Bastidas et al., 2009) en períodos de tiempo dentro de su ciclo de vida, los cuales representan un sistema adaptativo muy eficaz, con una rápida respuesta a las fluctuaciones de su entorno. Sin embargo, para que los mecanismos mediados por agentes químicos sean efectivos, no sólo es necesaria su biosíntesis y acumulación por parte de la planta, sino que dicho mecanismo tiene que contener un operador que indique las rutas mediante las cuales este metabolito sintetizado pueda ser liberado al ambiente, donde la información que lleve consigo pueda ser insertada en las interrelaciones del nicho ecológico donde la planta se encuentra (Mc Lean et al., citados por Oliveros-Bastidas et al., 2009).

La acción conjunta de estas sustancias contribuye a definir los parámetros poblacionales que se observan, como por ejemplo el dominio de una especie en un espacio bajo determinadas condiciones. Cuando los fenómenos observados están relacionados sólo con la intermediación negativa de compuestos químicos liberados, el fenómeno se denomina alelopático, y los metabolitos secundarios responsables de dicho efecto se denominan aleloquímicos (Oliveros-Bastidas et al., 2009).

Todas las plantas producen metabolitos secundarios, que varían en calidad y cantidad de especie a especie, así como también puede variar la cantidad de metabolitos según el lugar o entre un ciclo de cultivo y otro, debido a que la síntesis de muchos de ellos está desencadenada por diversos factores a los cuales las plantas están eventualmente expuestas. La resistencia o tolerancia a los metabolitos secundarios que funcionan como aleloquímicos es más o menos específica, existiendo especies más sensibles que otras, como por ejemplo *Lactuca sativa* (lechuga) y *Lycopersicon esculentum* (tomate), razón por la cual son muy utilizadas en bioensayos de laboratorio (Ferreira y Aquila, 2000).

Los aleloquímicos son metabolitos secundarios no nutricionales producidos por las plantas (y otros organismos vivos) que tienen efecto sobre el crecimiento, salud, el comportamiento o la biología poblacional de organismos vecinos, plantas, insectos, microbios, etc. (Haig, 2008).

### 2.3. TIPOS DE ALELOQUÍMICOS Y MODOS DE ACCIÓN

Sampietro (2003) realiza una revisión sobre los grupos en que se clasifican los distintos aleloquímicos que se conocen:

Dentro de los compuestos alifáticos pocos son conocidos por su actividad inhibitoria de la germinación de semillas y el crecimiento de plantas. Comprende varios ácidos y alcoholes solubles en agua que son constituyentes comunes presentes en las plantas y el suelo. No son considerados como fuente importante de actividad alelopática debido a que son rápidamente metabolizados en el suelo bajo condiciones aeróbicas.

Las lactonas no saturadas son poderosos inhibidores del crecimiento, aunque su rol en la alelopatía aún no se conoce completamente.

También existen varios ácidos grasos tanto de plantas terrestres como acuáticas que son inhibitorios del crecimiento vegetal. El rol de estos lípidos y ácidos grasos en la alelopatía aún no está completamente investigado.

Las plantas superiores producen una gran variedad de terpenoides, pero sólo unos pocos parecen estar involucrados en alelopatía. Frecuentemente estas sustancias han sido aisladas de plantas que crecen en zonas áridas y semiáridas. Los monoterpenos son los principales componentes de los aceites esenciales de los vegetales y son los terpenoides inhibidores de crecimiento más abundantes que han sido identificados en plantas superiores.

Los glicósidos cianogénicos son otro grupo de compuestos responsables de la actividad alelopática de algunas plantas. Entre ellos se encuentran la durrina y amigdalina (o su forma reducida prunasina) de reconocida actividad alelopática. La hidrólisis de estos compuestos da lugar no sólo a cianhídrico sino también a hidroxibenzaldehído que al oxidarse origina el ácido p-hidroxibenzoico, el cual posee por sí mismo actividad alelopática. La durrina es frecuente entre especies tanto cultivadas como silvestres del género sorghum. Amigdalina y prunasina son frecuentes en semillas de prunaceae y pomaceae actuando como inhibidores de germinación. La mayoría de los miembros de la familia brassicaceae producen grandes cantidades de estos glicósidos, los que por hidrólisis producen isotiocianato con igual actividad biológica.

La más extensa cantidad de agentes alelopáticos pertenecen al grupo de los compuestos aromáticos. Este grupo incluye a los fenoles, los derivados del ácido benzoico, derivados del ácido cinámico, quinonas, cumarinas, flavonoides y taninos. Entre los derivados del ácido benzoico pueden destacarse los ácidos hidroxibenzoico y vanílicico (presentes en cultivos como sorgo y avena). Los derivados del ácido cinámico mayormente provienen de la ruta metabólica del ácido shikímico y están ampliamente distribuidos en las plantas. Algunos como los ácidos clorogénico, cafeico, p-cumárico y ferúlico están ampliamente distribuidos en las plantas y son inhibidores de una gran variedad de cultivos y malezas. Tienen larga persistencia en el suelo. Las quinonas también provienen de la ruta metabólica del ácido shikímico y los compuestos más conocidos son la Juglona y naftoquinonas, aisladas del nogal. Los taninos, tanto los hidrolizables como los condensados, tienen efectos inhibitorios debido a su gran capacidad para unirse a proteínas. Se pueden encontrar en los suelos de los bosques en concentraciones suficientes para inhibir la nitrificación

Por último, se encuentra el grupo de los alcaloides. Sin bien son pocos los que se conocen con actividad alelopática, algunos como la cocaína, cafeína, cinconina, fisostigmina, quinina, cinconidina, estricnina son reconocidos inhibidores de la germinación. La cebada exuda por sus raíces la gramina que inhibe el crecimiento de *Stellaria media*. La cafeína mata ciertas hierbas sin afectar algunas especies cultivadas como, por ejemplo, el poroto.

En la alelopatía de tipo planta-planta, los efectos inhibidores más comunes son visibles en las funciones de las plantas como la respiración, fotosíntesis, el balance hídrico y la función estomática, la conductividad del tallo, la permeabilidad de las membranas, la división y desarrollo celular, la síntesis de proteínas y la actividad enzimática (Haig, 2008).

Oliveros-Bastidas et al. (2009) en su revisión sobre las posibles formas de actuación de los aleloquímicos reconocen dos tipos:

Tipo I. Acción directa del aleloquímico entre plantas.

Massey (1925), Davis (1928) plantean que este tipo se da cuando la planta A produce un compuesto X, el cual interfiere negativamente con una planta B.

Tipo II. Interacción directa con la ecología del suelo.

Por otra parte, autores como Wardle et al. (1998) hacen referencia a un tipo de alelopatía indirecta y citan el caso de alelopatía de tipo planta-planta mediados por fenómenos de descomposición. Sería el caso de cuando una planta A produce el compuesto X, el cual es degradado y/o transformado por un microorganismo C a un compuesto Y, el cual interfiere con la planta B.

También Hartung et al. (1983) hacen mención a la alelopatía inducida. Sería el caso en que la planta A libera un compuesto X el cual es liberado e induce a un organismo D a producir un compuesto Z, el cual interfiere con la planta B.

Inoue et al. (1992) refiriéndose a los casos en que un compuesto X interacciona con el ecosistema del suelo y causa la generación de un compuesto Z (éste no es producto de la descomposición de X), el cual interfiere con la planta B, clasifican la acción como una toxicidad indirecta.

Perry y Choquette (1987), Allison y Killham (1988) reconocen otro tipo de acción, la que ocurre cuando un compuesto X provoca cambios en el ambiente del suelo, el cual afecta el estatus de nutrientes en el suelo, reduciendo de esta manera el crecimiento, supervivencia o reproducción de la planta B, sin efectos tóxicos.

## 2.4. USOS POTENCIALES DE LA ALELOPATÍA

La idea de que las plantas afectan a sus plantas vecinas a partir de la liberación de sustancias químicas al medio se ha conocido desde el 370 AC (Willis, citado por Mallik, 2008).

En el siglo I DC Plinio informaba que el garbanzo (*Cicer arietinum*), la cebada (*Hordeum vulgare*) y la vicia amarga (*Vicia ervilia*) destruían o quemaban las tierras agrícolas. También describió que la sombra del nogal negro (*Juglans spp.*) es muy pesada y que puede causar daños potenciales para el hombre y todo lo plantado alrededor (Rice, citado por Weston, 2005).

Griegos y romanos utilizaron este conocimiento en sus prácticas agrícolas tan temprano como el año 64 DC (Mallik, 2008).

El dramático incremento en rendimiento de los cultivos que se logró a partir de la segunda mitad del siglo XX después de la llamada revolución verde, se logró a partir del desarrollo y uso extensivo de variedades de alto rendimiento, riego y una amplia variedad de agroquímicos como fertilizantes y agentes de control de malezas en un sistema de agricultura altamente mecanizada, dieron nacimiento a una nueva forma de agricultura, la Agricultura Industrial. Sin embargo, los incrementos en rendimientos de este modelo de agricultura vinieron con terribles costos de degradación ambiental y esta agricultura de altos rendimientos e ingresos ha demostrado ser insostenible (Allison y Hobbs, citados por Mallik, 2008).

Las investigaciones en alelopatía en algunos casos permiten plantear estrategias orientadas a una mayor sustentabilidad de los sistemas de producción agrícola, con un menor consumo en insumos contaminantes. Para lograr un mejor aprovechamiento de los agentes alelopáticos es necesario ampliar el conocimiento de los mismos en relación a la rotación de cultivos, manejo de residuos, prácticas de labranza y la implementación de control biológico de malezas (Sampietro, 2003).

Durante los últimos 30 años los posibles impactos de la alelopatía en la agricultura han sido descriptos y discutidos en detalle. Se ha explorado la posibilidad de utilizar cultivos alelopáticos para suprimir el crecimiento de malezas en zonas agrícolas, incluido el desarrollo de cultivares para supresión de malezas, rotaciones de cultivos y cultivos de cobertura para la supresión eficaz de las malezas (Putnam y Duke, citados por Weston, 2005).

Desafortunadamente, los métodos tradicionales de selección no han sido empleados para producir cultivos altamente alelopáticos con buen potencial de rendimiento. Debates recientes sobre la posibilidad de uso de la ingeniería genética para mejorar las características alelopáticas de los cultivos indica que esto no sería una tarea sencilla debido a la naturaleza multigénica de la biosíntesis de aleloquímicos. Sin embargo, los beneficios en ahorro de dinero y tiempo por la reducción del uso de mano de obra o los herbicidas, podría ser importante si se incorporara mayor capacidad supresora de malezas o efecto alelopático con éxito en los principales cultivos de interés agronómico (Duke et al., 2002).

Según Fischer (1990), los aleloquímicos que son capaces de eliminar la competencia de otras especies, o incluso que estimulan la germinación o el crecimiento de otras especies, han despertado interés principalmente debido a

la posible aplicación de estos en la agricultura por sus propiedades, entre otras a su actividad herbicida de una manera selectiva.

Oliveros-Bastidas (2008) cita ejemplos de herbicidas comerciales como Herbace®, Callisto® y Mikado®; cuyos ingredientes activos son derivados químicos de aleloquímicos aislados en varias especies vegetales (entre ellas *Glycine max*). El segundo de ellos ha sido recomendado para control de malezas resistentes a atrazina, sobre todo en el cultivo de maíz.

Sin embargo, el desarrollo de herbicidas provenientes de fuentes naturales en la industria agroquímica ha sido muy limitado. Varias razones o variables han de ser consideradas para llegar a explotar un aleloquímico como agente de control de malezas, donde es posible citar: a) cantidad de sustancia activa aislada; b) necesidades de pruebas toxicológicas y ambientales (el hecho de que el producto sea de origen natural, no garantiza que sea seguro al ambiente); c) originar compuestos derivados a partir del natural, mediante manipulación de la estructura molecular o síntesis química; y d) una vez detectado el producto activo, o su análogo modificado, es necesario la extracción en masa del compuesto de su fuente natural, o en su defecto, una ruta sintética relativamente sencilla y rentable (Oliveros-Bastidas, 2008).

## 2.5. ALELOPATÍA EN CEBADA

Bertholdsson (2005), en un trabajo en el cuál evaluó la variación varietal en la actividad alelopática de cultivares de trigo y cebada encontró que la misma es alta tanto en cebada como en trigo. A partir de la evaluación de 127 variedades de cebada (nuevas y antiguas) de diferentes orígenes, encontró que el potencial alelopático es alto en los materiales más antiguos y que ha ido disminuyendo tras un siglo de selección. Aun así, encontró algunos nuevos cultivares que mantienen un alto potencial alelopático. Para el caso del trigo encontró que, a la inversa de lo que sucede con la cebada, el potencial alelopático ha ido aumentando, pero aún se mantiene en niveles mucho menores que en cebada.

Estudios genéticos muestran que el rasgo hereditario es cuantitativo, pero algunos genes mayores pueden participar (Wu et al., citados por Bertholdsson, 2005). Según Bertholdsson (2005), como la alelopatía en cebada ya es bastante elevada en algunos cultivares adaptados, sería difícil mejorar la característica sin antes encontrar nuevas fuentes de genes. Sin embargo, si los aleloquímicos difieren entre razas, debería ser posible combinarlas para mejorar aún más su potencial alelopático. Utilizando modelos de regresión simple para predecir la mejora sobre la habilidad competitiva frente a las malezas, si se

incrementara el vigor inicial y el potencial alelopático en un 20%, encontró que la biomasa de las malezas podría reducirse en un 31-54%.

#### 2.5.1. Aleloquímicos presentes en la cebada

Compuestos fenólicos fitotóxicos, incluidos ácidos ferúlico, vanílico y p-hidroxybenzoico, han sido identificados en extractos de agua fría de paja de cebada y en extracto de metanol de raíces vivas de cebada (Börner, citado por Kruse et al., 2000).

Lovett y Hoult (1995) reportan que los dos alcaloides, gramina (N,N-dimetil-3-amino-metilindol) y hordenina (N,N-dimetiltiramina), han sido confirmados por jugar un importante rol en la habilidad fitotóxica de la cebada.

Los ácidos hidroxámicos están ausentes en la cebada cultivada, pero el DIBOA ha sido encontrado en especies de cebada silvestre. Por lo tanto, la producción de DIBOA por la cebada cultivada posiblemente pueda ser agregada por transferencia de material genético desde especies de cebada silvestre (Gianoli y Niemeyer, citados por Kruse et al., 2000).

#### 2.5.2. Antecedentes en Uruguay

Como antecedente reciente puede mencionarse la tesis de Capurro y Sotelo (2010) que forma parte de un Proyecto de Investigación en marcha "Actividad alelopática de los cultivares de cebada (*Hordeum vulgare* L.) en uso en el país sobre *Lolium multiflorum*", que tuvo por objetivos estudiar el potencial alelopático de los cultivares de cebada más utilizados por los productores y los más promisorios en el programa de evaluación nacional (11 en total), sobre la maleza gramínea más importante en cultivos de invierno actualmente, el raigrás anual (*Lolium multiflorum*).

De este trabajo surgió que existe variabilidad en la expresión del potencial alelopático en los cultivares de cebada. Los resultados señalaron cultivares sin potencial alelopático y un grupo de cultivares que expresaron potencial. Entre estos últimos Guaviyú y Ambev 23 se mostraron como los más alelopáticos, llegando a determinar inhibiciones en el largo de la raíz de raigrás de hasta 30%.

En el trabajo de Bertholdsson (2005) los valores máximos de inhibición de largo de raíz de *Lolium perenne* fueron de 42 y 70% mientras que en los materiales evaluados en Uruguay, como se comentara, el máximo de inhibición fue de 36% en el cultivar Ambev 23. Dichas diferencias podrían deberse a las

diferencias genéticas, ya que se ha visto que el potencial alelopático varía según el origen de los cultivares.

## 2.6. EFECTO DEL SUELO Y DEL ESTADO FENOLÓGICO DE LA PLANTA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA ALELOPATÍA

### 2.6.1. Efecto de las propiedades físico-químicas del suelo

El tipo de aleloquímico, la microflora y el tipo de suelo juegan un importante rol en la determinación de la persistencia de los aleloquímicos en el suelo (Inderjit, 2005).

Khalid et al. (2002) citan el ejemplo de *Sorghum vulgare*. En dicha planta el crecimiento del segundo cultivo (uno después del otro) disminuye marcadamente en suelos arenosos, pero no en casos de suelos con alto contenido de montmorillonita. Las toxinas en el suelo serían eventualmente inactivadas. Si se produce un efecto inhibitorio depende, por lo tanto, de la velocidad relativa en la que las toxinas se liberan y se inactivan.

Es evidente que la alelopatía debe considerarse en relación con las precipitaciones y el balance hídrico del suelo (May y Ash, citados por Khalid et al., 2002). Las condiciones de saturación, sin embargo, no tienen que mantenerse durante todo el período de descomposición para dar lugar a productos fitotóxicos. Las inundaciones del suelo de tres a cinco días, especialmente después de que los residuos habían comenzado a descomponerse, son igualmente eficaces. Altos niveles de fitotoxicidad son obtenidos durante las primeras etapas del proceso de descomposición. Dicha fitotoxicidad podría verse potenciada por incrementos en los niveles de salinidad del suelo. Condiciones anaerobias en el suelo durante la descomposición de los residuos de un número importante de especies de plantas son esenciales para que exista fitotoxicidad (Khalid et al., 2002).

La textura del suelo es otro factor que puede afectar la expresión de la alelopatía. Del Moral y Muller, citados por Inderjit et al. (1995) sugieren que los suelos arenosos no absorben fenoles en el mismo grado con que lo hacen los suelos de textura más fina. Adicionalmente, ellos reportan que las toxinas son degradadas más rápidamente en los suelos bajo condiciones aerobias y que esos suelos de textura más gruesa tienen mayor aireación.

Oleszek y Jurzysta, citados por Inderjit et al. (1995) reportaron que la modificación de la actividad de la saponina en el suelo depende de la habilidad de los glucósidos del ácido medicagénico de ser absorbidos por los complejos

del suelo. La no-sorción ocurre en la arena suelta y la sorción se da en suelos pesados. Por lo tanto, el alto grado de inhibición fue observado cuando las raíces de la alfalfa fueron puestas en arena, en comparación con suelos pesados.

Los resultados ecológicamente relevantes en bioensayos de alelopatía, entonces, dependen también de la selección del tipo de suelo, debiendo tener textura similar al de la planta en su hábitat natural (Inderjit et al., 1995).

#### 2.6.2. Efecto de los microorganismos del suelo

Los microorganismos pueden ser responsables de la degradación de los aleloquímicos en el suelo. Ellos consumen moléculas orgánicas y entonces los químicos podrían no acumularse a niveles fitotóxicos y la planta donante no exhibiría actividad alelopática en situaciones naturales. Luego de ser liberados al medio, la persistencia, viabilidad y actividad biológica son influenciadas por los microorganismos del suelo (Inderjit, 2001).

La degradación/transformación microbiana de los aleloquímicos en el suelo determina la expresión de la alelopatía en muchas situaciones (Inderjit, 2005).

Nair et al., citados por Inderjit (2005), encontraron que la degradación microbiana de las benzoxazinonas es importante en la alelopatía del centeno (*Secale cereale*). También está el ejemplo de *Actinectobacter calcoaceticus*, una bacteria Gram negativa que fue aislada de suelos de Michigan, que convierte el 2(3H)-benzoxazolinona (BOA) en 2,2'-oxo-1,1'-azobenzeno (AZOB). Comparado con el BOA, el AZOB ha sido reportado por ser mayor inhibidor de *Lipidium sativum* y *Echinochloa crus-galli*.

Los suelos naturales tienen un importante componente de microorganismos que pueden limitar la expresión alelopática una vez que los aleloquímicos son liberados al suelo (Inderjit, 2001).

El nogal negro (*Juglans nigra*) libera una quinona, la juglona, la cual es un potente aleloquímico. Schmidt, citado por Inderjit (2005), reportó la rápida degradación de la juglona en presencia de la bacteria del suelo *Pseudomonas putida* J1 en suelos de Estados Unidos. *Pseudomonas* J1 pueden metabolizar la juglona usándola como fuente de carbono. Debido a la rápida degradación de la juglona por la bacteria, argumenta que las chances de que la juglona se acumule en el suelo en niveles fitotóxicos en condiciones de campo podrían ser bajas.

Pero, las *Pseudomonas* J1 no están presentes en todos los suelos. En plantíos mixtos de *Juglans nigra* y *Alnus glutinosa* fue encontrado que, después de 8 años, todas las plantas de la segunda especie morirían, comenzando por las ramas pequeñas y después por los gajos, determinándose que la causa de muerte son los aleloquímicos producidos por la primera especie y acumulados en el suelo (Rietveld et al., citados por Ferreira y Aquila, 2000).

En muchas situaciones, un compuesto liberado por la planta puede ser inocuo, mientras el producto de su degradación microbiana puede ser tóxico (Inderjit et al., 1995).

Los metabolitos secundarios de *Polygonella myriophylla* son dominados por glicósidos de hidroquinona y ácido gálico. Los microorganismos del suelo convierten el glicósido de hidroquinona arbutín a hidroquinona y luego a benzoquinona. Hipotéticamente este compuesto es el agente alelopático activo de dicha planta (Weidenhamer y Romeo, citados por Weidenhamer, 2008).

La variación estacional en la población microbiana puede influir en la viabilidad de los aleloquímicos (Inderjit, 2005). Recientemente, Schmidt y Lipson, citados por Inderjit (2005), reportan el incremento en la población microbiana en otoño e invierno, luego de la entrada de materia orgánica en la nieve de los suelos de la tundra. La población microbiana de invierno se incrementa hasta un máximo nivel hacia fines de esta estación, seguida por una disminución durante el deshielo. Estas secuencias resultan en un incremento en la disponibilidad de nitrógeno que puede ser utilizado por la comunidad microbiana en el verano. Los compuestos fenólicos que fueron liberados por las hojas caídas en el otoño actúan como fuente de carbono para los microorganismos que se desarrollan durante otoño e invierno. Dichos compuestos, al ser consumidos por los microorganismos no podrían desempeñar ningún papel en la inhibición del crecimiento de plantas durante la primavera.

Otra complejidad estaría dada por el hecho de que la alelopatía podría y estaría interactuando con la competencia por recursos y con factores abióticos en el crecimiento de las plantas. Por ejemplo, limitantes nutricionales incrementan la toxicidad de algunos aleloquímicos, y pueden incrementar su producción (Weidenhamer, 2008).

Usualmente no es claro si la reducción en el crecimiento de la planta es resultado directo de las toxinas liberadas o si las toxinas predisponen a las plantas a la acción de patógenos (Putnam, citado por Macías et al., 1999).

Los esfuerzos para eliminar los efectos de los patógenos pueden crear más problemas de los que se resuelven. La esterilización es usualmente el

medio de eliminar el efecto de los patógenos. Sin embargo, no hay garantías de que las condiciones de esterilidad prevalezcan y la rutina de investigación para monitorear el éxito del tratamiento son raramente realizadas (Mulder, citado por Macías et al., 1999). En el caso de que accidentalmente se inoculara con un patógeno podría resultar en la proliferación de dicho organismo debido a la ausencia de otros microorganismos.

### 2.6.3. Densidad dependencia

La biomasa de las plantas es función de la densidad. Cuando las plantas están creciendo juntas el rendimiento total (producción de fruta, semilla o biomasa total) se incrementa linealmente con la densidad hasta el punto en que las plantas vecinas empiezan a competir entre ellas por recursos. Por encima de esta densidad el rendimiento por unidad de área se mantiene constante a través de un amplio rango de densidades. En el rango de densidades donde el rendimiento es constante, la biomasa individual de las plantas disminuye a medida que la densidad aumenta (Kira et al., citados por Weidenhamer, 2008).

Los efectos fitotóxicos dependientes de la densidad pueden ser definidos como la diferencia en la magnitud de la inhibición observada cuando las plantas crecen a distintas densidades, en suelos que contienen una sustancia fitotóxica (Weidenhamer et al., citados por Weidenhamer, 2008). La fitotoxicidad dependiente de la densidad resulta del hecho de que las plantas “compiten” por las fitotoxinas de la misma forma en que lo hacen por recursos. Mientras las consecuencias de ganar la competencia por recursos son positivas, las consecuencias de ganar la competencia por fitotoxinas son negativas. La diferencia en esta respuesta provee un medio para distinguir los efectos de la competencia por recursos de los de la alelopatía (Weidenhamer, 2008).

Una vía alternativa para entender las bases de los efectos de la fitotoxicidad dependiente de la densidad, es la de realizar el razonamiento de que en un volumen dado de suelo conteniendo una cantidad finita de toxina disponible para las plantas, las plantas creciendo a una densidad baja tienen una gran cantidad de toxina disponible por planta y por lo tanto pueden sufrir grandes reducciones en el crecimiento; en comparación con que si estuvieran creciendo en alta densidad, donde la toxina sería repartida (“diluida”) entre muchas plantas y cada una recibiría una dosis proporcionalmente menor. Esto contrasta con la competencia por recursos donde las plantas que crecen a baja densidad tienen una mayor cantidad de recursos disponibles por planta, y como resultado tienen un mayor crecimiento (Weidenhamer, 2008).

Los resultados de agregar carbón activado al suelo y crecientes densidades de plantas son similares en reducir la cantidad de toxina disponible para cada planta.

Weidenhamer et al., citados por Weidenhamer (2008), hicieron crecer *Paspalum notatum* en un suelo tratado con hidroquinona y ácido gálico, posibles inhibidores de *Poligonella myrtophylla*. A las 8 semanas, la biomasa de *P. notatum* creciendo en suelo tratado con 400 µg/g de cada compuesto fue de 63% del tratamiento control correspondiente a la densidad de 2 semillas por pote; pero no hubo inhibición en las plantas creciendo a la densidad de 16 semillas por pote. Se observó estimulación del crecimiento de *P. notatum* con bajas cantidades de toxina, siendo la respuesta dependiente de la densidad. En otro experimento, se hizo crecer tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en bandejas con suelo colectado contra el nogal negro (*Juglans nigra* L.) y zonas adyacentes. Las reducciones en el crecimiento del tomate fueron mayores en los tratamientos con bajas densidades.

Li et al. (2011) encontraron importante dependencia de la densidad en los efectos alelopáticos de trigo sobre raigrás, estudiando un amplio rango de relaciones de densidad para las relaciones en el rango de 1-1; 1,5-1 y 2-1.

Semillas de *Lolium rigidum* afectaron el crecimiento y desarrollo de plántulas de 3 especies, siendo muy marcado su efecto sobre *Lolium multiflorum*. Extractos de tallos de *Lolium rigidum* estimularon parcialmente el crecimiento de tallos. Aunque algunos estudios han reportado efectos estimulatorios en los crecimientos de los tallos, muchos otros han demostrado efectos inhibitorios a altas concentraciones (Mandal, 2001).

Weidenhamer et al., citados por Sinkkonen (2001), especularon sobre las posibles implicancias ecológicas de la densidad dependencia de los efectos fitotóxicos sobre las especies receptoras. Pueden existir desde efectos estimulantes regularmente en el campo, y puesto que el equilibrio entre la estimulación y la inhibición depende de la densidad de plantas y la concentración de fitoquímicos en el suelo, las consecuencias de los efectos de los fitoquímicos tal vez sean más diversas de lo que se ha asumido previamente. Las especies receptoras podrían, por ejemplo, tender a evolucionar hacia la estimulación a concentraciones de fitoquímicos más altas. En ese caso, sin embargo, los efectos estimulantes serán probablemente más débiles en concentraciones bajas. Por otra parte, lo contrario de aumentar la tolerancia también es posible si las densidades de siembra fueran permanentemente altas o las concentraciones de fitoquímicos bajas. Pueden, por lo tanto, ser difíciles de identificar las adaptaciones evolutivas a la fitotoxicidad sin un conocimiento detallado de las características de cada población y de todos los productos químicos involucrados.

#### 2.6.4. Efecto del momento de liberación

En estudios realizados con *Camptotheca acuminata*, que produce el metabolito secundario camptotecina (CPT), se encontró que existe una relación inversa entre la edad de las hojas y la concentración de CPT en las mismas. Las altas concentraciones de CPT se asocian a hojas jóvenes. La concentración baja mucho desde la hoja 1 (la más joven) hasta la hoja 7. En la 9ª y 11ª los niveles de CPT ya se encuentran estabilizados. También se encontró una relación inversa entre la concentración de CPT y la de clorofila en hojas. La concentración de CPT también varía entre hojas de la misma edad entre árboles de distintas edades, encontrándose la máxima concentración de CPT en árboles de 2 años de edad. A partir de ahí la misma disminuye con la edad del árbol. La concentración de CPT también varía entre estaciones, detectándose disminuciones del orden del 11% mensual durante la estación de crecimiento. El mayor contenido de CPT en las primeras 5-6 hojas representaría un mecanismo de defensa química empleado por las hojas jóvenes para defenderse del ataque de herbívoros, patógenos, etc. (Liu et al., 1998).

En forma similar, Turner, citado por Liu et al. (1998), reporta que en 41 especies madereras las hojas inmaduras contenían niveles de compuestos fenólicos y taninos un 70% mayores que las hojas maduras.

Souza et al. (2002), utilizando extractos de parte aérea de *Brachiaria brizantha* cv. Marandú en estado vegetativo y en estado reproductivo, encontraron diferencias significativas sobre la germinación de las semillas de las especies receptoras utilizadas. La germinación de las semillas de malezas fue siempre inferior cuando se utilizó extracto de material (parte aérea) cosechado en la fase vegetativa, que en los tratamientos con material cosechado durante la fase reproductiva de la gramínea. Durante su fase vegetativa, la brachiaria, presenta mayor concentración de sustancias inhibitorias potencialmente alelopáticas solubles en agua que en la fase reproductiva.

Olofsdotter et al. (2002) trabajando con 4 cultivares de arroz encontraron que en todos había una creciente liberación de ácidos fenólicos hasta el 14º día después de transplantadas las semillas pregerminadas. Luego una leve disminución de la liberación se produjo hasta el día 28, a partir del cual siguió incrementándose hasta el día 56.

Copaja et al. (1999) en experimentos con 3 variedades de trigo (*Triticum aestivum*) encontraron que la concentración de ácidos hidroxámicos disminuye en toda la planta en los estados posteriores a la germinación, sin

embargo el contenido total de ácidos hidroxámicos se mantiene estable, lo que indica un efecto de dilución debido al crecimiento.

En trabajos sobre la acumulación de gramina en hojas de cebada, se reportó que la misma no fue detectable por cromatografía en semillas secas, pero fue sintetizada activamente por los brotes emergentes, la concentración de gramina alcanzó su punto máximo a los 7 días y, posteriormente, se redujo constantemente. Del día 4 al día 7, la tasa de síntesis neta de gramina fue de alrededor de 3,5 mg.g-1.d-1 de materia seca, pero se había reducido a cerca de 0.2 mg.g-1.d-1 entre los días 14 y 21. La disminución con el tiempo de la concentración de gramina en los brotes refleja una reducción progresiva de la misma en las hojas de la 2º a la 6º, no hubo pérdida neta de gramina de la primera hoja a la segunda con la edad de las plantas (Hanson et al., 1982).

El contenido de gramina en la cebada silvestre (*Hordeum spontaneum*) es considerablemente alto, tanto dentro de las hojas como en su superficie, en los 15 días posteriores a su germinación (Yoshida et al., 1993).

La hordenina no es hallada en las semillas de cebada, pero aparece en las raíces desde el primer día de la germinación y puede ser liberada por las raíces de la cebada por hasta 60 días en un sistema hidropónico. En una línea de cebada se observó que la máxima liberación de hordenina se dio hasta el día 36 y luego comenzó a disminuir (Liu y Lovett, citados por Kruse et al., 2000).

Además del genotipo, la producción/liberación de aleloquímicos por los cultivos (como centeno, trigo, cebada y arroz) depende del estado de desarrollo de las plantas y/o de factores externos como la temperatura, estatus nutricional y herbívoros (Kruse et al., 2000).

Resultados obtenidos a partir de la utilización de extractos de raíces y parte aérea de calopo (*Calopogonium mucunoides*) muestran que las inhibiciones medias promovidas por estos variaron en función de la especie receptora, la edad de crecimiento de las plantas y de la parte de la planta utilizada para preparar los extractos. Se encontró que las inhibiciones potencialmente alelopáticas promovidas por la parte aérea del calopo fueron siempre superiores a las promovidas por los extractos de raíz. La diferencia existente tendió a disminuir con el aumento de la edad de la planta de calopo, hasta que a la edad de 12 semanas de crecimiento la inhibición promovida por el extracto de raíz fue ligeramente superior a la promovida por el de parte aérea. Los extractos preparados con parte aérea evidenciaron inhibiciones potencialmente alelopáticas en todas las edades, destacándose a las 8 semanas de crecimiento. En los extractos de raíz la actividad inhibitoria potencialmente alelopática fue extremadamente baja entre las 2 y las 8 semanas de crecimiento, mostrando tendencia al aumento a partir de la edad

de 10-12 semanas. La actividad potencialmente alelopática de las dos fracciones de la planta presentó valores máximos en diferentes edades de crecimiento. La parte aérea alcanzó su valor máximo a la edad de cuatro semanas mientras que las raíces lo alcanzaron a la edad de 12 semanas (Souza et al., 2003).

Wardle et al. (1992) en ensayos realizados con *Carduus nutans* L. encontraron que las plantas más jóvenes (rosetas) eran potencialmente más efectivas que las plantas viejas en liberar sustancias inhibitoras luego de su descomposición. Estas fueron las más fitotóxicas cuando se realizaron ensayos utilizando extractos acuosos de plantas de *Carduus nutans* L. Cuando se agregaron tejidos al suelo el estudio reveló que las plantas más viejas fueron considerablemente más alelopáticas que las jóvenes. Los tejidos muertos del cardo aparecen como los más alelopáticos entre los varios estadios de desarrollo analizados. Las plantas muertas o senescentes probablemente contienen relativamente bajos niveles de componentes solubles en agua; y la fitotoxicidad es probablemente sostenida por el desglose de componentes más resistentes.

Gomez et al. (2003) realizaron ensayos utilizando como especie dadora a *Rumex crispus* y como receptora a *Raphanus sp.* (rábano). Utilizando extractos etanólicos de plantas chicas (10-15 cm de altura, medianas (20-25 cm de altura) y grandes (30-50 cm de altura, en floración) de *Rumex crispus*, no encontraron efecto sobre la germinación de las semillas de rábano. Sí se encontró inhibición en el crecimiento de raíz cuando se utilizaron extractos provenientes de tallos en el primer y tercer estado de desarrollo. El peso fresco de las plántulas de rábano se vio inhibido cuando se utilizaron extractos de hojas de plantas en el primer estado de desarrollo.

Nilsson et al., citados por Inderjit y Callaway (2003) reportan la variación temporal de compuestos fenólicos y de batatasina III, en las hojas de *Empetrum hermaphroditum*. Los autores reportan que los brotes de primer año producen mayores niveles de compuestos fenólicos que los tejidos viejos. La alta concentración es mantenida durante el segundo año, para disminuir después. Sin embargo, la fitotoxicidad de los extractos de *E. Hermaphroditum* está más relacionada con la batatasina III que con los compuestos fenólicos. La concentración de batatasina III alcanza su máximo nivel a partir de setiembre del primer año de las nuevas hojas.

## 2.7. BIOENSAYOS Y DIFICULTADES EN LA INVESTIGACIÓN

Los bioensayos son procedimientos integrales en todos los estudios en alelopatía. Son necesarios para la evaluación del potencial alelopático de las

especies y su actividad durante la extracción, purificación e identificación de compuestos bioactivos (Leather y Einhellig, 1986).

Muchos experimentos de laboratorio sobre alelopatía son diseñados utilizando métodos simplificados para obtener resultados rápidamente, con pocas consideraciones sobre los factores ecológicos. Dichos experimentos son diseñados para maximizar la liberación de aleloquímicos, que de otro modo no podría ocurrir en la naturaleza, o para obtener pequeñas cantidades de productos naturales necesarios para otros experimentos. Son pocos los experimentos de laboratorio sobre alelopatía que prestan estricta atención a las especies seleccionadas para el ensayo, los factores climáticos y edáficos, la ecología microbiana, la dinámica de los nutrientes, los ciclos biológicos, la densidad y otras características bióticas de la planta (Inderjit y Dakshini, 1995).

#### 2.7.1. Bioensayos de germinación de semillas

El bioensayo más extensamente utilizado para evaluar la actividad alelopática es la inhibición de la germinación de semillas. Una de las dificultades de esta técnica es la poca estandarización existente en este tipo de ensayos. Incluso los reportes originados por un mismo laboratorio difieren en la respuesta de los ensayos. Una dificultad surge cuando se hacen comparaciones con extractos de plantas con diferentes solventes y a diferentes concentraciones. Otra dificultad surge cuando las evaluaciones son hechas con diferentes especies de semillas. Muchas semillas de cultivos han sido criadas para tener una germinación coordinada, y usualmente germina el 100% durante el período de incubación. En esta situación solamente puede ser determinada la inhibición, mientras que la estimulación que pueden provocar algunos aleloquímicos es indetectable (Leather, citado por Leather y Einhellig, 1986).

Otros factores que pueden alterar la germinación cuando se testean aleloquímicos, son la temperatura, fotoperiodo, disponibilidad de oxígeno, potencial osmótico, entre otros (Leather y Einhellig, 1986).

#### 2.7.2. Bioensayos con extractos/lixiviados o material vegetal

Uno de los métodos comúnmente utilizados en los estudios en alelopatía es el de examinar los efectos de extractos de plantas sobre otras plantas o el estudiar el efecto de residuos vegetales y su descomposición sobre el suelo. Sin embargo, el método de extracción descuida el hecho de que algunos solventes pueden aumentar la difusión de algunos químicos solubles (Putnam, citado por Qasem y Hill, 1989), mientras que los tratamientos con

materiales extraídos de toda la planta incluyen sustancias tóxicas y no tóxicas, y químicos difusibles y no difusibles; descuidando los posibles efectos que el método de extracción puede tener sobre la naturaleza de los productos (Qasem y Hill, 1989).

La adición o incorporación de residuos de plantas en el suelo genera otros problemas. La incorporación de residuos, especialmente secos y en grandes cantidades, puede resultar en cambios en la textura de los medios de crecimiento y/o en su habilidad de mantener agua. El agregar material vegetal en el medio de crecimiento reduce el porcentaje de suelo, por lo que si se agregaron nutrientes anteriormente, va a disminuir la concentración de nutrientes disponibles para las plantas, que no va a ser compensado por la cantidad liberada por la descomposición de los tejidos vegetales. Estos efectos pueden ser considerables, especialmente cuando se agregan grandes proporciones de residuos. Este problema puede ser superado agregando nutrientes a la solución luego de incorporar el material vegetal, logrando de esta manera compensar la cantidad de nutrientes removidos, pero, puede enmascarar completamente algunos efectos alelopáticos, sobre todo porque es evidente que los efectos alelopáticos en muchos casos son más pronunciados o sólo ocurren en condiciones de baja fertilidad (Rice, citado por Qasem y Hill, 1989).

Además de estas dificultades para la interpretación, el rol de los microorganismos causa muchas complicaciones debido a la necesidad de simular ecosistemas muy complejos. Los microorganismos crecen rápidamente en los residuos vegetales y su acción puede producir sustancias fitotóxicas, o pueden romper o transformar las sustancias fitotóxicas liberadas por el material vegetal. Por otra parte, la adición de material vegetal al medio de crecimiento puede modificar el pH, especialmente en espacios limitados como las macetas. Dichos residuos suelen proveer sustratos favorables para la proliferación de patógenos de suelo o hacer al sistema radicular más susceptible a enfermedades. Otra complicación adicional, es el hecho de que la rápida multiplicación de los microorganismos puede por sí misma disminuir los nutrientes disponibles en el suelo por un tiempo, y de esa manera se podrían generar condiciones de deficiencia (Qasem y Hill, 1989).

El estudio de los efectos de lixiviados obtenidos de recipientes con plantas en crecimiento, o de exudados radiculares, son dos métodos comunes en el estudio de los efectos alelopáticos entre plantas, y ambos presentan inconvenientes. Es importante considerar que los lixiviados pueden contener diferentes cantidades de nutrientes y ello podría ser directamente responsable de las diferencias en los efectos sobre las plantas indicadoras (Qasem y Hill, 1989).

Los químicos liberados/exudados por una planta, deben ser alelopáticamente activos en el sustrato real en que dicha planta está presente. Cualquier ensayo con supuestos aleloquímicos en un medio artificial, que no tenga en cuenta las propiedades físicas, químicas y factores bióticos del suelo en que crece la planta dadora, no ayuda a predecir su potencial alelopático en la naturaleza (Inderjit y Weston, 2000).

La liberación de productos químicos por una planta alelopática es una subunidad de la unidad compleja alelopatía. Otra subunidad, por ejemplo, puede ser tiempo de residencia, disponibilidad biótica y estática o el destino de los aleloquímicos en el suelo, y una tercera subunidad (la posterior) la captación de los aleloquímicos y la respuesta de las especies utilizadas en el ensayo. Que al analizar cada subunidad el resultado sea positivo no garantiza que la unidad (es decir, la alelopatía) opere en la naturaleza. Los experimentos de laboratorio son importantes en términos de comprender mecanismos y testear la validez de una hipótesis individual o unidad. A través de los bioensayos de laboratorio se puede comprobar si individualmente las subunidades presentan actividad o interferencia, pero no predecir nada sobre la forma en que opera cada subunidad en la naturaleza. Es por ello que son necesarios los estudios de campo (Inderjit y Weston, 2000).

### 2.7.3. Experimentos con carbón activado

Un medio efectivo para demostrar la actividad de los agentes alelopáticos puede ser el de reducir o mejorar los efectos de dichos agentes usando sustancias neutralizantes. El carbón activado se une a las moléculas orgánicas y tiene escasa afiliación por los nutrientes (Cheremisinoff y Ellerbusch, citados por Inderjit y Callaway, 2003). Schreiner y Reed, citados por Inderjit y Callaway (2003) observaron que las raíces de *Lolium perenne* suelen crecer lejos del espacio ocupado por las raíces de otras especies. Sin embargo, cuando agregaron “carbón negro” esta respuesta trópica desapareció. El carbón negro que utilizaron probablemente fue carbón activado.

Mahall y Callaway (1992), en experimentos utilizando cámaras de raíz con un fondo transparente, encontraron que pequeñas cantidades de carbón activado (2% del volumen) redujeron drásticamente las tasas de crecimiento de las raíces de *L. tridentete* y las de *Ambrosia dumosa*, una especie comúnmente asociada.

Ridenour y Callaway, citados por Inderjit y Callaway (2003) realizaron experimentos en macetas utilizando como sustrato arena y arena con carbón activado. Las macetas contenían plantas individuales de *Festuca idahoensis* creciendo con plantas de *Centaurea maculosa* como vecinas. Encontraron que

las plantas de *F. idahoensis* de los tratamientos con arena pura fueron significativamente más pequeñas que las cultivadas teniendo como vecinas plantas de *C. maculosa* pero usando como sustrato arena mezclada con carbón activado, lo que indica que el carbón activado disminuyó el efecto alelopático de *C. maculosa* sobre *F. idahoensis*. Ello aumentó la competencia entre plantas a favor de festuca, determinando que las plantas de *C. maculosa* fueran 30% más pequeñas que las que crecieron con arena pura como sustrato.

El uso de carbón activado presenta sus desventajas. Primero, que no es completamente cierto que no afecte a los nutrientes inorgánicos. Es por ello que se recomienda que en los experimentos en que se utilice carbón activado se agreguen pequeñas cantidades de algún fertilizante completo (Mahall y Callaway, 1992).

Algunos tipos de carbón activado presentan relativamente altas concentraciones de fósforo y ello debería evitarse. El carbón activado es un adsorbente de amplio espectro, pero no hay garantías de que todos los químicos con efecto alelopático sean efectivamente adsorbidos, dando a lugar a dudas sobre aquellos experimentos en que no se detecta ningún efecto. Por otra parte, el carbón activado puede cambiar características del sustrato, tales como la retención de agua o el pH (debido a su tamaño de partícula muy fino). Aunque ha demostrado ser eficaz en el laboratorio los experimentos deben ser interpretados teniendo en cuenta las consideraciones anteriormente nombradas (Inderjit y Callaway, 2003).

#### 2.7.4. Diseño de los bioensayos

Inderjit y Weston (2000) en su revisión sobre los factores importantes que se deben considerar en el estudio de las interacciones alelopáticas al momento de diseñar los bioensayos de laboratorio encontraron:

Para Schmidt (1990), Inderjit y Dakshini (1995), los compuestos orgánicos no deben ser utilizados para obtener extractos para los bioensayos. Para la preparación de lixiviados y/o extractos de partes de plantas son preferibles los medios acuosos.

Inderjit (2000) señala que ante la falta de suelo cualquier bioensayo de crecimiento puede ser de poca o nula importancia. Cheng (1995), Blum (1995), Schmidt y Ley (1999) afirman que, aunque se puedan evaluar las respuestas de las dosis de semilla, la germinación y otros parámetros en ausencia de suelo, es importante que se diseñen los bioensayos con el suelo de la zona geográfica donde crece la planta para mantener los factores biológicos, físicos y químicos del suelo del entorno natural de la especie en estudio.

Blum (1995), Inderjit y Dakshini (1995) indican que el uso de especies indicadoras artificiales o muy sensibles en el crecimiento debe ser evitado para los bioensayos. Se deben elegir especies representativas de las condiciones naturales encontradas. También se debe considerar el número de semillas y el volumen de la solución (lixiviados) a utilizar al momento de diseñar los ensayos, debido a que existe una respuesta densidad-dependiente en el crecimiento que influye sobre los resultados (Weidenhamer et al. 1989, Thijs et al. 1994).

Blum (1995) destaca que una concentración de residuos/lixiviados no es suficiente para establecer la actividad de un fitotóxico. Un investigador debe establecer una relación dosis-respuesta de al menos tres o más niveles de material de fitotóxicos o lixiviados para obtener una respuesta fiable sobre actividad alelopática.

Siempre que sea posible, las actividades de los aleloquímicos identificados deben ser comparadas con las del extracto de todo, la mezcla de productos químicos o el material vegetal en estudio, para evaluar el papel que una sustancia química o mezcla puede jugar en el mecanismo de interferencia.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los experimentos fueron realizados en la Estación Experimental Mario A. Cassinoni (Ruta 3 km 363, Paysandú), en el Laboratorio de Malherbología en los meses de junio a agosto de 2014.

Se realizaron 4 experimentos, de los cuales el primero fue de carácter meramente exploratorio.

La semilla de raigrás utilizada provino de la infestación natural de una chacra de la zona de "Colonia 19 de abril" y estaban presentes como malezas de un lote de semilla de avena de la cosecha 2013.

#### 3.1. EXPERIMENTO 1

El objetivo fue estudiar el efecto de distintos sustratos en la expresión del potencial alelopático de cultivares de cebada (especie dadora) sobre raigrás (especie receptora).

Los tratamientos consistieron en la evaluación de 3 sustratos: tierra (T), tierra esterilizada (TE) y tierra con carbón activado (TCA); en 5 cultivares de cebada (Guaviyú, Ambev 23, CLE 202, Arrayán y Carumbé).

##### 3.1.1. Metodología de instalación

Para el experimento se utilizaron recipientes plásticos, en los que se colocó medio kilo de sustrato por recipiente.

La TE se obtuvo utilizando tierra de la misma fuente que la empleada para los tratamientos con tierra, pero esterilizándola en autoclave. Para ello se utilizaron bolsas plásticas autoclavables y permeables, en las cuales se colocaron 3 kilos de tierra previamente tamizada y humedecida a capacidad de campo. Las mismas fueron autoclavadas durante 60 minutos a 121° C.

Para los tratamientos con carbón activado se utilizó tierra previamente tamizada, la cual se mezcló con carbón activado molido, al 2%.

El experimento se instaló en la cámara de crecimiento ubicada en el Laboratorio de Malherbología, la cual fue programada para brindar un fotoperíodo de 12 horas de luz y temperatura de 25° C. Para regar se utilizó agua desionizada, regándose solamente cuando era necesario para evitar

deficiencias hídricas. No se hizo riego directo, sino que cada recipiente estaba sobre un plato, y en él se agregaba el agua.

Las densidades de siembra utilizadas fueron de 8 semillas de cebada y 6 de raigrás. Luego de emerger las plántulas se hizo un raleo, dejando 4 plántulas de cebada y 2 de raigrás.

Los cultivares utilizados fueron seleccionados en función de los resultados del trabajo de Capurro y Sotelo (2009) en el que se destacaron Guaviyú, Arrayán, Carumbé y Ambev 23 como los cultivares con mayor potencial alelopático y CLE 202 por ser del grupo de los cultivares que presentaron un potencial alelopático significativamente menor al resto de los cultivares evaluados.

Sus características se presentan en el siguiente cuadro:

Cuadro No. 1. Características de los cultivares utilizado

Cultivar	Crecimiento inicial	Potencial de macollaje	Sincronización	Largo de ciclo	Potencial alelopático
CLE 202	Lento	Alto	Alta	Largo	Bajo
Arrayán	Lento	Alto	Alta	Largo	Alto
Carumbé	Alto	Int.-Bajo	Baja	Int-Corto	Alto
Guaviyú	Alto	Int.-Bajo	Baja	Int-Corto	Alto
Ambev 23	Alto	Alto	---	Largo	Alto

### 3.1.2. Tratamientos y diseño experimental

El diseño experimental fue de bloques completamente aleatorizados, con 4 repeticiones, y se utilizaron 5 cultivares de cebada y 3 sustratos diferentes, totalizando 15 tratamientos

Cuadro No. 2. Descripción de los tratamientos

Tratamiento	Sustrato	Dadora	Receptora
T1	T	Arrayán	Raigrás
T2	TE	Arrayán	Raigrás
T3	TCA	Arrayán	Raigrás
T4	T	Carumbé	Raigrás
T5	TE	Carumbé	Raigrás
T6	TCA	Carumbé	Raigrás
T7	T	Ambev 23	Raigrás
T8	TE	Ambev 23	Raigrás
T9	TCA	Ambev 23	Raigrás
T10	T	Guaviyú	Raigrás
T11	TE	Guaviyú	Raigrás
T12	TCA	Guaviyú	Raigrás
T13	T	CLE 202	Raigrás
T14	TE	CLE 202	Raigrás
T15	TCA	CLE 202	Raigrás

Modelo experimental (DBCA):

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  es la variable de respuesta

$\mu$  es la media general

$T_i$  es el efecto del i-ésimo tratamiento (cultivar)

$\beta_j$  es el efecto del j-ésimo bloque

$\epsilon_{ij}$  es el error experimental

### 3.1.3. Determinaciones

A los 12 días post-instalación se midió la variable de interés, que fue largo de raíz de raigrás (mm). Para ello se estiraron las raíces sobre una cuadrícula milimetrada y se registró su largo máximo.

### 3.1.4. Procesamiento de los datos

Como fuera mencionado anteriormente, la variable de interés fue la variable continua largo de raíz de raigrás y se procedió a realizar ANAVA y diferencias de medias por Tukey. El análisis estadístico se hizo utilizando el programa INFOSTAT versión 2010

A partir de las determinaciones tomadas se construyó el Índice de Actividad Alelopática Potencial (AAP). Dicho índice compara el efecto sobre el largo de raíz de raigrás creciendo con los cultivares, en relación al largo de raíz de raigrás creciendo con el cultivar que se considera testigo por ser el que ha probado tener bajo potencial alelopático (CLE 202).

$$AAP1 = 1 - (\text{largo raíz raigrás cultivar} / \text{largo raíz raigrás cultivar testigo})$$

## 3.2. EXPERIMENTO 2

En función de las interrogantes surgidas en el análisis de los resultados del experimento 1 se consideró de interés repetir el experimento realizando algunos ajustes y con similares objetivos, cuantificar el efecto de distintos sustratos en la expresión del potencial alelopático en cultivares de cebada (especie dadora) sobre raigrás (especie receptora).

### 3.2.1. Metodología de instalación

Los tratamientos consistieron en la evaluación de 2 sustratos: tierra (T), y tierra con carbón activado (TCA); en 4 cultivares de cebada (Guaviyú, Ambev 23, CLE 202 y Carumbé).

Para el experimento se utilizaron recipientes plásticos, en los que se colocó medio kilo de sustrato por recipiente.

Para los tratamientos con carbón activado se utilizó tierra previamente tamizada, la cual se mezcló con carbón activado molido, al 2%.

El experimento se instaló en la cámara de crecimiento, la cual fue programada para brindar un fotoperíodo de 12 horas de luz y temperatura de 25° C. Para regar se utilizó agua desmineralizada, regándose solamente cuando era necesario para evitar deficiencias hídricas.

Se utilizó semilla pregerminada. Para ello se colocó y humedeció algodón en una caja de Petri y sobre él se puso papel de filtro. Las semillas fueron distribuidas sobre el papel de filtro y se colocaron en la cámara de crecimiento a 25 °C y sin luz, por 48 horas para la cebada y 72 horas para el raigrás. Luego se seleccionaron y se sembraron. La densidad de siembra utilizada fue de 10 semillas de cebada y 6 de raigrás

En el siguiente cuadro se presenta un resumen de las características de dichos cultivares:

Cuadro No. 3. Características de los cultivares utilizados

Cultivar	Crecimiento inicial	Potencial de macollaje	Sincronización	Largo de ciclo	Potencial alelopático
CLE 202	Lento	Alto	Alta	Largo	Bajo
Carumbé	Alto	Int.-Bajo	Baja	Int.-Corto	Alto
Guaviyú	Alto	Int.-Bajo	Baja	Int.-Corto	Alto
Ambev 23	Alto	Alto	---	Largo	Alto

### 3.2.2. Tratamientos y diseño experimental

El diseño experimental fue de bloques completamente aleatorizados, con 10 repeticiones, y se utilizaron 4 cultivares de cebada y 2 sustratos diferentes, totalizando 8 tratamientos.

Cuadro No. 4. Descripción de los tratamientos

Tratamiento	Sustrato	Dadora	Receptora
T1	T	Carumbé	Raigrás
T2	TCA	Carumbé	Raigrás
T3	T	Ambev 23	Raigrás
T4	TCA	Ambev 23	Raigrás
T5	T	Guaviyú	Raigrás
T6	TCA	Guaviyú	Raigrás
T7	T	CLE 202	Raigrás
T8	TCA	CLE 202	Raigrás

Modelo experimental (DBCA):

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  es la variable de respuesta

$\mu$  es la media general

$T_i$  es el efecto del i-ésimo tratamiento (cultivar)

$\beta_j$  es el efecto del j-ésimo bloque

$\epsilon_{ij}$  es el error experimental

### 3.2.3. Determinaciones

A los 15 días post-instalación) se midió la variable de interés, que fue “largo de raíz de raigrás (mm)”. Para ello se estiraron las raíces sobre una cuadrícula milimetrada y se registró su largo.

#### 3.2.4. Procesamiento de los datos

A partir de las determinaciones tomadas se construyó el Índice de Actividad Alelopática Potencial (AAP). Dicho índice compara el efecto sobre el largo de raíz de raigrás creciendo con los cultivares, en relación al largo de raíz de raigrás creciendo con el cultivar que se considera testigo por ser el que ha probado tener bajo potencial alelopático (CLE 202), usando como sustrato TCA.

$$AAP2 = 1 - (\text{largo raíz raigrás cultivar} / \text{largo raíz raigrás creciendo con CLE 202 en sustrato TCA})$$

El análisis estadístico se hizo utilizando el programa INFOSTAT versión 2010. Cuando existieron diferencias significativas entre los tratamientos la separación de medias se realizó utilizando el test de Tukey.

### 3.3. EXPERIMENTO 3

El tercer experimento se instaló con el objetivo de determinar el efecto de la densidad de cebada en la expresión de su potencial alelopático sobre raigrás.

#### 3.3.1. Metodología de instalación

Las variedades de cebada utilizadas fueron Ambev 23 y CLE 202, seleccionadas en función de los resultados obtenidos en el experimento 1.

El sustrato utilizado fue tierra (T). Al igual que para el caso de los cultivares, en el experimento 1, este sustrato mostró ser el mejor medio para la expresión del potencial alelopático de los cultivares evaluados.

Para el experimento se utilizaron 100 recipientes plásticos en los cuales se colocó medio kilo de tierra previamente tamizada.

La densidad buscada fue de 10 plántulas de cebada (para ambas variedades) y 10, 8, 6, 4 y 2 plántulas de raigrás por recipiente. Para lograrlo se sembró el doble de semillas que la densidad de plántulas buscada, para el caso de cebada; y el triple de semillas para el caso de raigrás. Una vez que emergieron las plántulas se hizo un raleo para llegar al stand de plantas deseado.

Las semillas de cebada se sembraron formando un círculo, sobre el borde interno del recipiente, y las semillas de raigrás fueron esparcidas dentro de él.

La temperatura fue de 25°C y el fotoperíodo de 12 horas de luz. Se regó con agua destilada, solamente cuando fue necesario para evitar deficiencias hídricas.

### 3.3.2. Tratamientos y diseño experimental

El diseño experimental fue de bloques completamente aleatorizados. Se utilizaron 2 variedades y 5 relaciones dadora/receptora, totalizando 10 tratamientos. Cada tratamiento tuvo 10 repeticiones.

Cuadro No. 5. Descripción de los tratamientos

Tratamiento	Dadora	Receptora	Rel D/R
T1	Ambev 23	Raigrás	10-10
T2	Ambev 23	Raigrás	10-8
T3	Ambev 23	Raigrás	10-6
T4	Ambev 23	Raigrás	10-4
T5	Ambev 23	Raigrás	10-2
T6	CLE 202	Raigrás	10-10
T7	CLE 202	Raigrás	10-8
T8	CLE 202	Raigrás	10-6
T9	CLE 202	Raigrás	10-4
T10	CLE 202	Raigrás	10-2

Modelo experimental (DBCA):

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  es la variable de respuesta

$\mu$  es la media general

$T_i$  es el efecto del  $i$ -ésimo tratamiento (cultivar)

$\beta_j$  es el efecto del  $j$ -ésimo bloque

$\varepsilon_{ij}$  es el error experimental

### 3.3.3. Determinaciones

A los 7 días de la instalación se procedió a la determinación del largo de la raíz de raigrás en mm. Para ello se estiraron las raíces sobre una cuadrícula milimetrada y se registró su largo máximo.

### 3.3.4. Procesamiento de los datos

La variable medida es continua (largo de raíz de raigrás) y se realizó ANAVA y diferencias de medias por Tukey.

Con las medias de los tratamientos, obtenidas a partir del procesamiento de los datos con el programa estadístico INFOSTAT versión 2010, se construyó el Índice de Actividad Alelopática Potencial (AAP). Con ello se buscó comparar el efecto promedio sobre el largo de raíz de raigrás creciendo junto a cada uno de los 2 cultivares de cebada a las distintas densidades evaluadas, en relación al efecto sobre dicha variable de raigrás creciendo junto a CLE 202, en una relación de 10 a 10.

$AAP_3 = 1 - (\text{largo raíz raigrás creciendo junto al cultivar X a la densidad Y} / \text{largo raíz raigrás creciendo junto a CLE 202 a la densidad 10-10 (Testigo)})$ .

Cuando existieron diferencias significativas entre los tratamientos, las medias se separaron utilizando el Test de Tukey.

### 3.4. EXPERIMENTO 4

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto del desarrollo de cebada en la expresión de su potencial alelopático sobre raigrás.

#### 3.4.1. Metodología de instalación

Se utilizó el cultivar Ambev 23 como especie dadora y raigrás (*Lolium multiflorum*) como especie receptora. El cultivar se seleccionó por ser el material de mayor potencial alelopático en el experimento 1.

La evaluación se realizó utilizando 2 sustratos: tierra (T), previéndose la expresión completa de los efectos, y tierra con carbón activado (TCA) como testigo de sustrato impidiendo la acción alelopática. La TCA se preparó mezclando homogéneamente tierra con carbón activado molido, al 2 % (20 gramos de carbón activado por cada kilogramo de tierra).

La semilla de raigrás se sembró en recipientes plásticos con cebada que había sido sembrada en 4 momentos diferentes: 0, 5, 10 y 15 días antes. Los sustratos utilizados fueron tierra (T) y tierra con carbón activado (TCA), a razón de 1,5 kilos por recipiente.

La densidad de siembra utilizada fue de 10 semillas de cebada y 6 de raigrás por recipiente. Se utilizó semilla pregerminada, para lo cual se pusieron a germinar semillas de cebada 48 horas antes de la siembra; para el caso de raigrás se hizo 72 horas presiembra. Para ello se utilizaron placas de petri con algodón humedecido y sobre él se puso papel de filtro. Se dispusieron las semillas sobre el papel de filtro y se dejaron en la cámara de crecimiento a 25°C y sin luz.

Al sembrarse, las semillas de cebada se dispusieron en círculo (cerca del borde interno del recipiente) y el raigrás se sembró distribuido en el interior de dicho círculo.

#### 3.4.2. Tratamientos y diseño experimental

El diseño experimental fue de Bloques Completamente Aleatorizados, con 10 repeticiones. Se utilizaron dos sustratos, una variedad de cebada y 4 momentos de siembra del raigrás, totalizando 8 tratamientos.

Cuadro No. 6. Descripción de los tratamientos

Tratamiento	Sustrato	Dadora	Receptora	Días siembra raigrás post cebada
T1	T	Ambev 23	Raigrás	0
T2	T	Ambev 23	Raigrás	5
T3	T	Ambev 23	Raigrás	10
T4	T	Ambev 23	Raigrás	15
T5	TCA	Ambev 23	Raigrás	0
T6	TCA	Ambev 23	Raigrás	5
T7	TCA	Ambev 23	Raigrás	10
T8	TCA	Ambev 23	Raigrás	15

Modelo experimental (DBCA):

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  es la variable de respuesta

$\mu$  es la media general

$T_i$  es el efecto del i-ésimo tratamiento (cultivar)

$\beta_j$  es el efecto del j-ésimo bloque

$\epsilon_{ij}$  es el error experimental

### 3.4.3. Determinaciones

Los diferentes tratamientos se fueron desmontando a los 15 días de sembrado el raigrás. En total duró 30 días. La variable de interés fue “largo de

raíz de raigrás (mm)”; y se midió estirando las raíces del raigrás sobre una cuadrícula milimetrado y registrando su largo.

#### 3.4.4. Procesamiento de los datos

El análisis estadístico se hizo utilizando el programa INFOSTAT versión 2010. Cuando existieron diferencias significativas entre los tratamientos la separación de medias se realizó utilizando el test de Tukey.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan y discuten los resultados por separado de los Experimentos 1 y 2 relativos a estudios de sustratos para la evaluación de efectos alelopáticos, el Experimento 3 en el que se estudiarán los efectos de las relaciones de densidad entre especie dadora y receptora, y el Experimento 4 relativo a los efectos del desarrollo de la especie receptora.

##### 4.1 EXPERIMENTO 1 y 2

El ANAVA de los resultados del Experimento 1 señaló efecto significativo para cultivar ( $P \geq 0.01$ ) y para sustrato ( $P \geq 0.05$ ) en la longitud de la raíz y ningún efecto de la interacción.

En relación a los cultivares, los resultados corroboran los obtenidos por Capurro y Sotelo (2010), mostrando un comportamiento coincidente con el hallado por estas autoras. Ambev 23 y Carumbé resultaron los cultivares con mayor potencial alelopático diferenciándose significativamente del cultivar CLE 202 que fuera seleccionado como testigo (Figura No. 1).

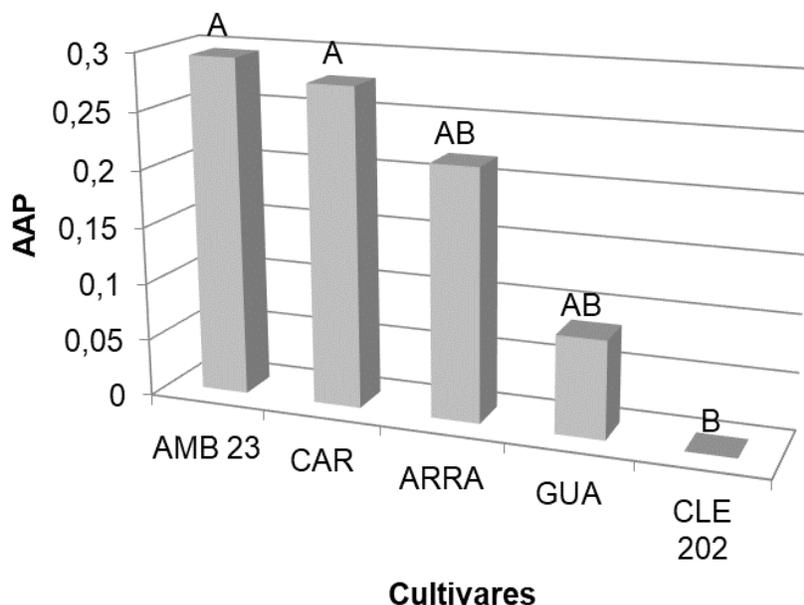


Figura No. 1. Actividad Alelopática Potencial (AAP) en los cultivares ensayados

Cuadro No. 7. Medias del largo de raíz de raigrás según cultivar de cebada

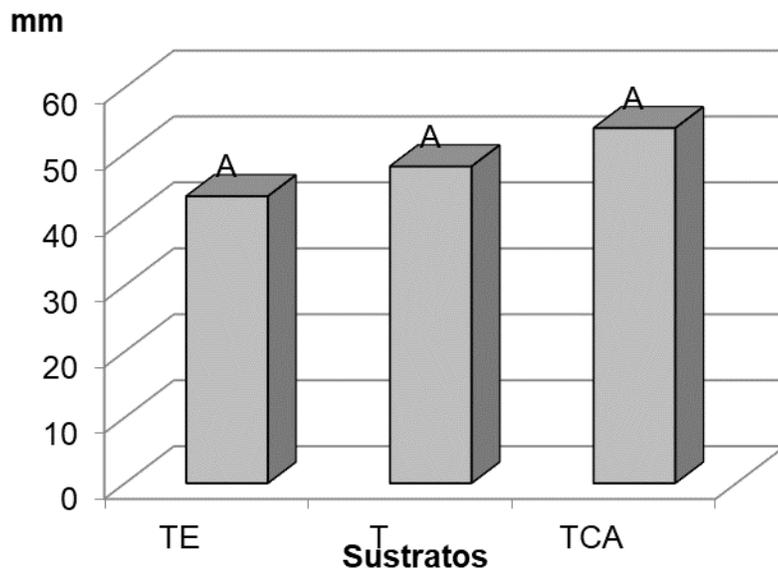
Cultivar	Media (mm)
Ambev 23	41,42 A
Carumbe	42,45 A
Arrayan	45,92 A B
Guaviyú	53,75 A B
CLE 202	58,75 B

(\*) medias con igual letra mayúsculas no difieren estadísticamente ( $P \leq 0.01$ )

La estimación del AAP en los cultivares señaló un comportamiento intermedio para Arrayán y Guaviyú, quienes resultaron similares tanto a los de mayor como al de menor potencial, CLE 202.

El potencial alelopático estimado en Carumbé fue prácticamente el mismo que el calculado para Ambev 23, lo cual permite afirmar que ambos cultivares presentan la capacidad de reducir el crecimiento inicial de la raíz de la maleza.

Pese a haberse detectado efecto de los sustratos no fue posible diferenciar las medias resultando los 3 sustratos con igual comportamiento.



(\*) medias con igual letra mayúsculas no difieren estadísticamente ( $p < 0.05$ )

Figura No. 2. Promedio de largo de raíz de raigrás medida en mm para los diferentes tratamientos correspondientes a tipo de sustrato

El que el test de Tukey no logre comprobar diferencias entre sustratos es llamativo siendo que las medias de TE y TCA presentan una variación mayor al 20%. Por otra parte, también resultan llamativos los bajos crecimientos de raíz estimados en el tratamiento con tierra esterilizada, lo cual parece indicar que no constituyó un medio adecuado para el desarrollo. Podría pensarse que la eliminación de la actividad de los microorganismos, que pretendió lograrse por este medio, debe ser implementada con otras técnicas.

La tierra (T) surge como el sustrato en el cual se expresa más claramente el potencial inhibitorio de los cultivares estudiados. El sustrato con tierra y carbón activado (TCA) fue el material en el cual se obtuvieron los mayores largos promedios de raíz de raigrás, sugiriendo que el poder adsorptivo del carbón activado podría estar disminuyendo la concentración de aleloquímicos en la solución y así reduciendo el efecto supresor del crecimiento de la raíz de raigrás, tal como se encontró en varios otros estudios semejantes.

Por otra parte, el coeficiente de variación (CV) para la variable largo de raíz que alcanzó el 27,56%, pudo constituir una limitante en el análisis dificultando la comprobación de efectos. Considerando que el bajo número de

repeticiones en los tratamientos podría explicar los valores de CV hallados, por ello se resolvió repetir el estudio en el Experimento 2, incorporando mayor número de repeticiones e incluyendo sólo tierra y tierra con carbón activado como sustratos.

A nivel de las estimaciones de longitud de la parte aérea de raigrás, no se detectó efecto de cultivar ni de sustrato. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Capurro y Sotelo (2010), quienes concluyeron sobre la menor sensibilidad de la parte aérea en las estimaciones de efectos iniciales.

Al analizar el Experimento 2 también se detectaron efectos para sustrato ( $P=0.04$ ), en este caso muy significativo para cultivar ( $P=0.01$ ) y ningún efecto para la interacción de estos dos factores.

El largo de raíz de raigrás en el tratamiento sólo con tierra fue en promedio 13,7 % más corto que el estimado en las parcelas con TCA (Cuadro No. 7), sugiriendo una vez más la posibilidad de la inactivación de aleloquímicos en el medio con carbón activado, en concordancia con lo observado a nivel de tendencia en el Experimento 1.

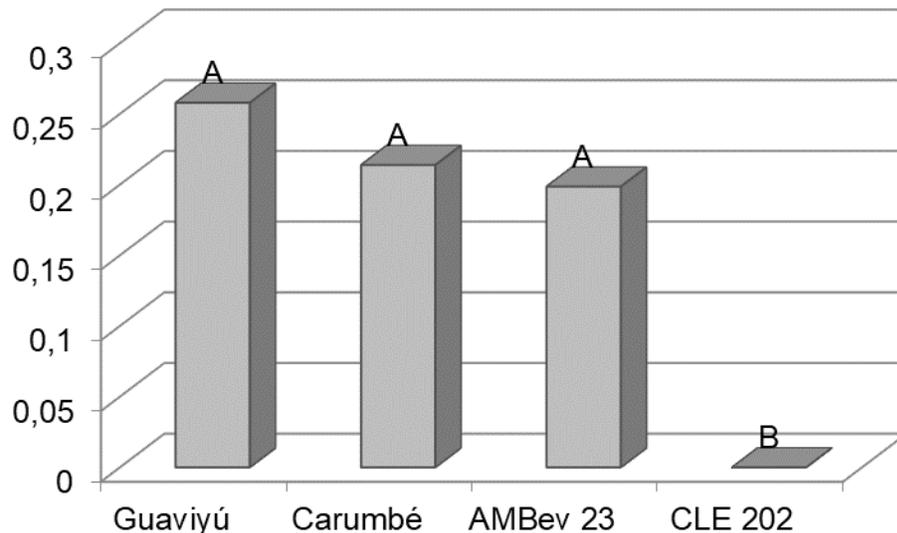
Cuadro No. 8. Medias del largo de raíz de raigrás según cultivar y sustrato

T		TCA		T/TCA
Cultivar	Media (mm)	Cultivar	Media (mm)	%
Guaviyú	50,07	Guaviyú	56,63	88
Carumbé	53,04	Carumbé	62,44	85
Ambev 23	53,74	Ambev 23	69,04	78
CLE 202	67,47	CLE 202	71,81	94

Si bien el análisis estadístico no detectó efecto de la interacción entre cultivar y sustrato, resulta destacable el comportamiento comparativo del cultivar CLE 202 en los 2 sustratos. Como puede verse en el cuadro, el crecimiento de la raíz de raigrás fue claramente menor en el sustrato tierra en los restantes cultivares, mientras que en CLE 202 no existen prácticamente diferencias. En realidad, esta respuesta era lo esperable dado a que como ya se mencionó anteriormente, el potencial alelopático de esta variedad es muy bajo y por lo tanto la concentración de aleloquímicos de la solución en las parcelas con tierra no debió presentar gran diferencia con la presente en las parcelas con TCA.

En cuanto al efecto de los cultivares se constató una diferencia máxima en el largo de raíz de raigrás de 30,5 % al comparar el largo de raíz del raigrás creciendo junto al cultivar de cebada CLE 202 frente al que crece junto al cultivar Guaviyú.

Al analizar el efecto de los cultivares sólo en el sustrato T, se ve que el largo de raíz de raigrás es estadísticamente igual en los tratamientos con Guaviyú, Carumbé y Ambev 23. El único tratamiento cuya media se separa de las del resto de los tratamientos es la de raigrás creciendo con el cultivar CLE 202 (Figura No. 3). Comparando este experimento con lo que resultara en el Experimento 1, los cultivares presentaron diferencias más marcadas, ninguno mostró comportamiento intermedio diferenciándose todos claramente de CLE 202.



(\*) medias con igual letra mayúsculas no difieren estadísticamente ( $p < 0.05$ ).

Figura No. 3. Actividad Alelopática Potencial (AAP) en los cultivares ensayados

La inhibición en el crecimiento de raíz mostró una vez más valores muy concordantes con los trabajos anteriores de Capurro y Sotelo, lo cual resulta interesante destacar puesto que los trabajos de Capurro y Sotelo fueron en agar y en este caso tierra, más aproximado a la realidad.

A modo de síntesis, considerando los resultados de los Experimentos 1 y 2 puede afirmarse que el potencial alelopático expresado por los cultivares en el sustrato tierra mostró importante similitud con los resultados de trabajos anteriores realizados en agar. Tanto el comportamiento relativo de los cultivares como las magnitudes de los efectos en cada caso resultaron muy semejantes por lo que podría pensarse en la utilidad de realizar los estudios en tierra.

La inclusión de testigos con tierra adicionada con carbón activado se mostró como importante herramienta para comprobar la existencia de efectos alelopáticos.

#### 4.2 EXPERIMENTO 3

El objetivo de este experimento como se mencionara en materiales y métodos, fue estudiar el efecto de las relaciones de densidad especie donante-especie receptora en la expresión de los efectos sobre la especie receptora.

En consideración de los resultados del análisis estadístico, no fue posible evidenciar efectos de las relaciones de densidad sobre el largo de la raíz de raigrás ( $P > 0.05$ ).

Cuadro No 9. Promedio de largo de raíz de raigrás medida en mm según relación cebada/raigrás y cultivar de cebada

Relación ceb/Rg	Longitud promedio de raíz de Raigrás (mm)			
	Ambev 23	$P \geq 0.05$	CLE 202	$P \geq 0.05$
10/2	49,95	A	58,45	A
10/4	58,44	A	59,43	A
10/6	56,7	A	57,12	A
10/8	51,55	A	56,53	A
10/10	50,31	A	54,03	A

(\*) medias con igual letra mayúsculas no difieren estadísticamente ( $p < 0.05$ ).

Tal como se cita en la bibliografía, la mayoría de los trabajos en este tema afirma sobre la existencia de una fuerte dependencia de los efectos alelopáticos con la relación densidad donante/densidad receptora, fundamentada en la dilución de la concentración de aleloquímicos cuando se reparte en mayor número de plantas de la especie receptora.

Si bien en la mayoría de estos trabajos se han considerado rangos de densidades mucho más amplios que los que se estudiaron en el presente experimento, resulta importante destacar que los mayores efectos de la densidad del donante se han encontrado en rangos de relaciones donante/receptora muy semejante a los ensayados (Li et al., 2011) de entre 1 a 1 y 2 a 1.

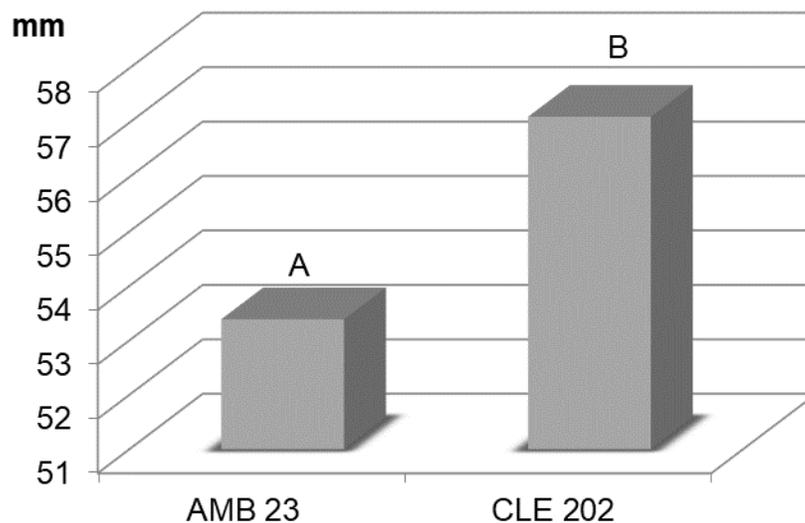
Pese a que no se encontró ningún estudio con resultados similares, que permitiera comprender los presentes resultados, es posible plantear algunas interpretaciones.

Una interpretación podría ser considerar que existieron limitantes de orden metodológico. Se podría pensar que no se previó la posibilidad de la instalación de interferencias de tipo competitivo en las relaciones más altas (como la 10/8, 10/10). La suma de las densidades de cebada y raigrás en esos tratamientos pudo determinar que aparecieran competencias por recursos que enmascararan la expresión de los efectos alelopáticos y algún autor hace referencia a este fenómeno (Weidenhamer et al., 1989).

Sin embargo, también existen otros resultados, que aun mostrando alguna contradicción podrían brindar interpretaciones posibles. En un trabajo realizado por Zheng et al. (2010), se comprueba que la producción de aleloquímicos en trigo es inducida en forma diferencial por la especie de maleza presente y en algunas de estas especies de malezas, fuertemente promovida por la densidad de las mismas. Así, la producción de DIMBOA determinada en trigo aumentó claramente con el incremento en la densidad de *Digitaria sanguinalis*.

Considerando estos resultados de Zheng et al. (2010), se podría interpretar que a altas densidades de la receptora maleza, el efecto de dilución no operaría en realidad, puesto que la producción de aleloquímicos pudo verse incrementada con el aumento de densidad de la maleza. Kong et al. (2018) comentan que la detección de vecinos y la respuesta aleloquímica son dos procesos inseparables cuando una o más plantas crecen juntas e interactúan. Este patrón puede surgir a través de la producción y liberación de químicos de señalización que inducen la producción de aleloquímicos defensivos, y es densidad dependiente.

Por último, resulta de sumo interés destacar que una vez más se detectaron efectos diferenciales ( $P \leq 0,05$ ) para CLE 202 y para Ambev 23, corroborando las tendencias ya observadas relativas al potencial de inhibición de Ambev 23 sobre el crecimiento de la raíz de raigrás (Figura No. 4).



(\*) medias con igual letra mayúsculas no difieren estadísticamente ( $p < 0.05$ ).

Figura No. 4. Promedio de largo de raíz de raigrás medida en mm para los cultivares utilizados (Ambev 23 y CLE 202) en los tratamientos de relaciones de densidad cebada/raigrás ensayados

También merece comentarse que no se encontró efecto significativo de la interacción cultivar por relación de densidad, resultando iguales los efectos de todas las relaciones en ambos cultivares. Siendo así, y considerando los trabajos anteriores (Capurro y Sotelo, 2010) en los que se concluyen que no existe potencial alelopático en CLE 202, en esta variedad no podría haber existido combinación de efectos alelopáticos y competitivos, y la respuesta a las relaciones de densidad tendrían que haber sido diferentes de alguna manera invalidando la primera interpretación que se manejó para la ausencia de efectos de la densidad en las relaciones de alta densidad.

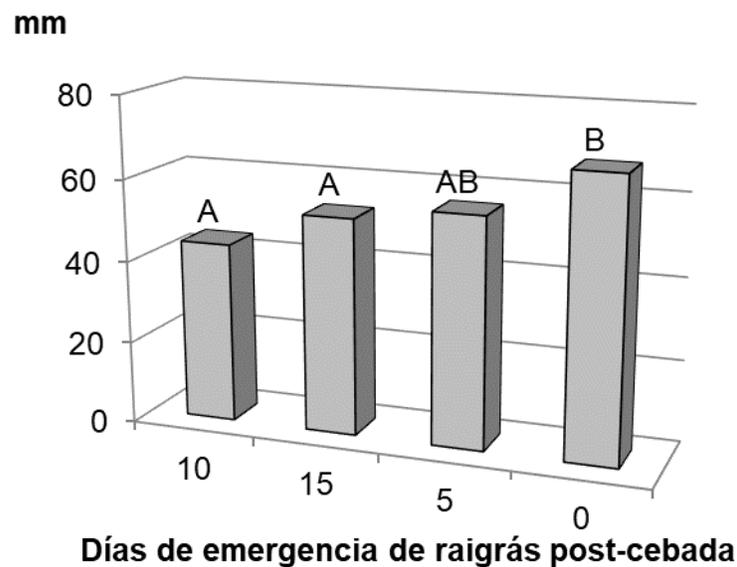
La determinación de las cantidades de aleloquímicos disponibles hubiera permitido realizar una mejor interpretación de estos resultados.

A modo de síntesis, con los resultados de este experimento se concluye que no existió dependencia de los efectos alelopáticos con la relación densidad donante/densidad receptora en el rango estudiado de 10/2 a 10/10.

#### 4.3 EXPERIMENTO 4

La longitud de la raíz de raigrás se vio afectada ( $P < 0.01$ ) por el momento de emergencia de la maleza en relación al de la cebada.

Los mayores efectos de inhibición en la raíz de raigrás se determinaron cuando la maleza emergió con posterioridad de más de 5 días en relación a cebada, alcanzándose disminuciones del orden de 35% (Figura No. 5).



(\*) medias con igual letra mayúsculas no difieren estadísticamente ( $P < 0.01$ )

Figura No. 5. Largo de raíz de raigrás según día de emergencia post-cebada

Este resultado concuerda con lo citado en la bibliografía (Li et al., 2011). Inclusive, también concordante con lo hallado por estos autores y aun cuando no resultó significativa, se observó una tendencia a nivel de los promedios de incremento del efecto de inhibición hasta los 10 días y menores efectos posteriores.

Según mencionan los citados autores, la recuperación posterior se relacionaría con reabsorciones o degradación debida a la corta vida media de ciertos aleloquímicos.

Las respuestas observadas tienen interesantes implicancias a nivel productivo. Sin duda toda práctica que pudiera implementarse para diferir la emergencia de raigrás en cultivos de cebada tendría muy favorables efectos en el manejo de las relaciones de interferencia, al permitir potenciar los efectos de inhibición de cebada sobre raigrás. Constituye además una explicación adicional a las ventajas observadas en estudios de competencia en los que se comprueban los beneficios de la implantación retrasada de la maleza (Berti et al., 1996).

Otra interesante aplicación práctica de este resultado tiene que ver con los ajustes necesarios en los experimentos para la evaluación de efectos alelopáticos. Considerando que cuando se estudian los efectos sobre malezas siempre existe una importante variabilidad que dificulta la comprobación de diferencias, podría pensarse que la identificación de potenciales efectos a nivel de cultivares, podría por ejemplo mejorarse difiriendo las emergencias en tiempos de 5 a 10 días buscando potenciar la expresión del efecto.

## 5. CONCLUSIONES

El sustrato tierra se mostró como una herramienta útil y sencilla en el estudio de efectos alelopáticos.

Ambev 23 y Carumbé demostraron ser cultivares con alto potencial alelopático. Cle 202 resultó ser útil como testigo por tener bajo o nulo potencial alelopático.

Las relaciones de densidad especie donante/especie receptora no afectaron la expresión de efectos alelopáticas en las variedades de cebada ensayadas sobre raigrás en el rango de 10/2 a 10/10 estudiado.

El momento de emergencia de cebada en relación a raigrás afectó la magnitud de los efectos alelopáticos expresados por la variedad de cebada ensayada (Ambev 23). Los mayores efectos se determinaron cuando la maleza emergió con posterioridad de 5 días o más a la emergencia de cebada.

## 6. RESUMEN

El estudio de los efectos alelopáticos constituye una gran herramienta para la comprensión de las relaciones entre especies vegetales, lo cuál sería de gran importancia para el desarrollo de nuevas tecnologías y prácticas de manejo a nivel productivo. La falta de ajustes metodológicos hace que algunos bioensayos de laboratorio no predigan adecuadamente las respuestas observadas a campo. Con el objetivo mayor de contribuir en el conocimiento de los ajustes que permitan mejorar los resultados de los estudios en alelopatía se llevó a cabo el presente trabajo de tesis, que tuvo por objetivo determinar el efecto del sustrato, de la densidad y del estado de desarrollo en la expresión de los efectos alelopáticos en variedades de cebada. A tales fines fueron instalados 4 experimentos en la cámara de crecimiento del laboratorio de malherbología de la Estación Experimental Mario A. Cassinoni de la Facultad de Agronomía durante los meses de junio a agosto del 2014. Todos los experimentos tuvieron Diseño de Bloques Completamente Aleatorizados (DBA) y fueron procesadas a través de Anavas y separación de medias por Test de Tukey cuando correspondiera. En los experimentos 1 y 2 se estudiaron los efectos de los sustratos tierra (T), tierra adicionada con carbón activado (TCA) y tierra esterilizada (TE), sobre la expresión de los efectos alelopáticos de 5 variedades de cebada (Arrayán, Cle 202, Guaviyú, Carumbé y Ambev 23) en la longitud de raíz de *Lolium multiflorum* (raigrás anual). En el experimento 3 se estudiaron los efectos de 5 relaciones de densidad especie donante cebada /especie receptora raigrás; 10/2, 10/4, 10/6, 10/8 y 10/10, en 2 sustratos (T y TCA) en la expresión de los efectos alelopáticos de las variedades de cebada de mayor y menor potencial alelopático (Ambev 23 y CLE 202). En el experimento 4 se estudiaron los efectos de los momentos de emergencias relativas de cebada y raigrás en la inhibición alelopática sobre la raíz de raigrás. Considerando los resultados de estos experimentos se encontró que el sustrato tierra puede constituir una herramienta útil y sencilla en el estudio de efectos alelopáticos, que las relaciones de densidad especie donante/especie receptora no afectaron la expresión de efectos alelopáticas en las variedades de cebada ensayadas sobre raigrás en el rango de 10/2 a 10/10 estudiado y que el momento de emergencia de cebada en relación a raigrás afectó la magnitud de los efectos alelopáticos expresados por la variedad de cebada ensayada (Ambev 23).

Palabras clave: Alelopatía; *Hordeum vulgare*; Bioensayos de laboratorio; Ajustes metodológicos.

## 7. SUMMARY

The study of allelopathic effects is a great tool for understanding the relationships between plant species, which would be of great importance for the development of new technologies and management practices at the production level. The lack of methodological adjustments means that some laboratory bioassays do not predict adequately the responses observed in the field. With the main objective of contributing to the knowledge of the adjustments that allow to improve the results of the studies in allelopathy, the present thesis work was carried out, whose objective was to determine the effect of the substrate, the density and the state of development in the expression of allelopathic effects in barley varieties. For such purposes, 4 experiments were installed in the growth chamber of the laboratory of malherbology of the Mario A. Cassinoni Experimental Station of the Faculty of Agronomy during the months of June to August of 2014. All the experiments had design of Completely Randomized Blocks (CRB) and were processed through Anavas and media separation by Tukey Test when appropriate. In experiments 1 and 2, the effects of soil substrates (S), soil added with activated charcoal (SAC) and sterilized soil (SS), on the expression of allelopathic effects of 5 varieties of barley (Arrayán, Cle 202, Guaviyú, Carumbé and Ambev 23) in the root length of *Lolium multiflorum* (annual ryegrass) were studied. In Experiment 3, the effects of 5 ratios of species density on barley donor / species receiving ryegrass were studied; 10/2, 10/4, 10/6, 10/8 and 10/10, in 2 substrates (T and TCA) in the expression of the allelopathic effects of the varieties of barley with the highest and lowest allelopathic potential (Ambev 23 and CLE 202). In experiment 4, the effects of relative emergence moments of barley and ryegrass on allelopathic inhibition on rye root were studied. Considering the results of these experiments it was found that the soil substrate can be a useful and simple tool in the study of allelopathic effects, that the density ratios donor species / receptor species did not affect the expression of allelopathic effects in the varieties of barley tested on ryegrass in the range of 10/2 to 10/10 studied and that the barley emergence moment in relation to ryegrass affected the magnitude of the allelopathic effects expressed by the variety of barley tested (Ambev 23).

Key words: Allelopathy; *Hordeum vulgare*; Laboratory bioassays; Methodological adjustments.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Bertholdsson, N. O. 2004. Variation in allelopathic activity over 100 years of barley selection and breeding. *Weed Research*. 44 (2):78-86.
2. \_\_\_\_\_. 2005. Early vigour and allelopathy – two useful traits for enhanced barley and wheat competitiveness against weeds. *Weed Research*. 45:94-102.
3. Berti, A.; Dunan, C. M.; Sattin, M.; Zanin, G.; Westra, P. 1996. A new approach to determine when to control weeds. *Weed Science*. 44:496-503.
4. Capurro, P.; Sotelo, E. 2010. Interferencia alelopática de cultivares de cebada sobre *Lolium multiflorum* L. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 44 p.
5. Copaja, S. V.; Nicol, D.; Wratten, S. D. 1999. Accumulation of hydroxamic acids during wheat germination. *Phytochemistry*. 50 (1):17-24.
6. Duke, S. O.; Dayan, F. E.; Rimando, R. M.; Schrader, K. K.; Aliotta, G.; Oliva, A.; Romagni, J. G. 2002. Chemicals from nature for weed management. *Weed Science*. 50:138-151.
7. Ferreira, A. G.; Aqüila, M. E. 2000. Alelopatía: Uma área emergente da ecofisiología. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 12:175-204.
8. Fischer, N.; Weidenhamer, J.; Riopel, J.; Quijano, L.; Menelaou, M. 1990. Stimulation of witchweed germination by sesquiterpene lactones: a structure-activity study. *Phytochemistry*. 29 (8):2479-2483.
9. Gómez, C.; Arango, R.; Arévalo, L. P.; Delgado, C.; Guzmán, M. R.; León, S. M.; Marentes, D.; Correa, E. M.; Vargas, S. 2003. Algunos estudios de alelopatía de *Rumex crispus* L. y *Polygonum segetum* HBK., en Colombia. *Revista Corpoica*. 4 (1):42-48.
10. Haig, T. 2008 Allelochemicals in plants. In: Zeng, R. S.; Mallik, A. U.; Shi, M. L. eds. *Allelopathy in sustainable agriculture and forestry*. New York, USA, Springer. pp. 63-104.

11. Hanson, A. D.; Ditz, K. M.; Singletary, G. W.; Leland, T. J. 1982. Gramine accumulation in leaves of barley grown under high-temperature stress. *Plant Physiology*. 71:896-904.
12. Inderjit; Dakshini, K. M. M. 1995. On laboratory bioassays in allelopathy. *The Botanical Review*. 61 (1):28-44.
13. \_\_\_\_\_; Weston, L. A. 2000. Are laboratory bioassays for allelopathy suitable for prediction of field responses?. *Journal of Chemical Ecology*. 26 (9):2111-2118.
14. \_\_\_\_\_. 2001. Soils: environmental effect on allelochemical activity. *Agronomy Journal*. 93:79-84.
15. \_\_\_\_\_.; Callaway, R. M. 2003. Experimental designs for the study of allelopathy. *Plant and Soil*. 256:1-11.
16. \_\_\_\_\_. 2005. Soil microorganisms: an important determinant of allelopathic activity. *Plant and Soil*. 274:227-236.
17. Khalid, S.; Ahmad, R.; Shad, R. A. 2002. Use of Allelopathy in Agriculture. *Asian Journal of Plants Sciences*. 1 (3):292-297.
18. Kong, C. H.; Zhang, S. Z.; Li, Y. H.; Xia, Z. C.; Yang, X. F., Meiners, S. J.; Wang, P. 2018. Plant neighbor detection and allelochemical response are driven by root secreted signaling chemicals. *Nature communications*. 9 (1):1-9.
19. Kruse, M.; Strandberg, M.; Strandberg, B. 2000. Ecological effects of allelopathic plants: a review. National Environment Research Institute. NERI Technical report no. 315. 66 p.
20. Leather, G. R.; Einhellig, F. A. 1986. Bioassays in the study of allelopathy. In: Putnam, A. R.; Tang, C. S. eds. *The science of allelopathy*. New York, USA, Wiley. pp. 133-145.
21. Li, C. J.; An, M.; Saeed, M.; Li, L.; Pratley, J. 2011. Effects of wheat crop density on growth of ryegrass. *Allelopathy Journal*. 27 (1):43-54.
22. Liu, Z.; Carpenter, S. B.; Bourgeois, W. J.; Yu, Y.; Constantin, R. J.; Falcon, M. J.; Adams, J. C. 1998. Variations in the secondary

metabolite camptothecin in relation to tissue age and season in *Camptotheca acuminata*. *Tree Physiology*. 18:265-270.

23. Lovett, J. V.; Houtt, A. H. C. 1995. Allelopathy and self-defence in barley. In: Inderjit; Dakshini, K. M. M.; Einhellig, F. A. eds. *Allelopathy: organisms, processes, and applications*. Washington, D. C., USA, American Chemical Society. pp. 170-183.
24. Macías, F. A.; Galindo, J. C. G.; Molinillo, J. M. G.; Cutler, H. G. 1999. *Recent Advances in Allelopathy: a Science for the Future*. Cádiz, Universidad de Cádiz. v.1, 514 p.
25. Mahall, B. E.; Callaway, R. M. 1992. Root communication mechanisms and intracommunity distributions of two Mojave desert shrubs. *Ecology*. 73 (6):2145–2151.
26. Mallik, A. 2008. Introduction: allelopathy research and application in sustainable agriculture and forestry. In: Zeng, R. S.; Mallik A. U.; Shi, M. L. eds. *Allelopathy in sustainable agriculture and forestry*. New York, USA, Springer. pp. 1-7.
27. Mandal, S. 2001. Allelopathic activity of root exudates from *Leonorus sibiricus* (raktodrone). *Weed Biology and Management*. 1:170-175.
28. Oliveros-Bastidas, A. 2008. El fenómeno alelopático, el concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de nuevos herbicidas. *Química Viva*. 7 (1):2-34
29. \_\_\_\_\_; Macías, F. A.; Carrera, C.; Marín, D.; Molinillo, J. M. 2009. Exudados de la raíz y su relevancia actual en las interacciones alelopáticas. *Química Nova*. 32 (1):198-213.
30. Olofsdotter, M.; Rebulanan, M.; Madrid, A.; Dali, W.; Navarez, D.; Olk, D. 2002. Why phenolic acids are unlikely primary allelochemicals in rice. *Journal of Chemical Ecology*. 28 (1):229-242.
31. Putnam, A. R.; Tang, C. S. 1986. *The science of Allelopathy*. Bioassays in the study of allelopathy. New York, Wiley. 317 p.
32. Qasem, J. R.; Hill, T. A. 1989. On difficulties with allelopathy methodology. *Weed Research*. 29 (5):345-347.
33. Rice, E. 1974. *Allelopathy*. New York, Academic Press. 353 p.

34. Sampietro, D. A. 2003. Alelopatía: concepto, características, metodología de estudio e importancia. (en línea). San Miguel de Tucumán, Argentina, Universidad Nacional de Tucumán. s.p. Consultado 5 oct. 2018. Disponible en [http://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_y\\_manejo\\_pasturas/pasturas%20artificiales/19-alelopatia.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas%20artificiales/19-alelopatia.pdf)
35. Sinkkonen, A. 2001. Density-dependent chemical interference-an extension of the biological response model. *Journal of Chemical Ecology*. 27 (7):1513-1523.
36. Souza Filho, A. P. S.; Alves, S. M.; Dutra, S. 2002. Estádio de desenvolvimento e estresse hídrico e as potencialidades alelopáticas do capim-marandu. *Planta Daninha*. 20 (1): 25-31.
37. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; Figueiredo, F. J. C. 2003. Efeitos alelopáticos do calopogônio em função de sua idade e da densidade de sementes da planta receptora. *Planta Daninha*. 21 (2): 211-218.
38. Thijs, H.; Shann, J. R.; Weidenhamer, J. D. 1994. The effect of phytotoxins on competitive outcome in a model system. *Ecology*. 75: 1959–1964.
39. Wardle, D. A.; Nicholson, K. S.; Rahman, A. 1992. Influence of plant age on the allelopathic potential of nodding thistle (*Carduus nutans* L.) against pasture grasses and legumes. *Weed Research*. 33 (1):69-78.
40. Weidenhamer, J. D.; Hartnett, D. C.; Romeo, J. T. 1989. Density dependent phytotoxicity: distinguishing resource competition and allelopathic interference in plants. *Journal of Applied Ecology*. 26:613-624.
41. \_\_\_\_\_. 2008. Allelopathic mechanism and experimental methodology. In: Zeng, R. S.; Mallik, A. U.; Shi, M. L. eds. *Allelopathy in sustainable agriculture and forestry*. New York, USA, Springer. pp. 63-104.
42. Weston, L. A. 2005. History and Current Trends in the use of allelopathy for weed management. *HortTechnology*. 13:529-534.

43. Yoshida, H.; Tsumuki, H.; Kanehisa, K.; Corcuera, L. J. 1993. Release of gramine from the surface of barley leaves. *Phytochemistry*. 34:1011-1013.
44. Zheng, Y.; Liu, X.; Dong, F.; Li, J.; Gong, G.; Zhu, G. 2010. Biological induction of DIMBOA in wheat seedlings by weeds. *Allelopathy Journal*. 25 (2):433-440.