



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CAMBIOS EN LA COMPOSICION DE METABOLITOS
SECUNDARIOS DE LAS HOJAS DE Senecio praecox
(COMPOSITAE) ASOCIADOS A PERFORACION
PUNTUAL Y RECURRENTE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE;

B I O L O G O

P R E S E N T A ;

CARMEN CRISTINA ADRIANO MORAN

FALLA DE ORIGEN

CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO

JUNIO DE 1990



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

C O N T E N I D O	Pags.
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	6
III. ANTECEDENTES	7
1. Ubicación Taxonómica	9
2. Descripción Morfológica	9
3. Revisión Química	10
Terpenos	
Flavonoides	
Alcaloides	
4. Evaluación Ecológica y Química	14
Evaluación ecológica	
Evaluación química	
IV. MATERIAL Y METODO	17
1. Diseño Estadístico	17
a) Hipotesis	
b) Modelo estadístico	
c) Supuestos del modelo	
d) Diseño de tratamientos	
e) Análisis de varianza	
f) Análisis de residuales	
g) Diferencias mínimas significativas	
2. Trabajo de Campo	21
a) Formación de lotes experimentales	
b) Tratamientos	
c) Muestreo	
3. Trabajo de Laboratorio	24
a) Extracción	
b) Cromatografía	
c) Pruebas coloridas y de precipitación	
V. RESULTADOS	26
a) Cromatografía en capa fina	
b) Índice de diferencia	
c) Análisis de varianza (Anova)	
d) Diferencias mínimas significativas	
e) Pruebas coloridas y de precipitación	
VI. ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSION	35
VII. CONCLUSIONES	58

VIII. APENDICES

59

Apèndice 1

59

Apèndice 2

61

Apèndice 3

68

Apèndice 4

68

Apèndice 5

71

IX. BIBLIOGRAFIA.

73

I N T R O D U C C I O N

En las plantas, como en todos los seres vivos, se lleva a cabo una serie de procesos de síntesis y degradación de compuestos que les permiten mantenerse y sobrevivir en su medio; este conjunto de procesos recibe el nombre de Metabolismo. En los procesos metabólicos como la fotosíntesis o la respiración participan activamente moléculas de lípidos, proteínas y carbohidratos, conformando el llamado metabolismo primario.

Además de estos compuestos esenciales para la vida de la planta, existen compuestos que aparentemente no intervienen en el metabolismo primario, por lo que se les conoce como compuestos o metabolitos secundarios. Pese a que todas las plantas poseen algún tipo de metabolito secundario, la función de la mayoría de dichas sustancias es aún incierta.

Inicialmente se sugirió que estos compuestos eran sustancias de desecho del metabolismo. Sin embargo, en la actualidad, se ha observado que algunas de estas sustancias son sintetizadas activamente por la planta. Aunado a esto y a algunos datos recopilados, Siegler y Price (1976) sugieren que los metabolitos secundarios en las plantas se encuentran en un estado de equilibrio dinámico y por consiguiente estas sustancias están íntimamente relacionadas con funciones metabólicas primarias. Algunos de los estudios recopilados por estos autores proponen por ejemplo que los alcaloides pueden actuar como almacenes de C ó N y en ausencia de estos alcaloides la actividad metabólica puede ser localmente limitada. Algunos compuestos cianogénicos en

leguminosas pueden asumir un papel similar, ya que se encuentran presentes en cantidades relativamente altas en semillas y plántulas y su cantidad decrece rápidamente con la edad. La variación estacional de taninos y glucósidos cianogénicos del arbusto Heteromeles arbutifolia sugiere que estos compuestos son fácilmente transportados y/o catabolizados. Además estos compuestos secundarios pueden actuar como importantes reguladores de compuestos bioquímicos. Por ejemplo los flavonoides tienen efectos en procesos vitales como la respiración y la fotosíntesis (Sieglar y Price, 1976).

Otras funciones en las que se ha propuesto que están involucrados estos compuestos, son la protección contra radiaciones ultravioleta, la desecación y la desintoxicación de venenos ambientales.

Sin embargo, pese a que a la mayoría de estos compuestos no se les ha podido asignar un papel dentro del metabolismo primario, gran cantidad de autores los consideran como mediadores de las interacciones ecológicas con otros organismos, en particular en la defensa (argumentada adaptativa) contra el ataque de fitófagos (Dirzo, 1985).

Siguiendo este punto de vista (considerando a los metabolitos secundarios como mediadores de interacciones ecológicas), muchos autores como Frankel 1959, Beck 1965, Feeny 1976, Rhoades y Cates 1976, entre otros, basan sus discusiones, conceptos y teorías, casi exclusivamente en la presencia o ausencia en las plantas de estos compuestos químicos.

Como consecuencia de esta aproximación, en ocasiones simplista de las interacciones planta-otros organismos, pareciera

que se ha perdido una visión global de dichos procesos. Daría la impresión de que toda la complejidad de las relaciones entre organismos se redujera simplemente a la interacción química (en este caso la defensa química). Las interacciones que se dan entre los organismos no son el resultado de un solo factor, sino de la mezcla de muchos y variados factores del medio interno y externo de los organismos involucrados.

Puede ser que como opina Dirzo (1985), algunos ecólogos y evolucionistas han aceptado fácilmente el papel defensivo de los metabolitos secundarios, dado el atractivo que ofrecen como mediadores de interacciones ecológicas (con lo cual podemos construir bellas y armoniosas historias coevolutivas) y que además presenten un valor adaptativo. Sin embargo, pueden haber otras alternativas que expliquen porque la planta no es atacada por sus depredadores y que puedan ser o no de valor adaptativo. Como el que la planta es rechazada por el herbívoro por su bajo contenido nutricional o de agua, o incluso de nitrógeno que son muy necesarios para el herbívoro o por las interacciones que presenta la planta con otros organismos (depredadores o parásitos de herbívoros); o por que la diversidad fitoquímica sea una "adaptación fósil" a herbívoros que desaparecieron hace tiempo.

Además, hay investigadores que rechazan la hipótesis de que algunos de estos compuestos se seleccionaron principalmente como mecanismos de defensa; en su lugar, ellos proponen que fueron seleccionados como reguladores del metabolismo bajo condiciones de stress. Si esta teoría es correcta, las propiedades aleloquímicas que presentan estos compuestos en las plantas, serían

secundarias.

Las pruebas de que los metabolitos secundarios protegen a la planta de sus depredadores son muchas, pero basadas en evidencias dudosas, debido a que estas evidencias utilizan supuestos de causalidad incorrectos; la mayoría no son experimentales sino deducciones a partir de observaciones y las pocas evidencias experimentales suelen estar basadas en diseños incorrectos. Sólo para algunos casos específicos existen pruebas contundentes de que estos compuestos confieren protección a la planta que los contiene; sin embargo, estas pruebas no son suficientes para poder generalizar el fenómeno hacia todas las interacciones planta-herbívoro.

Además, en base a estas pruebas no se puede asegurar que todos los organismos que contienen determinados metabolitos secundarios tengan ventaja adaptativa sobre aquellos que no los contienen. Tampoco se puede asegurar que la presencia de los metabolitos secundarios sea el resultado de la presión de selección llamada herbivorismo (o hayan aparecido a causa de éste).

Debido a la importancia que presenta este fenómeno y a la carencia de estudios que prueben o confirmen las opiniones postuladas a este respecto, existe la necesidad de realizar trabajos que permitan ampliar el campo del conocimiento sobre el papel que juegan los metabolitos secundarios en la defensa de la planta.

En este trabajo se intenta hacer una aproximación experimental a algunos de los varios problemas relacionados con

el papel de los metabolitos secundarios en la relación planta-herbívoro: ¿Existe realmente un cambio en el contenido de metabolitos secundarios como respuesta a la perforación foliar? ¿Es este cambio independiente del tipo de perforación? ¿Cuál es la velocidad de respuesta de la planta? Dicho cambio, ¿permite suponer un papel defensivo o reparativo de los metabolitos secundarios involucrados?

Ante la imposibilidad de estudiar estos fenómenos en un gran número de especies vegetales, por el momento, se decidió utilizar a *Senecio jacobaea* Cav. (COMPOSITAE) como objeto experimental.

O B J E T I V O S

- 1) Evaluar si existen cambios en el contenido de metabolitos secundarios (CCMS), como producto del daño artificial (perforación) en hojas de Senecio praecox.
- 2) Señalar en qué consisten estos cambios.
- 3) Conocer si hay diferencia en la velocidad de respuesta cuando la perforación foliar es puntual (PFP) y cuando es recurrente (PFR).
- 4) Demostrar si la respuesta de las hojas de Senecio praecox es local (sólo en hojas perforadas) o general (tanto en hojas perforadas como en las que no lo fueron).
- 5) Proponer una metodología para el estudio de algunos aspectos del fenómeno de herbivorismo.

ANTECEDENTES

Para el presente trabajo se seleccionó como planta de estudio a *Senecio praecox*, ya que posee algunas características interesantes. En primer lugar es una especie que se encuentra localizada en la zona que comprende la Reserva Ecológica del Pedregal de San Angel D.F., que representa un lugar de fácil accesibilidad y con una importancia biológica ampliamente reconocida. En segundo lugar *Senecio praecox* es una especie endémica del centro del Valle de México; aunque a pesar de esto existen pocos estudios biológicos y químicos de esta especie. En tercer término, la morfología de estas plantas facilita el tipo de estudio que aquí se plantea y finalmente esta especie pertenece a una de las familias más grandes y representativas de la flora de México, la familia Compositae (Asteraceae).

"Arbustos o hierbas, raramente Arboles. Bentham y Hooker estimaron en 1800 el número de especies contenidas en 766 géneros; otros autores calculan el número de géneros en 1000 y el número de especies en 12 000 ...", así describe Hemsley en 1888 algunos datos acerca de la familia de las compuestas, la cual, como se sabe hoy en día, es muy basta con alrededor de 1000 géneros y unas 20 000 especies que tienen una distribución cosmopolita (Rzedowski, 1985).

Dentro de la flora de México la familia Compositae (Asteraceae, Synanthereae) ocupa un lugar preponderante; ya que este grupo de plantas representa alrededor de 13% del total de géneros de fanerógamas que se conocen del país (Rzedowski, 1971:124 en Rzedowski, 1985), prevaleciendo sobre las demás fami-

lias tanto a nivel de número de especies como de individuos. A pesar de ser tan grande, esta es una de las familias más naturales y homogéneas de las plantas superiores. Las compuestas en general son fáciles de distinguir por su inflorescencia en forma de cabezuela provista de involucreo calicino, simulando una flor simple. Se conocen 297 géneros dentro del país y 22 géneros más en las partes limítrofes con Belice, Guatemala, California, Arizona, Nuevo México y Texas, que probablemente también existen en el territorio mexicano (Rzedowski, 1986).

En el Valle de México se conocen varios géneros como por ejemplo: Calendula, Callistephus, Chrysanthemum, Dahlia, Tagetes, Artemisia, Matricaria, Senecio, etc. todos ellos son cultivados como plantas de ornato o para ser usadas en la medicina tradicional (Rzedowski, 1985).

Los senecios, conocidos como hierba cana, pertenecen a uno de los géneros más amplios de esta familia: Senecio (descrito por primera vez en el Genera Plantarum por Linneo), que comprende más de 1000 especies. Una de estas especies destaca notablemente en la zona del Pedregal de San Angel, D.F., se trata de Senecio praecox (n.v. Palo Loco) que presenta una morfología que contrasta con el paisaje casi desértico del lugar, tal como lo describe O'Gorman en 1963: "Senecio praecox originario del centro de México, es característico de la región de lava al sur de la Cd. de México, donde con sus extrañas, angulares y estériles ramas, viene a ser la planta más artística y homogénea del agresivo paisaje de sobresalientes conformaciones rocosas".

1. UBICACION TAXONOMICA

DIVISION: Magnoliophyta

CLASE : Magnoliopsida

SUBCLASE: Asteridae

ORDEN : Asterales

FAMILIA : Asteraceae (Compositae)

TRIBU : Senecioneae

GENERO : Senecio

ESPECIE : Senecio praecox (Cav.) DC. var. praecox

2. DESCRIPCION MORFOLOGICA

Arbusto o planta arborescente caducifolia, candelariforme de 1 a 4 (-5) m de alto, glabro (o densamente pubescente en la parte terminal de las ramas en la variedad *morelensis*); tallos comunmente varios a menudo partiendo desde la base, hasta de 10 cm de diámetro, erectos y succulentos, quebradizos, huecos y tabicados, corteza de color gris claro; hojas en fascículos y aglomeradas en el extremo de las ramas, peciolo hasta 17.5 cm de largo, láminas usualmente ovadas, subpalmatinerves, de 2 a 18 cm de largo, de 2 a 10 (-14) cm de ancho, márgenes con 5 a 8 lóbulos acuminados con el borde entero, cordadas en la base, glabras en ambas superficies; inflorescencia en forma de cimas corimbiformes, con un mechón de pelillos cortos en la base de los pedicelos y de las bracteolas; cabezuelas radiadas, numerosas de 10 a 15 mm de alto, sobre pedicelos hasta de 2.5 cm de largo, bracteolados; involucre cilíndrico o ligeramente campanulado, sus brácteas 7 u 8, oblongoanceoladas o elípticas, de 5 a 10 mm de largo, agudas en el ápice, glabras carentes de cálculo;

receptáculo plano; flores liguladas 5 o 6 amarillas, sus láminas oblongo elípticas u oblanceoladas, de 6 a 15 mm de largo; flores del disco 13 a 22 (6 o 7 en var. *morelensis*), amarillas, de 9 a 12 mm de largo; aquenios maduros claviformes o subcilíndricos, de 3 a 4 mm de largo, estriados y glabros de color café, cerdas del vilano blancas de 6 a 8 mm de largo. Se extiende desde Zacatecas, San Luis Potosí y Jalisco a Puebla y Oaxaca. En esta especie se conocen 2 variedades, de las cuales solamente la típica se encuentra en el Valle de México.

Senecio praecox (Cav.) DC. var. praecox. Habita en altitudes de 2250 - 2850 m, preferentemente en matorrales xerófilos de lugares rocosos basálticos. La planta permanece sin hojas durante la temporada seca y de floración (marzo y abril), y estas aparecen cuando las flores se marchitan y caen.

Se conoce con los nombres de "Palo loco", "Palo bofo", "Candelerero", "Tesapacle", "Tezacpatli", "Tezacapatli", "Texcapatli". Se encuentra dentro del Valle de México en Epazoyucan y Tepeapulco, Villa Alvaro Obregón, La Paz Coyacàn, Tlalpan y Xochimilco. Es cultivado frecuentemente como ornamental; el cocimiento de las hojas se utiliza en la medicina vernácula para curar heridas y reumatismos (Rzedowski, 1925).

3. REVISION QUIMICA

A continuación se presenta un bosquejo de lo que en la literatura se ha reportado acerca de la química de la tribu Senecioneae, el género Senecio y en especial en la especie S. praecox.

En la tribu Senecionae es importante destacar la presencia de 2 clases de compuestos: los sesquiterpenos del tipo de los eremofilanos y furanoeremofilanos y los alcaloides pirrólicos. A la vez es interesante hacer notar la ausencia de poliacetilenos en la mayoría de los géneros de esta tribu (Harborne, 1975).

Para el género Senecio se ha reportado la presencia de los siguientes grupos de compuestos:

TERPENOS

Bohlman y Zdero (1974, en Harborne, 1975; 1977; 1985; 1986) han reportado la presencia de cerca de 100 compuestos diferentes con esqueleto de eremofilanos y furanoeremofilanos, en especies del género Senecio. También encontraron eremofilanos no fumáricos, como el diéster 7, que por reducción se transforma en el triol 8 (Romo de Vivar, 1985).

Con respecto a los triterpenos se ha reportado la presencia de arnidiol y faradiol, 2 dioles isoméricos, (Pyrek y Baranowska, 1973 en Harborne, 1975); y sitosterol en algunas especies (Hegnauer, 1964 en Harborne, 1975).

Dentro de los tetraterpenos se tienen los pigmentos: beta-caroteno, luteína y taraxantina (5-6 epóxido), aislados de Senecio scandens Buch-Ham (Valadon y Momery, 1967 en Harborne, 1975).

FLAVONOIDES

Los derivados del ácido cinámico como el ácido cafeico, el ácido clorogénico y cinarina (derivado con ácido quínico) se presentan en algunas especies de Senecio (Ashtakala y Schwartz, 1971; Hegnauer, 1964; Morareva y Chernova, 1974 en Harborne, 1975).

Las flavonas también están presentes en especies de Senecio como el 7-glucósido de apigenina (Glennie y col, 1971 en Harborne 1975). Además de un complejo formado por un nuevo tipo de glicosilflavona en la que el azúcar es una ramosa (6, 8 - diC - ramosilapigenina), que se presenta acompañada en S. tamoides por mangiferina e isomangiferina. La mangiferina tiene interés como marcador taxónomico, ya que aparte del género Senecio solo se ha encontrado dentro de las compuestas en Dahlia (Heliantheae) (Harborne, 1975).

Glennie y colaboradores (1971 en Harborne, 1975) encontraron en especies del género Senecio, el flavonol 3-glicósido de kaempferol. Los glicósidos de quercetina se encuentran frecuentemente en las raíces y flores de algunas especies; como el 7 glicósido en Senecio subdentatus, el 3-rutinósido de quercetina y el 3-éter-metilico de quercetina, este último hallado en estado libre y no en su forma glicosídica que es más usual (Chumbalov et al, 1974; Kowalska, 1968; Glennie et al, 1971 en Harborne, 1975).

Es interesante hacer notar que estos autores encontraron una correlación significativa entre la química de los flavonoides y la geografía de las especies estudiadas (Harborne, 1975).

ALCALOIDES

Como anteriormente se mencionó, la presencia de alcaloides pirrólicos es importante en la tribu Senecioneae, ya que se han encontrado en más de 100 especies del género Senecio, por lo que incluso se les ha llegado a llamar senecioalcaloides (Daniels y Giovanelli, 1969; Harborne, 1975).

Los alcaloides pirrólicos están compuestos de una base (necina) esterificada con 1 o 2 ácidos (ácidos nécicos), o con 2 ácidos dicarboxílicos, formando un compuesto macrocíclico con ambos grupos hidroxílicos en la necina. Los representantes más abundantes son la retrorsina (> 20 especies), senecionina (>30 especies) y senecifilina (> 35 especies). Las necinas encontradas más comunmente en Senecio son retronecina, acompañada de otonecina, macronecina y rosmarinecina, exclusivas del género; platinecina y heliotridina presente solo en S. corymbosus DC. La variedad de las estructuras de los ácidos es mucho mayor que el de las necinas (Harborne, 1975; Bohlman y Zdero, 1986).

POLIACETILENOS

Los poliacetilenos sólo se han encontrado en 2 especies del género y en cantidades muy pequeñas (Lam y Drake, 1973; Bohlman y Zdero, 1974, en Harborne, 1975).

ACIDOS ORGANICOS

Estos ácidos aparecen frecuentemente en formas combinadas como ésteres en los alcaloides pirrólicos y los sesquiterpenos; los ácidos libres son aislados ocasionalmente. El ácido fumárico y el ácido cítrico están presentes en algunas especies del género (Hegnauer, 1964, en Harborne, 1975).

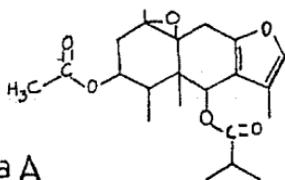
Los estudios químicos realizados acerca de Senecio praecox han sido relativamente pocos, todos ellos encaminados al estudio de los sesquiterpenos y alcaloides pirrólicos.

Del tallo de la planta se aislaron 3 sesquiterpenos conocidos

con el nombre de praecoxilina I, II y III (Romero, 1970); y del extracto metabólico de flores frescas otro sesquiterpeno (del grupo de los furanoeremofilanos) la praecoxilina IV o praecoxilina A (Romero, 1970; Ortega, Romero y Diaz, 1975; Romo de Vivar, 1985).

Del aceite esencial se aislaron principalmente nerolidol, cariofileno y epoxicariofileno - el aldehído y la cetona del epoxicariofileno - (Pastelin, 1972).

En la raíz se encontraron 2 tipos de compuestos; por un lado un alcaloide pirrólico: la senecionina y por el otro un sesquiterpeno del tipo de los furanoeremofilanos que se identificó como euriopsol (Ortega, Romero y Diaz, 1975).



Praecoxilina A

4. EVALUACION ECOLOGICA Y QUIMICA.

Como trabajo previo con el objeto de conocer algunas características químicas y ecológicas del *S. praecox*, se realizó un análisis preliminar de los metabolitos secundarios de las hojas de una población de dicha especie y su relación con la perforación natural.

El análisis constó de 3 partes:

- Elección y marcaje de la población a estudiar.
- Evaluación ecológica de la población.
- Evaluación química de la misma.

Obteniéndose los siguientes resultados:

Zona de trabajo: Area oriente de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Angel.

- Criterios de elección :
- i) que los organismos fueran individuos jóvenes de Senecio brasiliensis.
 - ii) que tuvieran una sola rama y un solo fascículo.
 - iii) que no presentaran ningún tipo de daño evidente.

EVALUACION ECOLOGICA

Parámetro Estimado	\bar{x}	s^2	β
No. hojas/árbol	19.368	48.468	0.733
Area total/hoja	26.704 cm ²	35.88	0.804
Area perforada/hoja naturalmente	1.376 cm ²	1.969	0.0423
Porcentaje de área foliar perforada naturalmente	0.091% 0.1%	6.3×10^{-3}	7.562×10^{-3}
No. Hojas perforadas/árbol	4	12.33	0.37
Porcentaje hojas perforadas naturalmente/árbol	0.210% 20%	0.020	7.4×10^{-3}

\bar{x} = media
 s^2

S = desviación estandar

β = error asociado

EVALUACION QUIMICA

Sistema de Extracción: MeOH en frío.

Sistema Cromatográfico: Placa fina de Gel de Sílice, acetona-
ótimo MeOH 5:5.

Tiempo máximo de almacenamiento del extracto: Por lo menos 30 días.

Velocidad de Respuesta: 1 hora después de la perforación.

DETERMINACION DE METABOLITOS SECUNDARIOS

PRUEBA	EXTRACTO I	EXTRACTO II
Alcaloides en agua clorhidrica: Reactivo Dragendorff	-	-
Acido Silicot6ngstico	-	-
Fenoles (FeCl3)	+	+++
Flavonoides (Shinoda)	++	+++
Terpenos-Esteroides (Liebermann-Burchard)	+++	+
Glic6sidos (M6lisch)	+	++
Saponinas	Insoluble en agua	No produce espuma

Nota: Las + indican la presencia del metabolito secundario correspondiente; el n6mero de cruces indican la intensidad de la coloraci6n obtenida.

Las 2 fracciones pertenecen al mismo extracto, solo que durante el secado a presi6n reducida se separ6 en 2 partes, que presentaban características físicas diferentes.

MATERIAL Y METODO

1. DISEÑO ESTADISTICO

a) HIPOTESIS

Las hipótesis de trabajo son:

i) La perforación foliar (PF) provocará CCMS. Los CCMS provocados dependerá del tipo de PF efectuada, i.e. los CCMS serán diferentes para la PFP, PFR y PFN (Perforación foliar natural).

ii) El CCMS será una respuesta general y no local aunque diferente según la clase de hoja, i.e. el CCMS se dará tanto en hojas perforadas como en las no perforadas.

iii) El CCMS será diferente dependiendo del tiempo transcurrido desde el momento en que se haga el daño.

Se tradujeron en las siguientes hipótesis estadísticas:

i e ii) $H_0: 0 = F_i = F_{i'}$ para toda i e i'

$H_a: F_i \neq 0$ al menos para una i

donde: $i, i' = 1, 2, \dots, 7$

$i \neq i'$

F se refiere al efecto del factor formado por la combinación de tipo de daño y clase de hoja según la Tabla I.

iii) $H_0: T_j = T_{j'} = 0$ para toda j y toda j'

$H_a: T_j \neq 0$ al menos para una j

donde: $j, j' = 1, 2, \dots, 4$

$j \neq j'$

T se refiere al efecto del factor tiempo según la Tabla II.

TABLA I Combinaciones del Tipo de Daño - Clase de Hoja (FACTOR F).

Tipo de daño	Ausente (testigo)	Natural (PFN)*	Puntual (PPF)*	Recurrente (PFR)*
Clase de hoja				
Perforada (HP)*		F 2	F 4	F 6
No Perforada (HNP)*	F 1	F 3	F 5	F 7

* Las siglas entre paréntesis indica como se asigna cada tratamiento en el texto.

TABLA II Niveles del Tiempo (FACTOR T)

Tiempo transcurrido desde la perforación (h)	Asignación en el texto
1	T 1
3	T 2
7	T 3
23	T 4

b) MODELO ESTADISTICO

Para probar las hipótesis antes indicadas se planteo el siguiente modelo estadístico lineal:

$$\begin{aligned} \text{CCMS}_{ijkl} = & \overline{\text{CCMS}} + F_i + T_j + H_{ki} + (FT)_{ij} + (TH)_{jk(i)} \\ & + e_{(ijk)l} \quad \begin{array}{l} i = 1, 2 \dots 7 \\ j = 1, 2 \dots 4 \\ k = 1, 2 \dots 4 \\ l = 1, 2, 3. \end{array} \end{aligned}$$

Donde:

*
CCMS_{ijkl}: es el CCMS asociado al nivel i del factor "F", el nivel j del factor "T" y al nivel k del factor "H" para la l-ésima repetición.

$\overline{\text{CCMS}}$: es la media general.

F_i: es el efecto del i-ésimo nivel del factor "F". El factor "F" se refiere a combinaciones de tipo de daño - clase de hoja según la Tabla I.

T_j: se refiere al j-ésimo nivel del factor "T". El factor "T" es el tiempo según indica la Tabla II.

H_{k(i)}: hace referencia al efecto del k-ésimo nivel factor "H" anidado en el nivel i del factor "F". El factor "H" indica las hojas elegidas al azar dentro de cada árbol.

(FT)_{ij}: es el efecto de la interacción del i-ésimo nivel del factor "F" con el nivel j-ésimo del factor "T".

(TH)_{jk(i)}: hace referencia al efecto de la interacción de los niveles j y k anidado en (i) de los factores "T" y "H" respectivamente.

$e_{(ijk)l}$: es el término del error aleatorio asociado a los niveles i, j, k de los factores "F", "T" y "H" en la l -ésima repetición.

* El cálculo de los CCMS se realizó según como se indica en el Apéndice 1.

c) SUPUESTOS DEL MODELO

Los supuestos del modelo son:

i) F y T son factores de efectos fijos; como los efectos de los tratamientos se definen como desviaciones respecto a la media entonces:

$$\sum_{i=1}^7 F_i = 0 \quad \sum_{j=1}^4 T_j = 0 \quad \sum_{i=1}^7 \sum_{j=1}^4 (FT)_{ij} = 0$$

ii) H (hoja muestreada) es factor de efectos aleatorios.

iii) $\sum e_{(ijk)l} \sim NID(0, \sigma^2)$

d) DISEÑO DE TRATAMIENTOS

El modelo de tratamientos se planteo de acuerdo a lo indicado en la tabla III:

TABLA III

		FACTOR "F"																													
		1				2				3				4				5				6				7					
Factor "H"	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3
Factor "T"	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3
	1																														
	2																														
	3																														
	4																														

Donde cada celda representa el tratamiento formado por los niveles i, j y k de los factores F, T y H para la l -ésima repetición y los números dentro de las celdas se refieren a los niveles correspondientes de dichos factores para un determinado tratamiento.

e) ANÁLISIS DE VARIANZA

Posteriormente se desarrolló un análisis de varianza (ANOVA), de los índices de diferencia (ID) obtenidos según se indica en el Apéndice 1. Este análisis se realizó utilizando el paquete BMDP VB. El programa para el paquete, así como los datos capturados se encuentran en el Apéndice 2.

f) ANÁLISIS DE RESIDUALES.

Con los datos de la tabla VII se efectuó un análisis de residuales a fin de comprobar si se cumplían los supuestos del modelo (ver Apéndice 3).

g) DIFERENCIAS MINIMAS SIGNIFICATIVAS.

Con los resultados del ANOVA fueron calculadas, mediante la prueba de Dunnett, las diferencias mínimas significativas para comprobar las medias de los tratamientos y poder conocer cuales habían tenido efecto (ver Apéndice 4).

2. TRABAJO DE CAMPO.

El trabajo de campo se llevó a cabo en la zona oriente de la Reserva Ecológica del Pedregal; durante los meses de mayo y junio de 1989. La población de estudio se restringió a individuos que presentaran las siguientes características:

i) Que en promedio tuvieran 20 hojas cuya Area foliar promedio fuera 26.7 cm².

ii) Que tuvieran una sola rama y un solo fascículo.

iii) Que no mostraran daño evidente (excepto los individuos usados para F₂ y F₃).

a) FORMACION DE LOTES EXPERIMENTALES.

Para poder efectuar los tratamientos se eligieron y marcaron al azar 16 Árboles para cada repetición (haciendo un total de 48 árboles de las 3 repeticiones), de los cuales 4 presentaban daño natural y el resto no estaban dañados. El marcaje se realizó de acuerdo a lo indicado en la Tabla IV.

TABLA IV Asignación de Lotes Experimentales.

FACTOR "T"	FACTOR "F"						
	1	2	3	4	5	6	7
1	1T	1PFN		1PFP		1PFR	
2	2T	2PFN		2PFP		2PFR	
3	3T	3PFN		3PFP		3PFR	
4	4T	4PFN		4PFP		4PFR	

NOTA.- Las abreviaturas corresponden a lo siguiente:

T = lote testigo PFN = perforación foliar natural

PFP = perforación foliar puntual.

PFR = perforación foliar recurrente.

b) TRATAMIENTOS

Para todos los tratamientos el nivel máximo que se quería alcanzar era perforar el 20% de hojas en un 0.1% de su área foliar (lo que equivale a 4 hojas perforadas en 1 cm² de su área).

TABLA V Nivel de Daño de los Lotes Experimentales
(PPF y PFR)

DAÑO PUNTUAL (PPF)					DAÑO RECURRENTE (PFR)				
Tiempo	Condición de Individuos				Tiempo	Condición de individuos			
0	DT	DT	DT	DT	0	1/4DT	1/4DT	1/4DT	1/4DT
1	DT	DT	DT	DI	1	2/4DT	2/4DT	2/4DT	1/4DI
2	DT	DT	DI		2	3/4DT	3/4DT	2/4DT	
3	DT	DI			3	4/4DT	3/4DT		
4	DI				4	4/4DI			

DT Daño máximo
DI Arbol colectado.

Tal como se observa en la Tabla V, en el tiempo "cero" se efectuó el máximo nivel de daño en los árboles del PPF y no se volvieron a dañar durante el resto del experimento.

Por otro lado, en los árboles de PFR solo se realizó una cuarta parte del nivel máximo de daño en el tiempo "cero" y esto se repitió en los tiempos 1, 2 y 3 subsiguientes a la primera perforación, alcanzándose así el nivel máximo de daño en el tiempo 3.

Ni los árboles testigo, ni los de PFN fueron dañados durante el desarrollo del experimento.

c) MUESTREO

Con ayuda de un perforador de papel se tomaron muestras de 1 cm² de hoja y se colocaron, por separado, para su extracción en frascos con 1 ml de metanol, los cuales habían sido previamente etiquetados. Las muestras se tomaron de la siguiente manera:

En todos los casos para cada tiempo, se eligió al azar un individuo del cual se tomaron 8 muestras: 4 correspondientes a las hojas perforadas y 4 a las hojas no perforadas, la excepción fueron árboles testigo en los cuales, por no existir hojas perforadas, solo se obtuvieron las muestras correspondientes a las hojas no perforadas.

Una vez muestreado un árbol, este salía del experimento.

2. TRABAJO DE LABORATORIO

a) EXTRACCION

Las muestras colectadas en el campo se trasladaron al laboratorio donde continuaron extrayéndose en MeOH frío hasta completar 24 horas. Una vez transcurrido este lapso se maceraron y se decantaron los extractos.

b) CROMATOGRAFIA.

Los extractos se cromatografiaron en capa fina sobre placas de gel de Sílice 60 F2 54 previamente activadas durante 1 hora a 110 grados centígrados. El sistema de eluyentes que se utilizó fué acetona-MeOH 5:5. La cámara cromatográfica de 5 litros se dejó estabilizar 2 min con 100 ml del eluyente y con la ayuda de papel filtro que cubría una de las paredes. En cada placa de 5 x

20 cm se aplicaron 5 microlitros de 17 muestras elegidas al azar y se dejaron correr con un frente de 4 cm.

Una vez que estuvieron secas se observaron con luz U.V. y se revelaron con sulfato cérico.

c) PRUEBAS COLORIDAS Y DE PRECIPITACION.

De acuerdo a lo observado en las placas cromatográficas se reunieron las muestras que presentaron perfiles iguales. A cada uno de estos extractos se les hicieron las pruebas coloridas y de precipitación que se utilizan normalmente para detectar la presencia de metabolitos secundarios (ver Apéndice 5).

RESULTADOS

a) Cromatografía en Capa Fina.

Con base en la metodología propuesta se obtuvieron los cromatogramas de cada una de las muestras. Se calcularon los R_f de las manchas observadas en los cromatogramas y se elaboró una Tabla (Tabla VI) en la que se indica la presencia o ausencia de las manchas de cada cromatograma. En esta tabla el arreglo de los patrones cromatográficos depende del grupo de tratamiento al que pertenecen.

b) Índice de Diferencia.

Con estos datos se calculó el índice de diferencia (ver Apéndice 1) de cada uno de los patrones cromatográficos; los ID se muestran en la Tabla VII.

c) Análisis de Varianza (Anova) .

Los valores de los ID así obtenidos son los que se utilizaron para realizar el análisis de varianza (ver Tabla VIII).

d) Diferencias Mínimas Significativas.

En la tabla IX se muestran los resultados de la prueba de Duncan y del cálculo de los residuales (ver Apéndices 3 y 4 respectivamente).

e) Pruebas Coloridas y de Precipitación.

La Tabla X muestra los resultados de las pruebas coloridas y de precipitación efectuadas a las muestras que presentaban cromatogramas iguales.

TABLA VI Datos Cromatográficos.

		FACTOR "F"												1era. Repetición																			
		1				2				3				4				5				6				7							
FACTOR H		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
FACTOR T																																	
T	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Rf	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rf	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
Rf	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+
Rf	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

NOTA: + indica presencia del compuesto.
 - indica ausencia del compuesto.

Rf1 = 0

Rf2 = 0.55

Rf3 = 0.85

Rf4 = 0.95

TABLA VI

CONTINUACION

		FACTOR "F"												2a. Repetición																			
		1				2				3				4				5				6				7							
FACTOR H		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4				
FACTOR T																																	
T	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
1	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+				
Rf	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
T	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
2	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	2	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+				
Rf	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
T	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
3	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Rf	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
T	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
4	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	2	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Rf	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				

TABLA VI

CONTINUACION

		FACTOR				"F"				3ra. Repetición							
		1		2		3		4		5		6		7			
FACTOR H		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
FACTOR T																	
T	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
Rf	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Rf	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
Rf	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
Rf	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABLA VII Tabla de Indices de Diferencia.

		FACTOR "F"																															
		1				2				3				4				5				6				7							
FACTOR H		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1a. Repetición																																	
FACTOR T																																	
1		0	0	0	0	0	7	7	7	0	0	0	0	0	7	7	7	7	0	0	0	0	7	7	7	0	7	7	7	0	7	7	0
2		6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3		1	1	6	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	6	1	6	6	1	6	1
4		6	1	1	1	6	1	1	1	1	1	1	1	6	1	1	6	1	6	1	6	1	6	1	6	1	6	6	1	1	6	1	6
2a. Repetición																																	
1		0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0
2		2	5	2	5	5	2	2	5	5	2	5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	5	2	2	5	2	5	2	5	2	2	2	2
3		0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4		1	1	6	1	1	6	4	1	1	1	1	1	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3a. Repetición																																	
1		1	6	1	1	6	6	6	1	6	1	6	6	1	1	1	1	1	6	1	6	1	1	1	6	1	1	1	6	1	6	1	6
2		4	4	4	3	3	3	3	3	4	3	3	3	3	3	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
3		1	1	6	1	1	1	6	1	1	1	6	1	1	1	6	1	1	1	1	1	1	1	1	6	6	1	6	6	1	6	1	6
4		2	2	5	5	5	2	2	2	2	5	5	5	5	2	5	2	2	2	2	2	5	2	5	2	5	2	2	2	2	2	2	2

NOTA Los números en la tabla se pusieron para facilitar el manejo de los datos; las cifras que corresponden a cada número son las siguientes:

- | | |
|------------|-------------|
| 0 = 0.0000 | 4 = -0.0625 |
| 1 = 0.0625 | 5 = -0.1250 |
| 2 = 0.1250 | 6 = -0.1875 |
| 3 = 0.1875 | 7 = -0.2500 |

TABLA VIII Análisis de Varianza.

Análisis de Varianza para la variable dependiente 1.

FUENTE	TERMINO DEL ERROR	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	MEDIA AL CUADRADO	F	PROB
1 Media	h (f)	0.0205078	1	0.020508	3.01	0.0972
2 f	h (f)	0.0957031	6	0.015951	2.34	0.0686
3 t	th (f)	0.7646484	3	0.254883	24.80	0.0000
4 h(f)	r (fth)	0.1429036	21	0.006805	0.57	0.9365
5 ft	th (f)	0.2558594	18	0.014214	1.38	0.1718
6 th(f)	r (fth)	0.6474609	63	0.010277	0.86	0.7604
7 r(fth)		2.6822917	224	0.011975		

G.L. = Grados de libertad

F = Prueba de F

PROB = probabilidad

TABLA IX Residuales.

		FACTOR "F"															
		1				2				3							
FACTOR H		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	
1a. Repetición																	
FACTOR T		\bar{X}_1				\bar{X}_2				\bar{X}_3							
1		0	0	0	0	8	17	17	17	1	1	1	1	11	20	20	20
2		21	4	4	4	11	11	11	11	5	0	0	0	4	11	26	11
3		4	4	4	21	0	20	5	5	5	11	2	2	2	1	4	4
4		21	4	4	4	0	3	22	3	3	27	2	2	2	1	20	5
2a. Repetición																	
1		0	0	0	0	8	8	8	17	17	1	1	1	1	11	5	5
2		8	17	8	17	0	2	23	23	2	5	4	4	21	21	4	2
3		0	0	0	0	0	24	1	1	1	11	11	11	11	11	1	0
4		4	4	4	21	0	3	3	22	14	27	2	2	2	1	5	19
3a. Repetición																	
1		4	21	4	4	0	10	13	13	13	17	5	20	5	20	11	16
2		13	13	13	10	0	6	6	6	6	5	8	17	8	8	4	6
3		4	4	21	4	0	5	5	20	5	11	2	2	2	23	1	4
4		8	8	17	17	0	18	7	7	7	27	6	19	19	19	1	16

NOTA Los números en la tabla se pusieron para facilitar el manejo de los datos; las cifras que corresponden a cada número son las siguientes:

\bar{X}_i = promedio

0 = 0.000	9 = 58.33	18 = -54.16
1 = 8.330	10 = 75.00	19 = -58.33
2 = 16.67	11 = -8.33	20 = -66.67
3 = 20.84	12 = -16.67	21 = -75.00
4 = 25.00	13 = -25.00	22 = -79.16
5 = 33.33	14 = -29.16	23 = -83.33
6 = 41.67	15 = -33.33	24 = -91.67
7 = 45.84	16 = -41.67	25 = -100.00
8 = 50.00	17 = -50.00	26 = -108.33
		27 = 4.16

TABLA IX

..... Continuación.

	5					6				7						
FACTOR H	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
FACTOR T	X4	$\bar{X}5$					$\bar{X}6$				$\bar{X}7$					
1a. Repetición																
1	20 15	24	1	1	1	11	20	20	5	20	15	20	20	5	20	15
2	11 5	12	12	12	12	6	12	12	12	12	6	11	11	11	11	5
3	4 0	1	1	1	1	2	4	4	4	21	0	6	19	19	6	12
4	20 11	1	24	1	1	2	21	4	21	21	0	0	0	25	0	4
2a. Repetición																
1	5 15	1	1	1	1	11	5	5	5	20	15	5	5	5	5	15
2	2 5	1	1	1	1	6	1	24	1	1	6	23	23	2	2	5
3	0 0	12	12	12	12	2	0	0	0	0	0	2	2	2	2	12
4	5 11	1	1	1	1	2	4	4	4	4	0	0	0	0	0	4
3a. Repetición																
1	9 15	5	5	5	20	11	9	16	9	9	15	9	16	9	16	15
2	6 5	20	5	5	5	6	5	5	5	5	6	6	6	6	6	5
3	21 0	1	1	1	1	2	4	4	4	21	0	19	6	19	6	12
4	9 11	5	5	5	20	2	8	17	8	8	0	4	4	4	4	4

TABLA X Pruebas Coloridas y de Precipitación.

PRUEBA	MUESTRA I‡	MUESTRA II‡
Alcaloides:		
Reactivo Dragendorff	--	--
Acido Silicotungstico	--	--
Fenoles (FeCl ₃)	+++	++
Flavonoides (Shinoda)	+++	+
Terpenos - Esteroides (Liebermann-Burchard)	+++	++
Glicósidos (Möblich)	-	-
Taninos	-	-

NOTA: Las + indican la presencia del metabolito secundario correspondiente; el número de cruces indica la intensidad de la coloración obtenida.

‡ La muestra I la conforman todas aquellas muestras originales que presentaban todas las manchas de los Rf's posibles.

La muestra II la conforman todas las muestras originales que carecen de la mancha con Rf 0.55.

ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSION

De la observación de los cromatogramas se desprende que las diferencias entre los patrones cromatográficos de las muestras siempre se debieron a la presencia o ausencia de la mancha con R_f 0.55, sin embargo, la Tabla VI revela que la ausencia de dicha mancha no es exclusiva para los cromatogramas correspondientes a las hojas de alguno de los tratamientos estudiados, es decir, parece que la ausencia de la mancha no es efecto de los tratamientos.

De la Tabla VII se infiere que dado que los ID para FI no son todos cero y no muestran ser muy distintos a los de los otros tratamientos, existe una variación entre las hojas de los árboles testigo y esta es similar a la que se presenta en los árboles experimentales. Esto es, la ausencia de la mancha con el R_f 0.55 no parece ser efecto de los tratamientos. Esta tabla también revela como, independientemente del tratamiento, existe una fuerte influencia del tiempo en la variación del CMS en las hojas, ya que los ID para cada tiempo, dentro de cada repetición, suelen ser muy similares entre si para todas las F's.

Los resultados obtenidos del ANOVA (Tabla VIII) confirman lo dicho anteriormente, al indicar que el tiempo es un factor altamente significativo ($P=0.0000$) y que la interacción Tiempo-Factor "F" no es significativa ($P=0.1718$). Sin embargo, el ANOVA muestra que el Factor "F" es significativo para una $P=0.06886$, lo cual no es fácil de deducir de la simple observación de la Tabla de ID.

Para verificar la validez del uso del ANOVA y las interpretaciones que de él se desprenden se realizó el análisis de residuales y las sumas de los efectos de los niveles de los factores que permiten detectar violaciones a los supuestos del modelo probabilístico lineal propuesto para el ANOVA.

Tal como se indicó en la metodología, el modelo del ANOVA supone que los residuales presentan independencia, homoscedasticidad y normalidad.

INDEPENDENCIA

Por lo que respecta a la independencia, la Gráfica 2 muestra como la varianza de los residuales es similar entre los tiempos (ver Gráfica 2), lo cual se confirmó mediante la prueba de Bartlett. Esto demuestra que hay independencia entre los residuales.

HOMOSCEDASTICIDAD

La homoscedasticidad se demostró mediante las Gráficas 1 y 3 y sus respectivas pruebas de igualdad de varianzas. La Gráfica 2 y su prueba asociada también confirman este supuesto.

NORMALIDAD

Para comprobar la normalidad se utilizó el método gráfico de frecuencias acumuladas vs \sum_{ijkl}^2 (ver Gráfica 4 y Cuadro 1) y la prueba estadística de X^2 (ver Cuadro 2). Como puede observarse en la Gráfica 4 los datos no se ajustan perfectamente a una recta como lo harían normalmente, sin embargo, se distribuyen a los lados de la misma. Cabe aclarar que en la interpretación de este tipo de gráficas los datos centrales cobran mayor importancia que

los de los extremos.

Por otro lado la prueba de X^2 permite que no se rechace la hipótesis nula (H_0) solamente a un nivel de significancia (α) de 0.001, en otras palabras, existe una alta probabilidad de cometer un error de tipo II. Es conveniente puntualizar que: debido a que las muestras nunca son exactamente las mismas que las funciones de distribución hipotéticas, en muestras suficientemente grandes, cualquier prueba de bondad de ajuste rechazará H_0 . Por esta razón X^2 es usada frecuentemente como una medida de bondad de ajuste (Conover, 1980).

Por lo que respecta a los supuestos sobre los efectos de los factores, de las tablas de desviaciones respecto a la media, se desprende que las sumatorias de los niveles para los factores F, T y FT, son CERO.

Con base en todo lo anterior, se considera como válido el ANOVA y los resultados que de él se desprendan debido a que no se pudo detectar ninguna violación grave a los supuestos del modelo propuesto. Aún cuando no se cumpliera el supuesto de normalidad, las inferencias hechas a partir del ANOVA son válidas dado que: "Para modelos de efectos fijos la carencia de normalidad no es importante ... Los estimadores de las medias de los niveles de los factores y los contrastes son insesgados si las poblaciones son normales o no. Así también, la prueba de F para la igualdad de las medias de los niveles de factores, es poco afectada por la falta de normalidad, tanto en términos de los niveles de significancia como en el poder de la prueba. De esta manera, la prueba de F es robusta frente a discrepancias respecto a la

normalidad" (Neter and Wassermann, 1974 en Conover, 1980).

En relación a la prueba de Duncan para F mostrada en el cuadro 3 se puede observar que el único tratamiento que dió una diferencia significativa fué el F5. Por lo que respecta a las comparaciones hechas para T (ver cuadro 4) las respuestas para los tiempos 3 y 4 no mostraron ser significativamente diferentes en tanto que sí lo fueron respecto a los tiempos 1 y 2, los cuales a su vez fueron distintos entre sí.

Al calcular los errores estandar para la diferencia entre las medias se obtuvieron valores muy cercanos a los de las diferencias mínimas significativas de la prueba de Duncan (0.017 y 0.012 para los factores "F" y "T" respectivamente). Al graficar los valores medios de los ID para las F's y T's se confirman los resultados de la prueba de Duncan. Para F sólo F5 cae fuera de la banda de 2 errores estandar; para T, T1 cae por abajo y T2 por arriba de la respectiva banda (ver gráficas 5 y 6).

Notese que la mayor diferencia significativa para ambas pruebas fue de 0.040, lo cual en términos de porcentaje de hojas equivale al 16%. Cabe aclarar que para este trabajo en particular existe un factor de conversión que permite transformar los valores de ID en porcentaje de hojas por árbol diferentes a la del testigo, dicho factor es igual a 400.

Fenomenológicamente esto significa que hay una inducción de la producción de la sustancia (s) responsable de la mancha con Rf 0.55 cm en las hojas no perforadas de los árboles con daño puntual. En tanto que las perforaciones natural y recurrente no

provocaron cambio significativo ni en las hojas perforadas, ni en las hojas no perforadas. Es decir, para provocar la aparición de la sustancia se requiere que el daño se aplique en una sola dosis ya que para el nivel de daño utilizado, si se aplica en dosis pequeñas, varias veces, la sustancia en cuestión no aparece. La respuesta se observó sólo en las hojas que no fueron perforadas, lo cual significa que el árbol respondió como una unidad y que el CCMS no fué una respuesta localizada y exclusiva de las hojas dañadas.

Por lo que se refiere al tiempo, es claro que para la 1a. hora después de la perforación el porcentaje de hojas de los grupos experimentales que presentan la sustancia responsable de CCMS disminuye respecto al del testigo y que 3 h después de efectuadas las primeras perforaciones esta tendencia se revierte, existiendo un 29.76% más de hojas con la sustancia en cuestión dentro de los grupos experimentales. Finalmente el equilibrio se reestablece de manera que para las 7 y 23 h posteriores a la 1a. perforación encontramos igual porcentaje de hojas con la sustancia responsable del CCMS en los experimentales como en los testigos.

TABLA XI Frecuencia de Residuales con Respecto a CCMSij...

aijki	-50	-33.33	-16.66	-8.33	0	4.16	8.33	16.66	25	33.33	41.66
-108.33										1	
-100								1			
-91.67				2				1			1
-83.33							1			5	
-79.16						2					
-75						13			2		
-66.67		11		8				1			1
-58.33			4				3				
-54.16						1					
-50	4				5				1		
-41.67		4		2							
-29.16						1					
-25	3				3						
-16.67								4			8
-8.33							4			11	
0					20				11		
8.33					18			15			7
16.67			4					15		7	
20.84						5					
25						35			6		
33.33		13		16				3			7
41.67			4					1		12	
45.84							3				
50	4				7				3		
58.33		8		2							
75	1				1						

	-50	-33.33	-16.66	-8.33	0
x	0	2.4×10^{-3}	3.3×10^{-3}	-3.3×10^{-3}	0
σ	47.9	52.04	42.49	41.25	39.72
σ^2	2291.7	2708.2	1805.5	1701.4	1577.4
n	12	36	12	48	84

CONTINUACION...

	4.16	8.33	16.66	25	33.33	41.66
x	6.7×10^{-3}	33×10^{-3}	3.3×10^{-3}	0	3.3×10^{-3}	-3.3×10^{-3}
σ	45.45	31.18	27.64	38.2	44.09	31.18
σ^2	2065.6	972.2	763.9	1458.3	1944.4	972.2
n	12	24	24	24	36	24

PRUEBA DE BARTLETT

σ_{ijkl} vs σ_{CDSij}

2

$$B_p = 1653.3956$$

$$q = 7.56$$

$$C = 1.0178009$$

2

$$X_0 = 17.10$$

2

$$X(10, 0.025) = 20.48$$

2

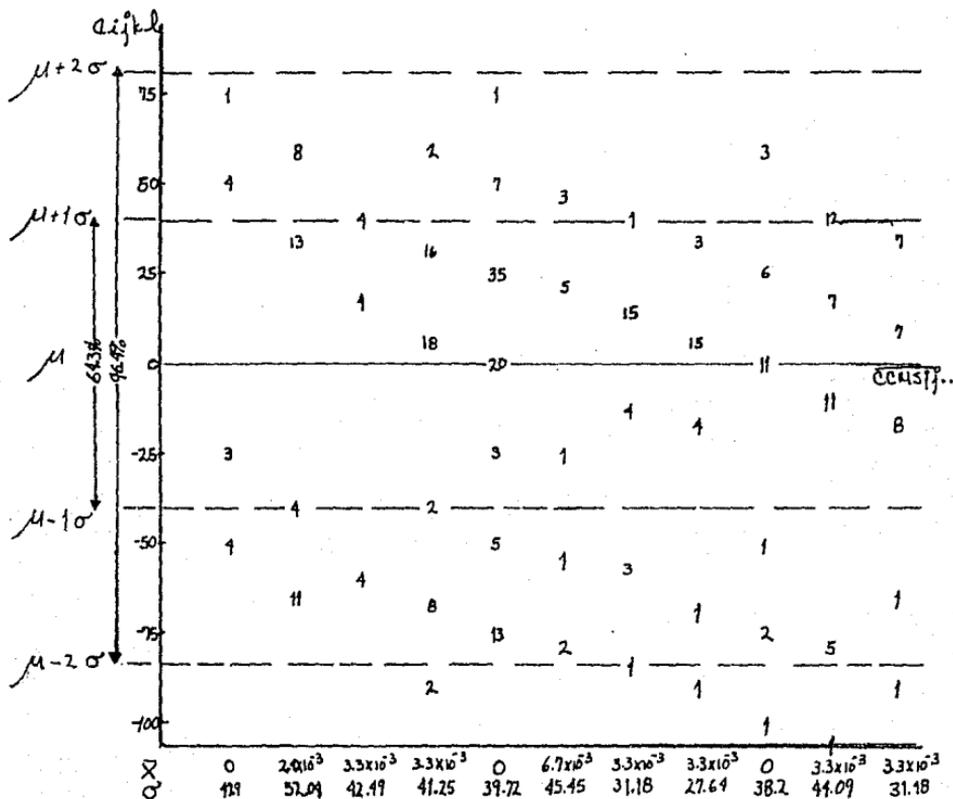
$$X(10, 0.05) = 18.31$$

2

$$X_0 < X(10, 0.05) \dots \text{No se rechaza } H_0.$$

NOTA Los datos contenidos en esta tabla son los que se utilizan para construir la Gráfica 1.

GRAFICA 1 Frecuencia de Residuales vs CCMBIJ..



Gráfica para demostrar homocedasticidad. El cuerpo de la Gráfica indica la frecuencia con que se presenta el residual correspondiente.

μ corresponde a la media

σ corresponde a la desviación estándar.

(Ver Tabla XI).

En el rango de $(\mu + 1\sigma) - (\mu - 1\sigma)$ se encuentran el 64.3% de los errores.

En el rango de $(\mu + 2\sigma) - (\mu - 2\sigma)$ se encuentran el 96.4% de los errores.

TABLA XII Frecuencias de Residuales con Respecto al Tiempo.

z_{ijkl}	T 1	T 2	T 3	T 4
75	1	1	0	0
70.83	0	0	0	0
58.33	8	0	0	2
50	4	5		5
45.83				3
41.66		12	4	1
33.33	18	7	6	8
25	3	5	18	15
20.83				5
16.67		7	11	8
8.33	15	7	11	7
0	8	4	12	7
-8.33		11	4	
-16.67		8	4	
-25	3	3		
-29.16				1
-41.67	4			2
-50	4	3		3
-54.16				1
-58.33			4	3
-66.66	14	1	2	4
-75	1	3	6	5
-79.16				2
-83.33		5	1	

continuación....

a_{ijkl}	T 1	T 2	T 3	T 4
-91.66	1	1	1	1
-100				1
-108.33		1		

$\bar{X} = 0.05$	$\bar{X} = 5.9 \times 10^{-4}$	$\bar{X} = 9.52 \times 10^{-4}$	$\bar{X} = 7.14 \times 10^{-4}$
$\sigma = 43.81$	$\sigma = 40.94$	$\sigma = 34.78$	$\sigma = 42.57$

PRUEBA DE BARTLETT

a_{ijkl} vs T

$$S_p^2 = 1654.3075$$

$$q = 2.86$$

$$c = 1.004016$$

$$X_0 = 6.55$$

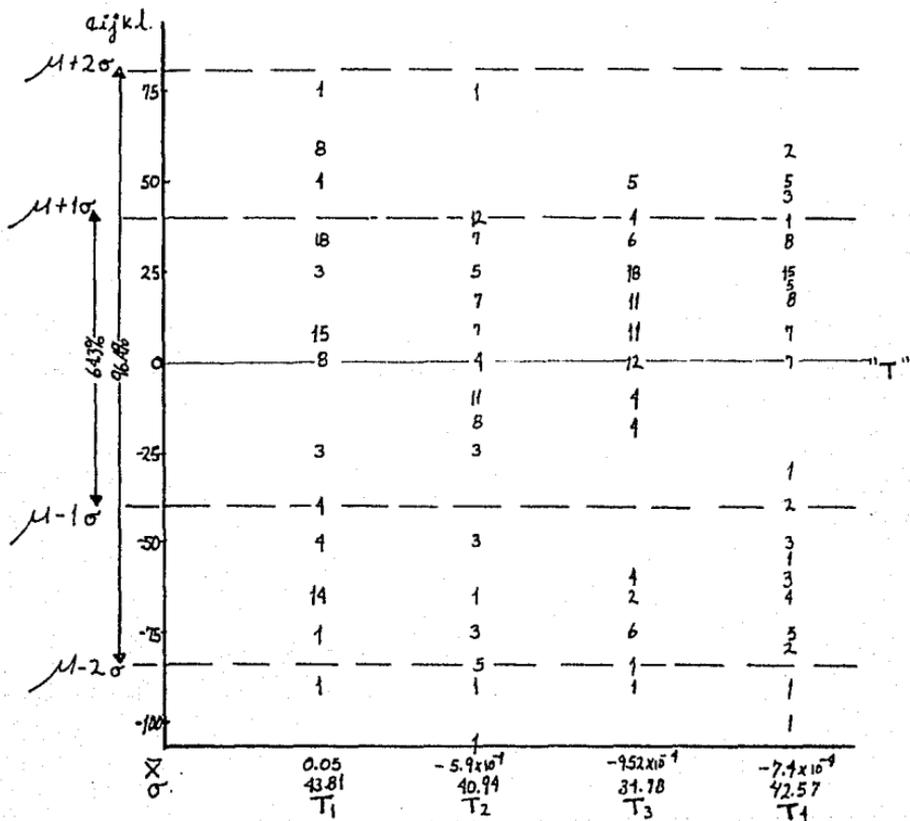
$$X^2(3, 0.025) = 9.35$$

$$X^2(3, 0.05) = 7.81$$

$$X_0 < X^2(3, 0.05) \therefore \text{No se rechaza } H_0.$$

NOTA Los datos contenidos en esta tabla son los que se utilizan en la Gráfica 2.

GRAFICA 2 Frecuencia de Residuales vs Tiempo.



Gráfica para demostrar la independencia de los residuales. El cuerpo de la gráfica indica la frecuencia con que se presenta el residual correspondiente (ver Tabla XII).

μ corresponde a la media.

σ corresponde a la desviación estándar.

En el rango de $(\mu + 1\sigma) - (\mu - 1\sigma)$ se encuentran el 64.3% de los errores.

En el rango de $(\mu + 2\sigma) - (\mu - 2\sigma)$ se encuentran el 96.4% de los errores.

TABLA XIII Frecuencias de Residuales con respecto a F

z_{ijkl}	F 1	F 2	F 3	F 4	F 5	F 6	F 7
75	1	1					
70.83							
58.83				5		3	2
50	4	4	3			3	
45.83		3					
41.67		4	1	4			8
33.33		6	2	9	9	8	5
25	18		2	6		11	4
20.83		5					
16.67		2	15	3			6
8.33		3	8		26	3	
0	12		4	4		4	7
-8.33		4	4	3			4
-16.67					8	4	
-25	3	3					
-29.16		1					
-41.67				3		1	2
-50	4	4	1			1	
-54.16		1					
-58.33			3				4
-66.67		2	2	7	3	4	
-75	6		2	2		5	
-79.16		2					
-83.33		2	1	1			
-91.67		1			2	1	

continuación...

-100	1
------	---

-108.33	1
---------	---

$$F \quad \bar{X} = 0.087$$
$$1 \quad \sigma = 38.7$$

$$F \quad \bar{X} = 3.125 \times 10^{-3}$$
$$2 \quad \sigma = 45.21$$

$$F \quad \bar{X} = -0.61$$
$$3 \quad \sigma = 34.5$$

$$F \quad \bar{X} = 0.0512$$
$$4 \quad \sigma = 46.83$$

$$F \quad \bar{X} = -3.33 \times 10^{-3}$$
$$5 \quad \sigma = 30.33$$

$$F \quad \bar{X} = 1.76$$
$$6 \quad \sigma = 44.10$$

$$F \quad \bar{X} = 0.02$$
$$7 \quad \sigma = 42.10$$

PRUEBA DE BARTLETT

α_{ijkl} vs F

$$Sp = 1651.72$$

$$q = 5.43$$

$$c = 1.0070922$$

$$X_0 = 12.41$$

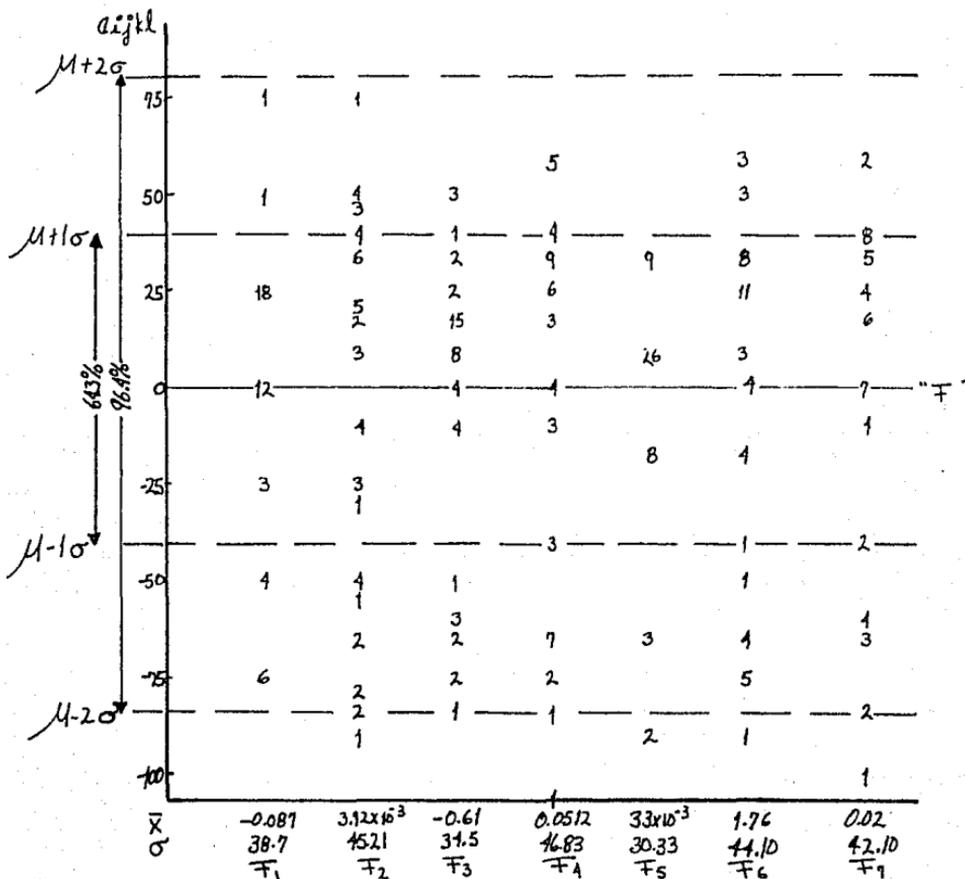
$$X(6, 0.025) = 14.45$$

$$X(6, 0.05) = 12.59$$

$$X_0 < X(6, 0.05) \therefore \text{No se rechaza } H_0.$$

NOTA Los datos contenidos en esta tabla son los que se utilizaron para construir la Gráfica 3.

GRAFICA 3 Frecuencia de residuales vs F.



Gráfica para demostrar homoscedasticidad. El cuerpo de la misma indica la frecuencia con la que se presenta el residual correspondiente (ver Tabla XIII).

μ corresponde a la media.

σ corresponde a la desviación estándar.

En el rango de $(\mu + 1\sigma) - (\mu - 1\sigma)$ se encuentran el 64.3% de los errores.

En el rango de $(\mu + 2\sigma) - (\mu - 2\sigma)$ se encuentran el 96.4% de los errores.

CUADRO 1

Z_{ijk} Residuales	ORDEN K	(K 336) 100 Frecuencias Acumuladas
- 108.33	1	0.2976
-100.00	2	0.5952
-91.67	3-6	0.8928 - 1.78
-83.33	7 - 12	2.083 -3.571
-79.16	13 - 14	3.869 - 4.166
-75	15 - 29	4.464 - 8.630
-66.67	30 - 50	8.928 - 14.880
-58.33	51 - 54	15.178 - 16.071
-54.16	55 - 58	16.369 - 17.261
-50.00	59 - 68	17.559 - 20.238
-41.67	69 - 74	20.535 - 22.023
-29.16	75	22.321
-25.00	76 - 81	22.619 - 24.107
-16.67	82 - 93	24.404 - 26.678
-8.33	94 - 108	27.976 - 32.142
0	109 - 139	32.440 - 41.369
8.33	140 - 179	41.666 - 53.273
16.67	180 - 205	53.571 - 61.011
20.84	206 - 210	61.309 - 62.5
25	211 - 251	62.797 - 74.702
33.33	252 - 290	75 - 86.309
41.67	291 - 307	86.607 - 91.369
45.84	308 - 310	91.666 - 92.261
50	311 - 324	92.559 - 96.428

58.33	325 - 334	96.726 - 99.404
75	335 - 336	99.702 - 100

CUADRO 2

PRUEBA DE χ^2
PARA
NORMALIDAD

Intervalo de Clase	f_o	f_e	$\frac{(f_o - f_e)^2}{f_e}$
-121.8 - 81.2	12	7.56	2.6
-81.2 - 40.6	62	46.9	4.9
-40.6 - 40.6	216	226.1	0.5
40.6 - 81.2	46	46.9	0.0
			$\chi^2 = 8.0$

χ^2
de tablas.

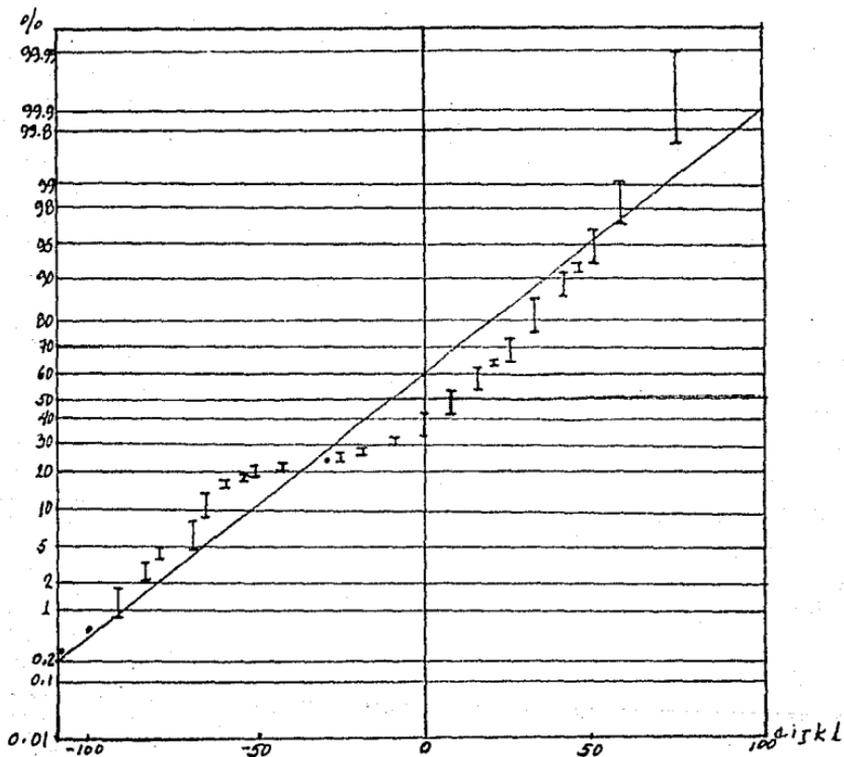
$$\chi^2 (1, 0.05) = 3.84 < \chi^2_o$$

$$\chi^2 (1, 0.005) = 7.88 < \chi^2_o$$

$$\chi^2 (1, 0.001) = 10.83 > \chi^2_o$$

NOTA: para detalles sobre el cálculo de χ^2 ver el Apéndice 3.

GRAFICA 4 Frecuencias Acumuladas vs Residuales.



Gráfica para probar la normalidad (ver Cuadro 1 y 2).

CUADRO 3

Prueba de Duncan para F.

MSE = 0.006805

N = 336

n = 48

GL = 21

1.

f2 - 0.01302
 f4 - 0.00521
 f1 0
 f6 0.00521
 f7 0.00521

2.

$\bar{S}_y = \sqrt{0.006805 / 48} = 0.0119067$

3.

r.05 (2,21*) = 2.95
 r.05 (3,21) = 3.1
 r.05 (4,21) = 3.18
 r.05 (5,21) = 3.25
 r.05 (6,21) = 3.3
 r.05 (7,21) = 3.34

* Se obtiene para 20 g.l. porque 21 no existe en tablas.

4.

$R_i = r.05 (i, 20) \cdot \bar{S}_y$

R2 = 0.035
 R3 = 0.037
 R4 = 0.038
 R5 = 0.039
 R6 = 0.039
 R7 = 0.040

5.

-----> f5 vs f4: 0.047 > 0.039
 -----> f5 vs f2: 0.05469 > 0.04
 -----> f5 vs f1: 0.04167 > 0.039
 f5 vs f6: 0.03646 < 0.038
 -----> f3 vs f2: 0.03385 < 0.039

6.

F2	F4	F1	F6	F7	F3	F5	T	NP	NNP	PP	PNP	RP	RNP
							F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
-----							0	0	0	0	F	0	0

NOTA Para detalles sobre la prueba de Duncan ver Apéndice 4.

CUADRO 4

PRUEBA DE DUNCAN PARA T

MSE = 0.010277

N = 336

n = 84

G.L. = 63

1.
 T1 - 0.05952
 T3 0.0
 T4 0.01637
 T2 0.07440

2.
 $S_y = \sqrt{0.010277 / 63} = 0.0127721$

3.
 $r_{.05}(2, 63) = 2.83$
 $r_{.05}(3, 63) = 2.98$
 $r_{.05}(4, 63) = 3.08$

* Se calcula con 60 GL porque 63 no existe en tablas.

4.
 R2 = 0.036145
 R3 = 0.030609
 R4 = 0.0393381

5.
 T2 vs T1 = 0.13392 > 0.039
 T2 vs T3 = 0.0744 > 0.038
 T2 vs T4 = 0.05803 > 0.036

6.
 I1 I3 I4 I2

..

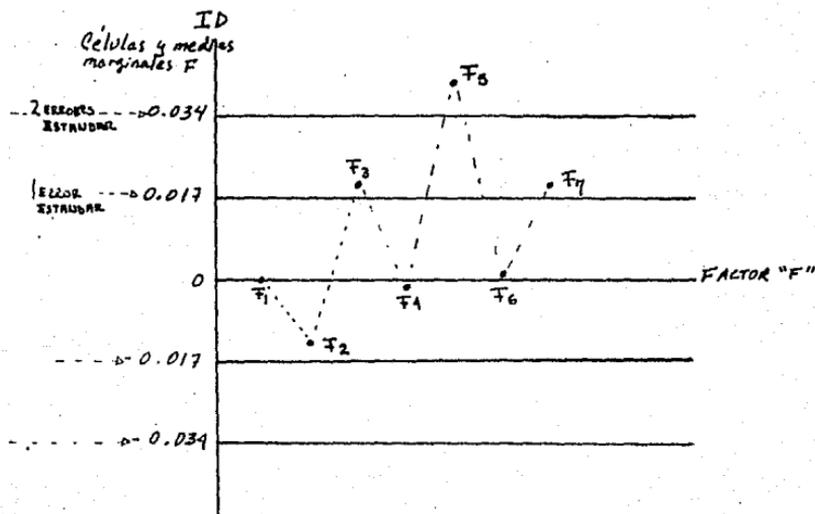
- T4 vs T1 = 0.07589 > 0.038
 T4 vs T3 = 0.01637 < 0.036

I1 I2 I3 I4
 - + 0

T3 vs T1 = 0.05952 > 0.036145

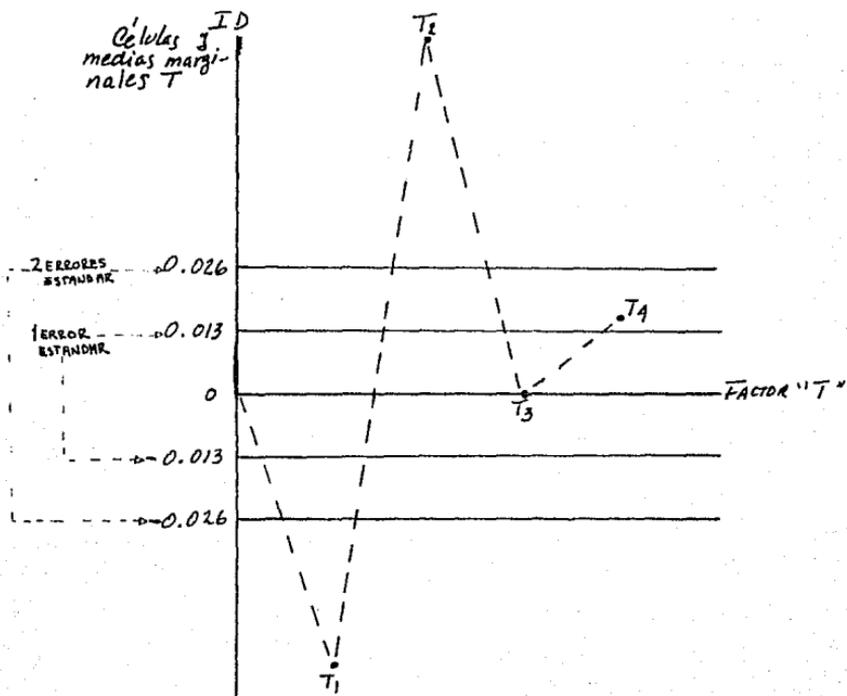
NOTA Para detalles sobre el cálculo de la prueba de Duncan ver Apéndice 4.

GRAFICA 5 Error estandar para la diferencia entre medias Factor "F".



Gráfica en la que se muestra que sólo F₅ es significativamente diferente (ver Apéndice 4).

GRAFICA 6 Error estandar para la diferencia entre medias Factor "T".



Gráfica en la que muestra que T_1 y T_2 son significativamente diferentes (ver Apéndice 4).

Resumiendo, ninguna de las hipótesis nulas se cumplió, -- para $H_0 = F_i = F_i' = 0$ para toda i e i' ; hubo que aceptar la hipótesis alternativa donde $F_5 \neq 0$. Para $H_0 = T_i = T_j' = 0$ la evidencia se inclinó a la aceptación de $H_a = T_j \neq 0$ en donde $T_1 \neq T_2 \neq 0$, esto en términos de las hipótesis de trabajo significa que:

i) La perforación foliar provoca CCMS sólo cuando el daño es puntual (F_5).

ii) El CCMS es una respuesta general y no local, produciéndose solamente en las hojas NO perforadas. El árbol responde como una unidad, ya que el CCMS se detecta en las hojas no dañadas y no en las perforadas.

iii) El CCMS es diferente dependiendo del tiempo transcurrido desde el momento en que se hace el daño. Esto solamente sucede en aquellos árboles que fueron objeto de un daño puntual; es decir que la fluctuación a través del tiempo resulta como una consecuencia del daño aplicado. Por lo tanto se puede pensar que la curva CCMS vs T podría ser un reflejo de la biosíntesis inducida por la perforación.

Al hacer la PFP el árbol probablemente consuma la sustancia de CCMS y esto podría estar provocando una baja en la concentración de dicha sustancia, lo cual activaría la maquinaria biosintética de la misma.

La sustancia se acumularía en las hojas hasta alcanzar una concentración superior a la basal que inhibiría la maquinaria antes mencionada. La demanda de la sustancia ocasionaría el descenso de su concentración hasta recuperar los niveles iniciales. El consumo de la sustancia se podría estar dando en

las hojas perforadas lo cual demandaría la movilización de la sustancia desde las hojas no dañadas hacia las perforadas, después de haber abatido los niveles normales en las hojas perforadas. Este fenómeno podría no haber sido observado por ocurrir en los minutos inmediatos a la perforación (antes de 60 min).

Si la sustancia interviniera en la defensa, la perforación representaría un estímulo para activar su síntesis y no su consumo. En consecuencia se sugiere que la sustancia podría ser responsable de un proceso de reparación, en el cual su consumo inicial sí sería lógico.

Las pruebas coloridas y de precipitación nos indican que la sustancia en cuestión puede ser un flavonoide.

Es interesante hacer notar como las respuestas que resultaron significativas tienen valores muy próximos al porcentaje de hojas que fueron dañadas (20%); y como el CCMS no fue un evento de "Todo o Nada" sino más bien "Probabilístico". En otras palabras el árbol respondió como una unidad, pero no en la misma forma en todas sus partes. Si solamente (F1) se hubiera analizado, las hojas provenientes de árboles no dañados contra hojas de árboles perforados (F2) en la naturaleza, o bien hojas perforadas (F2, F4, F6) contra hojas no perforadas (F1, F3, F5 y F7) se hubiera concluido que no existen CCMS asociado a PF.

Finalmente consideramos conveniente comentar que pese a que los tratamientos aplicados no logran simular perfectamente los mecanismos de perforación presentes en la naturaleza, la metodología propuesta nos puede ayudar a tener una mejor comprensión de la dinámica de la respuesta inducida en la planta.

CONCLUSIONES

1. Si existen cambios en el CMS debidos a la perforación en hojas de Senecio praecox.
2. Los cambios en el CMS consistieron, por un lado, en la acumulación de una sustancia "X" en las hojas no perforadas de los individuos dañados puntualmente. Por otro lado los cambios también consistieron en el descenso de la concentración de la sustancia "X" en el tiempo 1 (1 h); un incremento de su concentración para el tiempo 2 (3h) y una restauración de la concentración inicial en los tiempos 3 (7h) y 4 (23 H).
3. No hubo diferencia en la velocidad de respuesta; ya que no hubo respuesta en hojas perforadas, ni en 6 de los 7 tratamientos.
4. Se demostró que la respuesta inducida por el daño es una respuesta general y no local.
5. Se propone que la sustancia "X", actua en la reparación y no en la defensa de las hojas.
6. Que el mecanismo de síntesis de la sustancia "X" está regulado por la concentración de la misma.
7. Se tiene evidencia para suponer que la(s) sustancia(s) es fenólica y en concreto un flavonoide.

CALCULO DEL CCMS

1. Se midieron los Rf's de las manchas de cada uno de los 336 cromatogramas.

2. Se elaborò una tabla donde se indica la presencia o ausencia de manchas para cada uno de los Rf's posibles en cada cromatograma (ver Tabla 6). En esta tabla los patrones cromatogràficos se representaron en grupos según el tratamiento al que pertenecian.

3. Se calculò el indice de diferencia (ID) de todos los patrones cromatogràficos respecto a sus correspondientes grupos testigo según el tiempo y la repetición.

Cabe aclarar que también se calcularon los ID del testigo con respecto a si mismo.

4. El ID se calculò en base a la siguiente tabla:

T E S T I G O

E X P E R I M E N T A L	+		-	
		A	B	AB
	b	a	ba	
	Ab	Ba	T	

Donde:

A indica el número de manchas cromatográficas presentes tanto en el experimental como en el testigo.

a se refiere al número de manchas cromatográficas ausentes en en ambos grupos comparados.

B es el número de manchas cromatográficas presentes en el experimental pero ausentes en el testigo.

b hace referencia al número de manchas cromatográficas presentes en el testigo pero ausentes en el experimental.

T es el total de manchas consideradas.

De esta forma el ID queda definido como :

$$ID = \frac{B + b}{T}$$

El signo asociado al ID es el correspondiente al renglón donde se encuentre el valor (B o b) de mayor magnitud.

El ID representa el CCMS del modelo estadístico (ver Tabla VII).

APENDICE 2

PROGRAM INSTRUCTIONS

```

/problem title is 'senecio praeco:'.
/input variables are 4.
format is 'free'.
/design levels are 3,7,4,4.
names are r,f,t,h.
fixed are f,t.
random are r,h.
model is 'r(fth).f.t.h(f)'.
/print linesize=80.
/end

```

PROBLEM TITLE IS

senecio praeco:

```

NUMBER OF VARIABLES TO READ IN. . . . . 4
NUMBER OF VARIABLES ADDED BY TRANSFORMATIONS. . . . . 0
TOTAL NUMBER OF VARIABLES . . . . . 4
NUMBER OF CASES TO READ IN. . . . . TO END
CASE LABELING VARIABLES . . . . .
MISSING VALUES CHECKED BEFORE OR AFTER TRANS. . . . . NEITHER
BLANKS ARE. . . . . MISSING
NUMBER OF WORDS OF DYNAMIC STORAGE. . . . . 1999B

```

VARIABLES TO BE USED

```

      1 X(1)      2 X(2)      3 X(3)      4 X(4)

```

INPUT FORMAT IS

FREE

MAXIMUM LENGTH DATA RECORD IS 80 CHARACTERS.

```

/problem title is simple process.
/input variables are 4.
/format is 'free'.
/design levels are 3,7,4,4.
/names are r,f,t,h.
/fixed are f,t.
/random are r,h.
/model is 'r(fth),f,t,h(f)'.
/print linesize=80.
/end

```

0	0	0	0
-.1875	.0625	.0625	.0625
.0625	.0625	.0625	-.1875
-.1875	.0625	.0625	.0625
0	-.250	-.250	-.250
.0625	.0625	.0625	.0625
-.1875	.0625	.0625	.0625
.0625	-.1875	.0625	.0625
0	0	0	0
.0625	.0625	.0625	.0625
.0625	.0625	.0625	.0625
.0625	.0625	.0625	.0625
-.250	-.250	-.250	-.250
.0625	-.1875	.0625	.0625
.0625	.0625	.0625	.0625
-.1875	.0625	.0625	-.1875
-.250	0	0	0
.0625	.0625	.0625	.0625
.0625	.0625	.0625	.0625
.0625	-.1875	.0625	.0625
-.250	-.250	0	-.250
.0625	.0625	.0625	.0625
.0625	.0625	.0625	-.1875
-.1875	.0625	-.1875	-.1875
-.250	-.250	0	-.250
.0625	.0625	.0625	.0625
.0625	-.1875	-.1875	.0625

.0625	.0625	-.1875	.0625
0	0	0	0
.125	-.125	.125	-.125
0	0	0	0
.0625	.0625	.0625	-.1875
0	0	0	-.250
.125	-.125	-.125	.125
-.250	0	0	0
.0625	.0625	-.1875	-.0625
0	0	0	0
.125	.125	-.125	-.125
0	0	0	0
.0625	.0625	.0625	.0625
0	0	0	0
.125	-.125	.125	.125
0	0	0	0
.0625	-.1875	.0625	.0625
0	0	0	0
.125	.125	.125	.125
0	0	0	0
.0625	.0625	.0625	.0625
0	0	0	-.250
.125	-.125	.125	.125
0	0	0	0
.0625	.0625	.0625	.0625
0	0	0	0
-.125	-.125	.125	.125
0	0	0	0
.0625	.0625	.0625	.0625
.0625	-.1875	.0625	.0625
-.0625	-.0625	-.0625	.1875
.0625	.0625	-.1875	.0625
.125	.125	-.125	-.125
.0625	-.1875	-.1875	-.1875
.1875	.1875	.1875	.1875
.0625	.0625	-.1875	.0625
-.125	.125	.125	.125
.0625	-.1875	.0625	-.1875

.1875	-.0625	.1875	.1875
.0625	.0625	.0625	-.1875
.125	-.125	-.125	-.125
-.1875	.0625	.0625	.0625
.1875	.1875	.1875	.1875
.0625	.0625	-.1875	-.1875
-.125	.125	-.125	.125
.0625	.0625	.0625	-.1875
-.0625	.1875	.1875	.1875
.0625	.0625	.0625	.0625
.125	.125	.125	-.125
.0625	-.1875	.0625	.0625
.1875	.1875	.1875	.1875
.0625	.0625	.0625	-.1875
.125	-.125	.125	.125
.0625	-.1875	.0625	-.1875
.1875	.1875	.1875	.1875
-.1875	.0625	-.1875	.0625
.125	.125	.125	.125

/end

APENDICE 3

CALCULO DE RESIDUALES

Los residuales se calcularon como la diferencia entre los valores observados y los valores esperados del CCMS para cada tratamiento tal como se indica en la siguiente ecuación:

$$\epsilon_{ijkl} = CCMS - CCMS_{ij..}$$

donde:

$$CCMS_{ij..} = \frac{1}{(4)(3)} \sum_{k=1}^4 \sum_{l=1}^3 CCMS_{ijkl}$$

y los subindices están definidos según el modelo para el ANOVA de la página 19.

Los valores de ϵ_{ijkl} y sus correspondientes $CCMS_{ij..}$ se presentan en la Tabla IX. Con estos datos se hicieron las gráficas y pruebas estadísticas pertinentes para verificar los supuestos de independencia, homoscedasticidad y normalidad según se indica en la siguiente Tabla:

SUPUESTO	GRAFICA	PRUEBA ESTADISTICA
INDEPENDENCIA	ϵ_{ijkl} vs Tiempo	-----
HOMOCEDEASTICIDAD	ϵ_{ijkl} vs Tiempo vs F vs $CCMS_{ij..}$	Bartlett Bartlett Bartlett
NORMALIDAD	ϵ_{ijkl} vs Frecuencia acumulada	X - cuadrada

Las tablas necesarias para cada gráfica o prueba estadística así como las mismas gráficas y resultados de las pruebas se encuentran en el capítulo de Análisis de Resultados y Discusión.

A continuación se presentan los procedimientos seguidos para las pruebas estadísticas.

PRUEBA DE χ^2

HIPOTESIS: Sea $F(e)$ la distribución verdadera pero desconocida de los residuales, y sea $F(n)$ una distribución normal con parámetros estimados a partir de los residuales.

$H_0 = F(e) = F(n)$ para todo e .

$H_a = F(e) \neq F(n)$ para al menos un e .

PRUEBA ESTADÍSTICA:

$$\chi^2_c = \sum_{i=1}^c \frac{(f_{oi} - f_{ei})^2}{f_{ei}} = \sum_{i=1}^c \frac{f_{oi}^2}{f_{ei}} - N$$

donde:

c = # de intervalos de clase.

f_{oi} = es la frecuencia observada en el intervalo i .

f_{ei} = es la frecuencia esperada para el i -ésimo intervalo bajo el supuesto de $F(n)$.

N = número de observaciones.

REGLA DE DECISION:

Rechace H_0 si $\chi^2_c > \chi^2_{(g_l, \alpha)}$

donde g_l = son los grados de libertad determinado por el número de clases (c) menos uno, menos uno por cada parámetro estimado a partir de la muestra (K).

$$GL = c - 1 - K$$

α = probabilidad de cometer error tipo β o nivel de significancia.

PRUEBA DE BARTLETT

Hipótesis:

$$H_0 : \sigma_i^2 = \sigma_j^2 \text{ para toda } i \text{ y toda } j$$

$$H_a : \sigma_i^2 \neq \sigma_j^2 \text{ para al menos una } i \text{ y una } j.$$

Prueba Estadística:

$$X_0 = 2.3026 \frac{q}{c}$$

$$\text{donde: } q = (N - a) \log_{10} S_p - \sum_{i=1}^a (n_i - 1) \log_{10} S_i^2$$

$$c = 1 + \frac{1}{3(a-1)} \left(\sum_{i=1}^a (n_i - 1)^{-1} - (N - a)^{-1} \right)$$

$$S_p^2 = \frac{\sum_{i=1}^a (n_i - 1) S_i^2}{N - a}$$

S_i^2 es la varianza de la muestra para la i -ésima población.

$$N = n_1 + n_2 + \dots + n_a.$$

n_i = # de observaciones en la i -ésima muestra.

REGLA DE DECISION

$$\text{Rechace } H_0 \text{ si } X_0 > X^2(\alpha, a-1)$$

a = es el número de poblaciones comparadas.

α = nivel de significancia.

APENDICE 4

PRUEBA DE DUNCAN

Las comparaciones entre las medias de los tratamientos se hicieron según la prueba de Rangos múltiples de Duncan como se indica a continuación:

1) Las medias de los tratamientos se ordenaron en forma ascendente.

2) Se determinó el error estándar para cada promedio según la siguiente fórmula:

$$S_{yi} = \sqrt{\frac{MSE}{n}}$$

donde:

MSE = es el cuadrado medio del error

n = es el número de datos de la muestra.

3) De la Tabla de Duncan de Rangos significativos se obtuvieron los rangos $r_{\alpha}(p, f)$ donde α = es el nivel de significancia, f = es el número de grados de libertad del error y $p = 2, 3 \dots a$ siendo a el número de rangos.

4) Se obtuvieron las diferencias mínimas significativas para cada rango según se indica

$$R_p = r_{\alpha}(p, f) S_{yi0}$$

para $p = 2, 3 \dots a$.

5) Se calcularon todas las diferencias entre medias y se ordenaron de mayor a menor.

6) Las medias entre los tratamientos se compararon con sus respectivos R_p la diferencia entre la a -ésima media respecto a la primera media se comparó contra R_a , la diferencia entre la a -ésima media respecto a la $2a$. se comparó contra R_{a-1} así sucesivamente para todas las diferencias entre medias mayores al menor R_p posible, es decir mayores a R_2 .

Para prevenir contradicciones, ninguna diferencia entre un par de medias fué considerada significativa, si las medias involucradas caían entre otras 2 medias que no difieren significativamente.

El error estandar para la diferencia entre las medias de 2 poblaciones de datos es:

$$SE \text{ dif} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) S_1^2 + (n_2 - 1) S_2^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1)}}$$

donde n_1 es el número de datos en la población 1

donde n_2 es el número de datos en la población 2

donde S_1^2 es el estimador de la varianza de la población 1

donde S_2^2 es el estimador de la varianza de la población 2

pero si n_1 y n_2 son iguales y $S_1^2 = S_2^2$ (o sea $S_1 = S_2$)

tal como supone el ANOVA, entonces:

$$SE \text{ dif} = \sqrt{\frac{2 S^2}{n}}$$

donde S^2 es el valor del cuadrado medio del error (MSE) en la ANOVA y "n" el número de observaciones para cada grupo,

de esa manera:

$$SE_f = \sqrt{\frac{2 (0.0068)}{48}} = 0.017$$

$$SE_t = \sqrt{\frac{2 (0.0068)}{84}} = 0.013$$

$$SE_{h(f)} = \sqrt{\frac{2 (0.0068)}{12}} = 0.034$$

$$SE_{ft} = \sqrt{\frac{2 (0.0068)}{12}} = 0.034$$

Solamente cuando una diferencia excede los 2 errores estandar es considerada significativa, de lo contrario no.

Por eso en la Gráfica 5, F5 es el único significativamente distinto y en la Gráfica 6, T1 y T2 lo son, uno negativo y el otro positivo.

APENDICE 5

PRUEBAS DE DETERMINACION DE METABOLITOS SECUNDARIOS.

Los 2 grupos de muestras obtenidos en metanol se sometieron a las pruebas que se realizan normalmente para 5 tipos de metabolitos secundarios (alcaloides, fenoles, flavonoides, terpenos-esteroides, glicósidos y taninos).

Para realizar cada prueba se utilizó 1ml del extracto MeOH de cada una de las muestras que se evaporó a sequedad y se redisolvió en el disolvente adecuado para la prueba.

ALCALOIDES

La presencia de alcaloides se probó mediante las reacciones de Dragendorff y del ácido silicotúngstico.

Para ambos casos 1 ml de cada una de las muestras se llevó a sequedad, se redisolvió en la misma cantidad de HCl al 10% y se agregaron 2 gotas del reactivo correspondiente. La prueba es positiva si se forma un precipitado naranja con el reactivo de Dragendorff, o amarillo pardo, muy fino, con el ácido silicotúngstico.

FENOLES

La prueba de cloruro férrico (solución acuosa al 10%) para determinar fenoles consistió en agregar 2 gotas del mencionado reactivo a 1ml de los extractos metanólicos. La prueba es positiva si el color de la solución vira a verde.

FLAVONOIDES.

La presencia de flavonoides se determinó con la prueba de Shinoda, que consiste en agregar un trocito de limadura de Magnesio a 1 ml de las soluciones de los extractos, el cual se hace reaccionar con 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado. La prueba es positiva si la solución vira a verde-azul o rojo-naranja.

TERPENOS - ESTEROIDES

A 1 ml de cada una de las muestras, llevadas a sequedad y redisueltas en cloroformo, se les agregó 1 ml del reactivo de Liebermann-Burchard. La prueba es positiva si la solución vira a verde-azul o rojo-naranja.

GLICOSIDOS

La presencia de glicósidos se determinó por la prueba de Möllisch, que consistió en agregar 2 gotas de una solución etanólica de alfa-naftol al 5% a 1 ml de cada uno de los extractos metanólicos y añadir 1 ml de H₂SO₄ concentrado, resbalándolo por las paredes del tubo de ensayo para evitar que se mezcle con la solución alcohólica, a fin de poder observar el anillo colorido que se forma en la interfase, que en caso de ser violeta indica la presencia de glicósidos.

B I B L I O G R A F I A

- Beck, S.D. (1965). Resistance of plants to insects. *Ann. Rev. Entom.* 10, 207 - 224.
- Bohlmann, et al. (1977). Terpene derivate Aus *Senecio*-Arten. *Phytochemistry*. 16, 965 - 985.
- Bohlmann, et al. (1985). Eremophilane derivatives and other constituents from *Senecio* species. *Phytochemistry*. 24 (6), 1249 - 1261.
- Bohlmann, et al. (1986). Further pyrrolizidine alkaloids and furanoremphilanes from *Senecio* species. *Phytochemistry*. 25 (5): 1151 - 1159.
- Conover, W. J. (1980). Practical Nonparametric statistics. 2nd. Ed. John Wiley and Sons, USA.
- Cronquist, A. (1981). An Integrated Systems of Classification of Flowering Plants. New York. Columbia University Press. 1021-1035 pp.
- Daniels, D.D., Giovanelli, J., Röss, T.A. (1969). Bioquímica Vegetal Omega. Barcelona, España.
- Dirzo, R. (1985). Metabolitos secundarios en Plantas ¿Atributos panglossianos o de valor adaptativo? *Ciencia* 36: 137 - 145.
- Feeny, P. (1976). Plant Appearance and Chemical Defense. Biological interactions between plants and insects. In Wallace, J.W. and R.L. Mansell (eds); *Recent Adv. Phytochem.* 10. Plenum Press, N.Y. USA. 1 - 39.
- Fraenkel, G.S. (1959). The raison d'être of secondary plant substances. *Science* 129: 1466 - 1470.
- Harborne, J.B. (1975). Chemical and Biology of Compositae. Academic Press. London. 831 - 849.
- Hemsley, W.B. (1888). *Senecio*. In Godman, F.D. and O. Salvin. *Biología Central-Americana. Botany*. R.H. Porter. London. Vol II. 69: 235 - 246.
- Martínez, M. (1979). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. 74: 1177.
- Montgomery, D.C. (1984). Design and Analysis of Experiments. Cap. 3, 4. John Wiley and Sons. USA.
- O'Gorman, H. (1963). Plantas y flores de México. UNAM, Dirección General de Publicaciones. México, D.F.

Ortega, A.M.; Romero, G.E. y Díaz (1975). Furanoteremofilanos del Senecio praecox. Praecoxilina A. Rev. Latinoamer. Quím. 6: 136 - 142.

Oyama, K. y F. Espinoza. (1986). ¿Herbívoros y plantas: Cómo interactúan? Ciencias. 7: 38 - 46.

Pastelin, Méndez P. (1972). Separación e identificación por cromatografía en fase gaseosa de los componentes del aceite esencial del Senecio praecox (palo loco). Tesis de Licenciatura. Fac. de Ciencias Químicas. Universidad Veracruzana.

Rhoades, D.F. and Gates, R.G. (1976). Toward and General theory of plant antiherbivore chemistry. Biological interactions between plants and insects. In Wallace, J.W. and R.L. Mansell (ed); Recent Adv. Phytochem. 10: 168 - 213.

Romero, G.M. (1970). Aislamiento y determinación de la estructura de un nuevo furanoteremofilano "Praecoxilina IV". Tesis de Licenciatura. Fac. Ciencias Químicas. Universidad Veracruzana.

Romo de Vivar, A. (1985). Productos Naturales de la Flora Mexicana. LIMUSA. México, D.F. 70 - 73.

Rzedowski, J. y G. Rzedowski. (1985). Flora Fanerogámica del Valle de México. Vol. II. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN e Instituto de Ecología. México, D.F. 430; 608 - 609.

Rzedowski, J. (1986). Claves para la identificación de los géneros de la familia Compositae en México. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Universitaria Potosina. México, 6 - 7.

Seigler, D. and P.W. Price. (1976). Secondary compound in plants: primary functions. The American Naturalist. 110 (971): 102 - 105.