

Efecto de dos extractos botánicos en el desarrollo y contenido de polifenoles de ají (*Capsicum annuum* L.)*

Effect of two botanical extracts in the development and content of polyphenol in chili pepper (*Capsicum annuum* L.)

Ricardo Tighe Neira^{1,5§}, René Montalba Navarro², Gina Leonelli Cantergiani³ y Aliro Contreras Novoa⁴

¹Universidad Católica de Temuco, Casilla 15-D, Temuco, Chile. Fono (56)-9-45-553901. ²Instituto del Medio Ambiente, y Departamento de Ciencias Agronómicas y Recursos Naturales, Universidad de la Frontera. Casilla 54-D, Temuco, Chile. Tel. (56)-9-45-325555. (mrene@ufro.cl). ³Universidad Católica de Temuco, Casilla 15-D, Temuco, Chile. Tel. (56)-9-45-205521. (ginalc@uct.cl). ⁴Departamento de Ciencias Agronómicas y Recursos Naturales, Universidad de la Frontera. Casilla 54-D, Temuco, Chile. Tel. (56)-9-45-325631. (aliroc@ufro.cl). ⁵Programa de Magister en Gestión y Manejo Agropecuario, especialidad agroecología y sistemas de producción orgánica, Departamento de Ciencias Agronómicas y Recursos Naturales, Universidad de la Frontera. Casilla 54-D, Temuco, Chile. [§]Autor para correspondencia: rtighe@uct.cl.

Resumen

La presencia de fitoquímicos de distinta naturaleza presente en extractos botánicos que impactan en la generación de metabolitos primarios y secundarios (principalmente polifenoles) en los cultivos en que son aplicados, se ha considerado un elemento relevante vinculado a los efectos benéficos de su aplicación foliar. Se evaluó el efecto del extracto acuoso de ortiga (*Urtica dioica* L.) y *Ulex europaeus* L., sobre parámetros de desarrollo en ají (*Capsicum annuum* L. var Longum cv. "Cacho de cabra"), así como en el contenido de polifenoles en hoja y fruto, como atributo funcional. El ensayo se estableció en condiciones de invernadero en la Región de La Araucanía, Chile. Los extractos se aplicaron en dosis inversas de N:P con relación 1:3.7 entre los extractos, a cada planta distribuida completamente al azar. El porcentaje de materia seca (MS%) presentó diferencias significativas a las aplicaciones de *U. europaeus* y *U. dioica*. En fructificación, *U. dioica* dosis 2 presentó MS% en fruto inmaduro estadísticamente igual que el testigo e inferior que los demás tratamientos. La concentración de polifenoles en hojas y frutos tendió a ser mayor en los extractos botánicos y significativamente menor en el testigo ($p > 0.05$) en la medición final del ciclo productivo. En frutos *U. europaeus* presentó valores

Abstract

The presence of different types of phytochemicals present in botanical extracts that affect the generation of primary and secondary metabolites (mainly polyphenols) in the cultures in which they are applied, has been considered an important element linked to the beneficial effects of foliar application. The effect of aqueous extract of nettle (*Urtica dioica* L.) and *Ulex europaeus* L., on development parameters of chili peppers (*Capsicum annuum* var longum L. cv. "Cacho de cabra") as well as on the content of polyphenols in leaf and fruit, such as functional attribute. The trial was conducted under greenhouse conditions in the Araucanía Region, Chile. Extracts were applied in inverse dose N: P ratio 1:3.7 between the passages, each plant completely randomly distributed. The percentage of dry matter (DM %) showed significant differences in the applications of *U. europaeus* and *U. dioica*. In fruiting, *U. dioica* MS % dose 2 had statistically similar in immature fruit than the control and lower than the other treatments. The concentration of polyphenols in leaves and fruits tended to be higher in botanical extracts and significantly lower in the control ($p > 0.05$) in the final measurement of the production cycle. In fruits *U. europaeus* presented higher ($p \leq 0.05$) than the other treatments including the

* Recibido: marzo de 2013
Aceptado: octubre de 2013

mayores ($p \leq 0.05$) que los demás tratamientos incluido el testigo. Estos resultados permiten inferir la presencia de compuestos activadores del metabolismo primario y secundario en los extractos botánicos.

Palabras clave: *Ulex europaeus* L., *Urtica dioica* L., bioestimulación, metabolismo secundario.

Introducción

Las aplicaciones foliares de extractos botánicos son utilizadas como complemento nutricional de los cultivos, mencionándose que favorecerían su desarrollo, así como también producirían mejoras en el rendimiento y calidad del producto (Fregoni, 1986). No obstante, sus beneficios no se reducirían al aporte nutricional, sino que más bien a efectos positivos y negativos como bioestimulación y fitotoxicidad provocado por metabolitos secundarios, grupos fitohormonales u otros compuestos que estarían formando parte de estos extractos botánicos (Teaca *et al.*, 2008).

En cultivos tradicionales, los metabolitos primarios como aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos (Ávalos y Pérez-Urria, 2009) son maximizados debido a la optimización de las prácticas convencionales de cultivo (Mitchell y Chassy, 2009). Por otra parte, los metabolitos secundarios corresponden a compuestos de diversos grupos químicos como fenilpropanoides, flavonoides, alcaloides y terpenos, sin función definida en procesos metabólicos como fotosíntesis y respiración celular (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Son originados en pequeñas cantidades y de forma restringida dentro de la planta y asociada a algunos géneros, familias o incluso a sólo algunas especies (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Dentro de las funciones asociadas a estos compuestos se mencionan la defensa ante la presencia de elementos bióticos y abióticos, motivo por el cual se ha observado que los niveles de estrés se relacionarían con la producción de estos compuestos (Sepúlveda *et al.*, 2003). Del mismo modo, dada su importancia para la salud humana algunos de ellos son catalogados como “funcionales” (Zhao *et al.*, 2007).

Dentro de los extractos botánicos se encuentran los de ortiga (*Urtica dioica* L.), siendo uno de los más utilizados como bioestimulante y fertilizante foliar. Estas funciones se asocian a su alto contenido de flavonoides, ácidos fenólicos, ésteres, terpenoides, (Grevsen *et al.*, 2008; Lapinskaya, y Kopyt'Ko, 2008), saponinas, entre otros

control. These results allow inferring the presence of activator compounds primary and secondary metabolism in plant extracts.

Key words: *Ulex europaeus* L., *Urtica dioica* L., bio-stimulation, secondary metabolism.

Introduction

Foliar applications of botanical extracts are used as a nutritional supplement crop, mentioning that favor their development and result in improvements in performance and product quality (Fregoni, 1986). However, benefits will not be reduced to nutrition, but rather positive and negative effects as bio-stimulation and phyto-toxicity caused by secondary metabolites or other compounds phyto-hormonal groups that would form part of these botanical extracts (Teaca *et al.*, 2008).

In traditional cultures, primary metabolites such as amino acids, nucleotides, sugars and lipids (Ávalos and Pérez-Urria, 2009) are maximized due to the optimization of conventional breeding practices (Mitchell and Chassy, 2009). Furthermore, secondary metabolites are compounds of various chemical groups such as phenylpropanoids, flavonoids, alkaloids and terpenes, no defined function in metabolic processes and cellular respiration and photosynthesis (Ávalos and Pérez-Urria, 2009). They originated in small quantities and to a limited extent within the plant and associated with some genera, families or even just some species (Ávalos and Pérez-Urria, 2009). Among the functions associated with these defense compounds mentioned in the presence of biotic and abiotic elements, which is why it has been observed that levels of stress would relate to the production of these compounds (Sepúlveda *et al.*, 2003). Similarly, given its importance to human health some of them are classified as "functional" (Zhao *et al.*, 2007).

Within the botanical extracts are the nettle (*Urtica dioica* L.), one of the most used as foliar fertilizer and bio-stimulant. These functions are associated with the high content of flavonoids, phenolic acids, esters, terpenoids (Grevsen *et al.* 2008; Lapinskaya and Kopyt'Ko, 2008), saponins, amongst others (Oleszek *et al.*, 1999), and nutrients such as nitrogen, in the changing content in relation to their availability in the soil, as has been described as a kind of nitro-filica (Taylort, 2009).

(Oleszek *et al.*, 1999), y de nutrientes como Nitrógeno, en contenido variable en relación a su disponibilidad en el suelo, dado que ha sido descrita como una especie nitrofilica (Taylort, 2009).

Por otra parte, existen reportes de extractos foliares acuosos de leguminosas tales como *Vigna unguiculata* L. Walp. cv. Iron Clay y *Mucuna deeringiana* (Bort) Merr., sobre *Capsicum annuum* L., con efecto positivo en altura y MS (Adler y Chase, 2007), por lo cual resulta plausible considerar que mediante el uso de algunos extractos vegetales se pueda incrementar el crecimiento de los cultivos y su calidad nutricional para el ser humano.

Ulex europaeus L., es una leguminosa nativa de Europa Occidental (Bisby, 1981), es catalogada como una de las 20 malas hierbas de mayor importancia en Chile (Thorp y Lynch, 2000). Se ha constituido en una de las plagas más severas en las regiones del BioBio, La Araucanía, Los Ríos y Los Lagos (Matthei, 1995). Corresponde a una especie en que se ha explorado su uso en medicina con extractos de efecto aglutinante; sin embargo, poco se ha hecho en el ámbito agropecuario considerando que el contenido de macronutrientes primarios base materia seca son: N 4,8-3.1%; P 0.32-0.48% y K 3.1-1.8% (Howe *et al.*, 1988), además, posee un alto contenido de alcaloides quinolizidínicos, entre ellos la citicina con 83.8 ppm ($8.38 \times 10^{-5}\%$) y jussiaeiine con 32.2 ppm ($3.22 \times 10^{-5}\%$) (Máximo *et al.*, 2006).

Las concentraciones de los elementos y compuestos mencionados, permiten pensar en un extracto acuoso que aplicado sobre otras especies vegetales herbáceas en estado vegetativo y productivo genere efectos en su crecimiento y/o desarrollo, además de la activación del metabolismo secundario, producto de la presencia de alcaloides, es el caso del incremento en el contenido de polifenoles en respuesta a cafeína (Batish *et al.*, 2008). Esto se debe, a que los fertilizantes foliares son absorbidos a través de la cutícula o los estomas de la hoja debido a la composición de la superficie de ésta, que permite la absorción de nutrientes (Hossain y Ryu, 2009), y que posteriormente, moviliza vía transporte apoplasto o simplasto hacia los tejidos vasculares y luego al floema, o son transportados activamente a través de la membrana plasmática de las células de la hoja donde luego estos compuestos orgánicos son incorporados y transportados fácilmente en toda la planta (Haynes y Goh, 1977), incidiendo en el crecimiento y desarrollo de las plantas, relacionado probablemente a grupos fito-hormonales endógenos que actúan como

Moreover, there are reports of aqueous leaf extracts of legumes such as *Vigna unguiculata* L. Walp. cv. Iron Clay and *Mucuna deeringiana* (Bort) Merr. On *Capsicum annuum* L. with high and positive effect MS (Adler and Chase, 2007), whereby it is plausible to consider that by using certain plant extracts can enhance the crop growth and nutritional quality for humans.

Ulex europaeus L., a legume native to Western Europe (Bisby, 1981), is ranked as one of the 20 most important weeds in Chile (Thorp and Lynch, 2000). It has become one of the most severe pest in the regions of BioBio, Araucanía, Los Ríos and Los Lagos (Matthei, 1995). Corresponds to a species that has explored their use in medicine extracts binding effect, but little has been done in the field of agriculture whereas the primary macronutrient content dry matter basis are: N 4,8-3.1%; P 0.32 to 0.48% and 3.1-1.8% K (Howe *et al.*, 1988) also has a high content of quinolizidine alkaloid, including citicina with 83.8 ppm ($8.38 \times 10^{-5}\%$) and with 32.2 ppm jussiaeiine ($3.22 \times 10^{-5}\%$) (Máximo *et al.*, 2006).

The concentrations of the elements and compounds mentioned, let think of an aqueous extract applied to other herbaceous plants in the vegetative and productive generate effects on their growth and/or development, as well as the activation of secondary metabolism product of the presence of alkaloids, in the case of increasing the polyphenol content in response to caffeine (Batish *et al.*, 2008). This is due to foliar fertilizers are absorbed through the cuticle or leaf stomata due to the composition of its surface, which allows the absorption of nutrients (Hossain and Ryu, 2009), and subsequently, mobilizes apoplast or symplast transport path toward the vascular tissues and then the phloem, or are actively transported across the plasma membrane of cells of the leaf where after these organic compounds are easily stored and transported throughout the plant (Haynes and Goh, 1977), affecting the growth and development of plants, probably related to endogenous hormonal phyto- groups which act as growth retardants, induce flowering, maturity and promoters biomass production, among others (Chatterjee *et al.* 2005; Bachman and Metzger, 2008; Mohamed *et al.*, 2013) and moreover, by improving mineral nutrition of plant tissues create a nutritional balance can withstand abiotic stress conditions, such as the salinity, drought water stress, among others to compensate the deficient nutrients in plant tissues, altering pathways carbon and nitrogen fixation.

retardantes del crecimiento, inductores de floración, promotores de madurez y de la producción de biomasa, entre otros (Chatterjee *et al.*, 2005; Bachman y Metzger, 2008; Mohamed *et al.*, 2013); y por otra parte, al mejorar la nutrición mineral en tejidos de la planta crean un equilibrio nutricional que permite soportar las condiciones de estrés abiótico, como por ejemplo a la salinidad, sequía, estrés hídrico, entre otros, al compensar los nutrientes deficientes en los tejidos de la planta, alterando las vías de fijación de nitrógeno y carbono.

(El-Fouly *et al.*, 2002; Shaaban *et al.*, 2004; Hussein *et al.*, 2008; Bellaloui *et al.*, 2013), regulando la función de los estomas, osmoregulación, balance catiónico-aniónico y síntesis de proteínas (Hawkesford *et al.*, 2012), manteniendo la presión de turgencia (Mengel y Arneke, 1982) y mejorando la conductancia estomática, tasa de transpiración y fotosíntesis neta (Zareian *et al.*, 2013), así como también a lo manifestado en la inhibición de la germinación y el crecimiento de plantas expuestas a extractos etanólicos de *Melissa officianalis*, *Lavandula angustifolia* y *Achillea millefolium*, efectos que son atribuibles a aleloquímicos como alcaloides y otros compuestos metabólicamente activos y tóxicos presentes en la solución.

Lo anterior puede resultar menos atractivo en la producción pero el valor nutritivo por unidad de producto puede ser superior (Mitchell y Chassy, 2009), debido a que en la planta tratada se generan como respuesta compuestos derivados del metabolismo secundario del tipo fenólico con carácter antioxidante, benéficos a la salud humana, siendo los más abundantes biosintetizados por el reino vegetal (Wood *et al.*, 2002; Sepúlveda *et al.*, 2003). Al respecto, se ha comprobado que la cafeína es un alcaloide que provoca estrés abiótico en las plantas incrementado significativamente el contenido de polifenoles endógenos en *Phaseolus aureus* Roxb de 26 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ con la adición de 2000 μM del alcaloide (Batish *et al.*, 2008).

Dado los antecedentes presentados y, considerando especialmente la composición nutricional y niveles de metabolitos tóxicos en las especies *U. europaeus* y *U. dioica*, resulta de interés evaluar el efecto de extractos acuosos sobre parámetros de desarrollo y concentración de polifenoles totales en ají (*C. annuum*), dado que es posible presenten efecto diferencial en variables productivas y de activación del metabolismo secundario, manifestado en el aumento de la concentración endógena de polifenoles totales, de los cuales existen antecedentes en *C. annuum*.

(El-Fouly *et al.* 2002; Shaaban *et al.* 2004; Hussein *et al.* 2008; Bellaloui *et al.*, 2013), regulating the function of the stomata, osmoregulation, cation-anion balance and protein synthesis (Hawkesford *et al.*, 2012), maintaining turgor pressure (Mengel and Arneke, 1982) and improving stomatal conductance, transpiration rate and net photosynthesis (Zareian *et al.*, 2013), as well as the statements in the inhibition of germination and growth of plants exposed to ethanol extracts of *Melissa officianalis*, *Lavandula angustifolia* and *Achillea millefolium*, effects that are attributable to allelochemicals as alkaloids and other metabolically active and toxic compounds present in the solution.

This may be less attractive for the production but the nutritional value per product unit may be higher (Mitchell and Chassy, 2009), because in the treated plant response generated as compounds derived from the secondary metabolism of phenolic type antioxidant character, beneficial to human health, the most abundant biosynthesized by the plant kingdom (Wood *et al.*, 2002; Sepúlveda *et al.*, 2003). In this regard, it has been found that caffeine is an alkaloid that causes abiotic stress in plants significantly increased endogenous polyphenols content in *Phaseolus aureus* Roxb of 26 mg mL^{-1} to 45 mg mL^{-1} with the addition of 2000 μM alkaloid (Batish *et al.*, 2008).

Since the submissions and, especially considering the nutritional composition and levels of toxic metabolites in the species *U. europaeus* and *U. dioica*, it is interesting to evaluate the effect of aqueous extracts on growth parameters and total polyphenol concentration in pepper (*C. annuum*), since it is possible variables present differential effect on production and activation of secondary metabolism, manifested in increasing endogenous concentration of total polyphenols, of which there are precedents in *C. annuum*.

Materials and methods

Site and experimental conditions

The trial was conducted at the experimental field Pillanlelún of the Catholic University of Temuco, coordinates 38° 39' 17.2" south latitude, 72° 26' 56" west longitude. We used a 180 m² greenhouse, polyethylene coated metal and drip irrigation system, applying based organic fertilizer vermicompost (*Eisenia foetida*).

Materiales y métodos

Sitio y condiciones de experimentación

El ensayo se realizó en la estación experimental Pillanlelbún de la Universidad Católica de Temuco, coordenadas 38° 39' 17.2" latitud sur, 72° 26' 56" longitud oeste. Se utilizó un invernadero de 180 m², metálico con cubierta de polietileno y sistema riego por goteo; se aplicó fertilización orgánica en base a humus de lombriz (*Eisenia foetida*).

Material vegetal

Las plántulas de *C. annuum* var. Longum cv. "Cacho de cabra" (Giacconi y Escaff, 1998) se desarrollaron en bandejas de germinación en condiciones de invernadero, fueron trasplantadas cuando presentaron cinco hojas verdaderas a una distancia de 30 cm x 30 cm.

Las especies *U. europaeus* y *U. dioica* fueron utilizadas como fuente de extractos acuosos totales. La primera de ellas se obtuvo de la estación experimental Pillanlelbún de la Universidad Católica de Temuco, en estado de fructificación; y la segunda del predio experimental Maquehue de la Universidad de La Frontera, en estado de floración.

Preparación y estandarización de los extractos

Los extractos vegetales se prepararon. a) en base de tallos jóvenes de *U. europaeus* de entre 15 cm y 60 cm de longitud, sin flores y con espinas; y b) en base a brotes y hojas de *U. dioica* en estado de floración. Para la obtención de los extractos acuosos totales se procedió a triturar el material vegetal con un mortero de cerámica y una picadora eléctrica de uso doméstico marca Oster, posteriormente se llevo a una solución en proporción 1:10 de material fresco triturado y agua destilada respectivamente, y almacenaron en oscuridad a 4 °C ± 1 °C por 7 días (Pacheco *et al.*, 2004). Posteriormente, se filtró con una bomba de vacío (Welch 1399 DuoSeal Vacuum Pump) y papel filtro Whatman N°2. Se determinó el contenido de N y P₂O₅ de los extractos utilizando el método Kjeldahl y Nitro-vanado-molibdato, respectivamente (Cuadro 1).

Los tratamientos (Cuadro 2) estuvieron constituidos por dos dosis de cada extracto, una equiparada en función a la dosis de aplicación de N (d1) y la otra (d2) equiparada en función a la concentración de P₂O₅, resultando una relación inversa de N:P de 1:3.7 entre los extractos. Adicionalmente, fue

Plant material

C. annuum seedlings var. Longum cv. "Cacho de cabra" (Giacconi and Escaff, 1998) were grown in plug trays in the greenhouse, transplanted when they presented five true leaves at a distance of 30 cm x 30 cm.

U. europaeus and *U. dioica* species were used as a source of total aqueous extracts. The first one was obtained from the experimental station Pillanlelbún of the Catholic University of Temuco, fruiting state and the second experimental plot Maquehue the University of La Frontera, in bloom.

Preparation and standardization of extracts

Plant extracts were prepared. a) on the basis of young stems *U. europaeus* between 15 cm and 60 cm in length, without flowers and thorns; and b) based on buds and leaves of *U. dioica* in bloom. To obtain the total aqueous extracts proceeded to crush plant material with a ceramic mortar and household electric mincer subsequently took 1:10 solution minced fresh material and distilled water respectively, and stored in the dark at 4 °C ± 1 °C for 7 days (Pacheco *et al.*, 2004). Thereafter, filtered with a vacuum pump (Welch 1399 DuoSeal Vacuum Pump) and Whatman filter paper No.2. determining the content of N and P₂O₅ extracts using the Kjeldahl method and winding Nitro - molybdate, respectively (Table 1).

Cuadro 1. Porcentaje de N y P₂O₅ de los extractos botánicos.
Table 1. Percentage of N and P₂O₅ in the botanical extracts.

Extractos	N total (%)	P disponible (P ₂ O ₅) (%)
<i>U. europaeus</i>	0.018	0.78
<i>U. dioica</i>	0.068	0.21

Fuente: Laboratorio de Suelos y Análisis Foliar de la Universidad de La Frontera. Dpto. Agroindustria.

The treatments (Table 2) were constituted by two doses of each extract a matched according to N application rate (d1) and the other (d2) depending equated to the concentration of P₂O₅, resulting in an inverse relationship of N: P of 1:3.7 between extracts. Additionally, a control was included consisting of distilled water. The four treatments and the control was completely randomized within the greenhouse. The experimental and observational unit consisted of groups of 10 plants of *C. annuum* in 10 repetitions.

incluido un testigo constituido por agua destilada. Los cuatro tratamientos y el testigo, se distribuyeron completamente al azar dentro del invernadero. La unidad experimental y observacional estuvo constituida por grupos de 10 plantas de *C. annuum* en 10 repeticiones.

Cuadro 2. Dosis y concentración de nitrógeno y fósforo equivalente por hectárea utilizados en el experimento.

Table 2. Dose and concentration of nitrogen and phosphate equivalent per hectare used in the experiment.

Origen extracto	Cantidad extracto aplicado		N (kg ha ⁻¹)	P ₂ O ₅ (kg ha ⁻¹)
	L ha ⁻¹	mL planta ⁻¹		
Testigo	---	---	---	---
<i>U. europaeus</i> d1*	218.9	1.99	0.04	1.7
<i>U. europaeus</i> d2**	12.1	0.11	0.002	0.1
<i>U. dioica</i> d1*	58.3	0.53	0.04	0.12
<i>U. dioica</i> d2**	45.1	0.41	0.03	0.1

* indica equivalencia en aplicación de N; **indica equivalencia en aplicación de P.

Evaluación de parámetros de productividad

Los extractos se asperjaron desde inicios de floración en volumen indicado en el Cuadro 2, fraccionados en tres aplicaciones separadas por 10 días una de otra. Su efecto se determinó en los periodos de inicios de floración (a) y productivo (fruto maduro) (b) así las variables fueron para (a) materia seca total (MS g), porcentaje de materia seca total (MS%), concentración de polifenoles totales en hojas y tasa de crecimiento relativo (TRC) (Ecuación 1) que expresa el crecimiento en MS a partir de un gramo de MS de la planta en un intervalo de tiempo, con relación a un tiempo inicial (Jarma *et al.*, 2006), y para (b) materia seca de fruto maduro (MSfm g), porcentaje de materia seca de fruto maduro (MSfm%), materia seca fruto inmaduro (MSfi g) porcentaje de materia seca de fruto inmaduro (MSfi%).

$$TRC = (\ln W_f - \ln W_i) / (T_f - T_i) \quad (1)$$

Donde: TRC= tasa relativa de crecimiento (g g⁻¹ d⁻¹); Wf= peso seco final (g); Wi= peso seco inicial (g); Tf= tiempo final (días); Ti= tiempo inicial (días); ln= logaritmo natural (Jarma *et al.*, 2006).

Las determinaciones de MS se realizaron por medio de muestras destructivas en estufa de secado (Binder, Klase 2.0) con aire forzado a 60° C por 48 h en cinco oportunidades, 10 días posteriores a cada aplicación. En estado productivo se midió en frutos maduros e inmaduros, como resultado de la suma de la cosecha escalonada realizada cada 7 días.

Evaluation of productivity parameters

The extracts were sprayed from early flowering in volume indicated in Table 2, divided into three separate applications for 10 days of one another. Its effect was determined in

the early periods of flowering (a) and productive (mature fruit) (b) and the variables were to (a) total dry matter (DM g), total dry matter percentage (DM %), concentration total polyphenols in leaves and relative growth rate (PTR) (Equation 1) expressing growth MS from an MS gram of the plant in a time interval compared to an initial time (Jarma *et al.*, 2006), and for (b) mature fruit dry matter (MSFM g), dry matter content of ripe fruit (MSFM %), immature fruit dry matter (MSfi g) dry matter percentage of immature fruit (MSfi %).

$$TRC = (\ln W_f - \ln W_i) / (T_f - T_i) \quad (1)$$

Where : TRC = relative growth rate (g g⁻¹ d⁻¹), Wf = final dry weight (g), Wi = initial dry weight (g) Tf = final time (days), Ti = initial time (days) ln = natural logarithm (Jarma *et al.*, 2006).

MS determinations were performed by means of destructive samples oven (Binder, Klase 2.0) with forced air at 60 °C for 48 h on 5 occasions, 10 days after application. Production was measured in a state in immature and mature fruits, because of the sum of the harvest step performed every 7 days.

Evaluation of the content of polyphenols in the leaf and fruit of *C. annuum*

Determination of polyphenols in bloom was carried out in adult leaves of the final measurement. In the production period was determined in ripe fruits of the first harvest, in both cases we used the Folin-Ciocalteu method described

Evaluación del contenido de polifenoles en hoja y fruto de *C. annuum*

La determinación de polifenoles en floración se realizó en hojas adultas de la medición final. En el período productivo se determinó en frutos maduros de la primera cosecha; en ambos casos se utilizó el método de Folin-Ciocalteu descrito por Georgé *et al.* (2005) que considera soluciones de acetona/agua, carbonato de sodio y ácido gálico a una concentración de 7/3 v/v, 75 g L⁻¹ y 5 mg L⁻¹ a 30 mg L⁻¹, respectivamente. La absorbancia se midió a 760 nm en un espectrofotómetro UV visible, después de 15 minutos de haberse sometido a una temperatura de 50 °C, los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico (EAG) en 100 g BMS.

Diseño experimental y análisis estadístico

Las unidades experimentales se distribuyeron completamente al azar dentro del invernadero. Los datos resultantes fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) y posteriormente las variables MS (g), MS (%) y TRC a la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p \leq 0.05$). Los datos de MSfm (g), MSfm (%), MSfi (g), MSfi (%) y MSft (g), se sometieron a la prueba de Kruskal Wallis y posteriormente al test de DUNN ($p \leq 0.05$). La concentración de polifenoles totales en hojas y frutos se analizó por medio de un ANDEVA y utilizó la prueba de Duncan y Thamane ($p \leq 0.05$), respectivamente. Todos los datos fueron analizados con el paquete estadístico JMP 5.0®.

Resultados y discusión

Las variables productivas (MS g y MS %), medidas en estado de floración, no presentaron diferencias significativas en las fechas evaluadas; sin embargo, en la cuarta evaluación el MS% obtenido con *U. europaeus* d2 fue significativamente mayor al de los demás tratamientos, excepto para *U. dioica* d2 (Figura 1).

En la Figura 1A los datos no se comportan de acuerdo a lo esperado, especialmente en la fecha tres en que se observa una disminución de la concentración de la MS, lo que no se visualiza en la producción (MS g) en la misma fecha (Figura 1B). No obstante, en términos generales los resultados concuerdan con lo expuesto por Adler y Chase (2007), señalando que los extractos acuosos de leguminosas afectan positivamente la germinación, crecimiento y peso seco de las

by George *et al.* (2005) who considers solutions acetone/water, sodium carbonate and gallic acid at a concentration of 7/3 v/v, 75 g L⁻¹ and 5 mg L⁻¹ to 30 mg L⁻¹, respectively. The absorbance was measured at 760 nm in a UV visible spectrophotometer, after 15 minutes of having been subjected to a temperature of 50 °C, the results were expressed in mg of gallic acid equivalents (EAG) in 100 g BMS.

Experimental design and statistical analysis

The experimental units were completely randomized within the greenhouse. The resulting data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and subsequently the variables MS (g), MS (%) and TRC, Tukey 's multiple comparison ($p \leq 0.05$). MSFM data (g), MSFM (%), MSfi (g), MSfi (%) and MSFT (g), were subjected to the Kruskal Wallis test and subsequently to DUNN ($p \leq 0.05$). The total polyphenol concentration in leaves and fruits were analyzed by an ANOVA and Duncan test used and Thamane ($p \leq 0.05$), respectively. All data were analyzed using the statistical package JMP 5.0®.

Results and discussion

The production variables (g MS MS %) measured in bloom, no significant differences in the evaluated dates, but the fourth assessment obtained from the MS % *U. europaeus* d2 was significantly greater than the other treatments, except for d2 *U. dioica* (Figure 1).

In Figure 1A, the data do not behave according to the expected, especially at the time that three is a decrease in the concentration of the MS, which is not displayed on the production (MS g) on the same date (Figure 1B). However, in general the results agree with the statement of Adler and Chase (2007), noting that the aqueous extracts of legumes positively affect the germination, growth and dry weight of plants within the horticultural them. Aguilar *et al.* (2005) stated that crop fertilization performed in *C. annuum* based on N, P and K increase yield between 56% and 69% (Kotur, 2008). According Ciompi *et al.* (1996) N increases the photosynthetic efficiency and growth of plants; however, *U. europaeus* d2 exists in the lowest concentration of N and P with respect to the other treatments, as it corresponds to the lower doses of extract concentration (Table 2).

This response is corroborated by Bajaj *et al.* (1979) who found greater response in biomass production with the lowest level of N, which is confirmed by Asenjo *et al.* (2000), Haq

plantas, dentro de ellas las hortícolas. Aguilar *et al.* (2005), afirman que fertilizaciones realizadas en cultivo de *C. annuum* a base de N, P y K incrementan el rendimiento entre 56% y 69% (Kotur, 2008). Según Ciompi *et al.* (1996) el N incrementa el crecimiento y eficiencia fotosintética de las plantas, sin embargo, en *U. europaeus* d2 existe la menor concentración de N y P respecto a los demás tratamientos, dado que corresponde a la dosis de menor concentración de extracto (Cuadro 2).

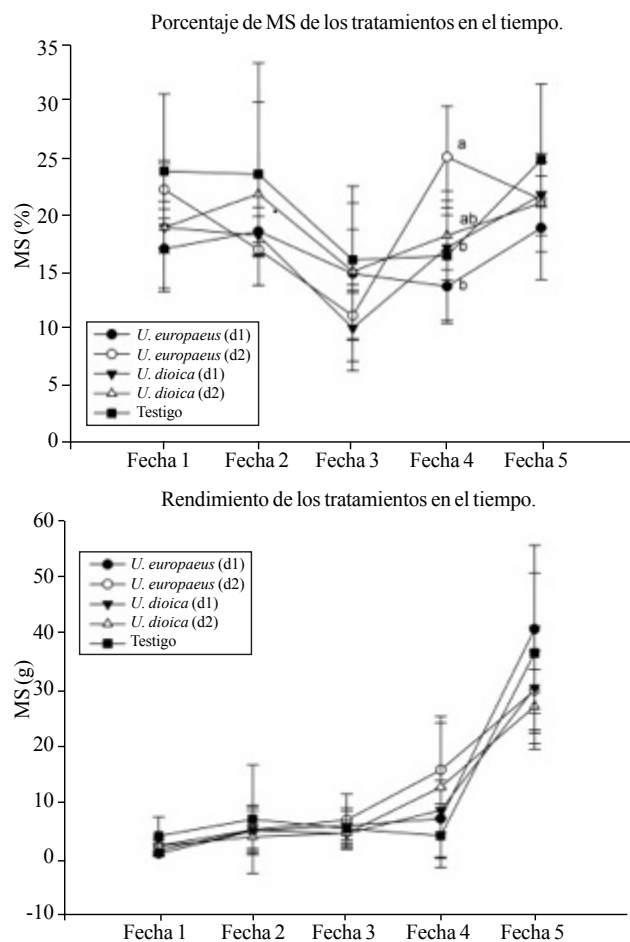


Figura 1. Producción de biomasa de *C. annuum*. A) Contenido MS (%) letras diferentes en el eje Y fecha 4 representan diferencias estadísticamente significativas para la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$); y B) Contenido MS (g) de *C. annuum* en floración y período productivo. Mediciones no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$).

Figure 1. *C. annuum* biomass production. A) MS Content (%) in different letters dated 4 axis represent statistically significant differences for Tukey test ($p \leq 0.05$), and B) Contents MS (g) of *C. annuum* flowering and productive period. Measurements are not significantly different ($p > 0.05$).

Esta respuesta es corroborada por Bajaj *et al.* (1979) quienes encontraron mayor respuesta en producción de biomasa con el nivel más bajo de N, lo que es confirmado por Asenjo *et*

and Mallarino (2000) stating that small amounts of N, P and K applied as a foliar spray significantly increase crop yields. The answer to the extract may be due to its composition, since although this was not determined, the literature indicates the presence of alkaloids and other compounds considered secondary metabolites that cause plant stress (Sepúlveda *et al.*, 2003), possibly leads to the concentration of dry matter, and in some cases associated with the reduction in yield, making production less attractive (Mitchell and Chassy, 2009).

The answer in the fourth round (Figure 1) is explained by the growth stage of the crop (early fruiting) where the concentration of MS is increased, showing a sigmoidal growth. Botanical extracts independent and doses used, the dry weight increased progressively with age of the culture, but decreased in the last measurement, presumably due to the mass loss by foliar senescence (Azofeifa and Moreira, 2004). In this regard, Kläring (1999) found a similar response to evaluate the dry weight accumulation in pepper plants (*C. annuum* var. Grossum), which tends to be sigmoidal (Sedano *et al.*, 2005).

Regarding the fruit biomass production (Figure 2A), no significant differences for the percentage of MSFM. However, in the same figure, in treatments *U. europaeus* d1 and d2, and d1 *U. dioica*, the percentage is significantly higher MSfi *U. dioica* d2 and the control. Biomass production in grams (Figure 2B) showed no significant differences for treatments.

The results presented in the preceding paragraph are not related to the level of nitrogen or phosphorus in the doses of each treatment, since *U. europaeus* d2 has the lowest values thereof while the greatest response in MS %, the explanation may be associated with the origin of the products, especially extracts of the legume *U. europaeus*, which is corroborated by Adler and Chase (2007) noting that the aqueous extracts of species of this family positively affect plant dry weight. Moreover, the concentration of metabolites causing abiotic stress such as alkaloids (Batish *et al.*, 2008) is probably less in *U. dioica* d2 and nonexistent in the control.

The TRC has higher values in the measurements one and two, although the difference with the control measurement in three yes there are differences (Table 3). Ortiz *et al.* (2005) note that the proportion of total biomass generated in *C. annuum* is higher at the beginning of the flowering

al. (2000); Haq y Mallarino (2000) afirmando que pequeñas cantidades de N, P y K aplicados en forma foliar aumentan significativamente el rendimiento de cultivos. La respuesta al extracto es posible se deba a su composición, dado que si bien ésta no fue determinada, la literatura indica la presencia de alcaloides y otros compuestos considerados metabolitos secundarios que causan estrés vegetal (Sepúlveda *et al.*, 2003), lo que posiblemente conduzca a la concentración de materia seca, y en algunos casos asociado a la disminución del rendimiento, haciendo menos atractiva la producción (Mitchell y Chassy, 2009).

La respuesta en la cuarta fecha (Figura 1) se explica por el estado fenológico del cultivo (inicios de fructificación) donde la concentración de MS se incrementa, presentando un crecimiento sigmoidal. Independiente de los extractos botánicos y dosis utilizadas, el peso seco aumentó paulatinamente con la edad del cultivo, para finalmente disminuir en la última medición, probablemente debido a la pérdida de masa foliar por senescencia (Azofeifa y Moreira, 2004). Al respecto, Kläring (1999) encontró una respuesta similar al evaluar la acumulación de peso seco en plantas de pimentón (*C. annuum* var. Grossum), el que tiende a ser sigmoidal (Sedano *et al.*, 2005).

Respecto de la producción de biomasa de fruto (Figura 2A) no existen diferencias significativas para el porcentaje de MSfm. Sin embargo, en la misma figura, en los tratamientos *U. europaeus* d1 y d2, y *U. dioica* d1, el porcentaje MSfi es significativamente superior a *U. dioica* d2 y el testigo. La producción de biomasa en gramos (Figura 2B) no presentó diferencias significativas para los tratamientos evaluados.

Los resultados presentados en el párrafo precedente no están asociados al nivel de nitrógeno ni fósforo de las dosis de cada tratamiento, puesto que *U. europaeus* d2 tiene los valores más bajos de los mismos y a la vez la mayor respuesta en MS%, su explicación puede estar asociada al origen de los productos, especialmente los extractos de la leguminosa *U. europaeus*, lo que es corroborado por Adler y Chase (2007) señalando que los extractos acuosos de especies de esta familia afectan positivamente el peso seco de las plantas. Por otra parte, la concentración de metabolitos causantes de estrés abiótico tales como alcaloides (Batish *et al.*, 2008) es probablemente menor en *U. dioica* d2 e inexistente en el testigo.

La TRC presenta mayores valores en las mediciones uno y dos, aunque sin diferencias con el testigo, que en la medición tres en que sí se observan diferencias (Cuadro

process and less for the rest of the life cycle tending to zero, because the TRC is decreasing with the age of the plant, which is due to the gradual increase in non-assimilatory tissue, increasing the proportion of the structural part with respect to metabolically active tissues because sigmoidal growth curve that characterizes the plant (Sedano *et al.*, 2005).

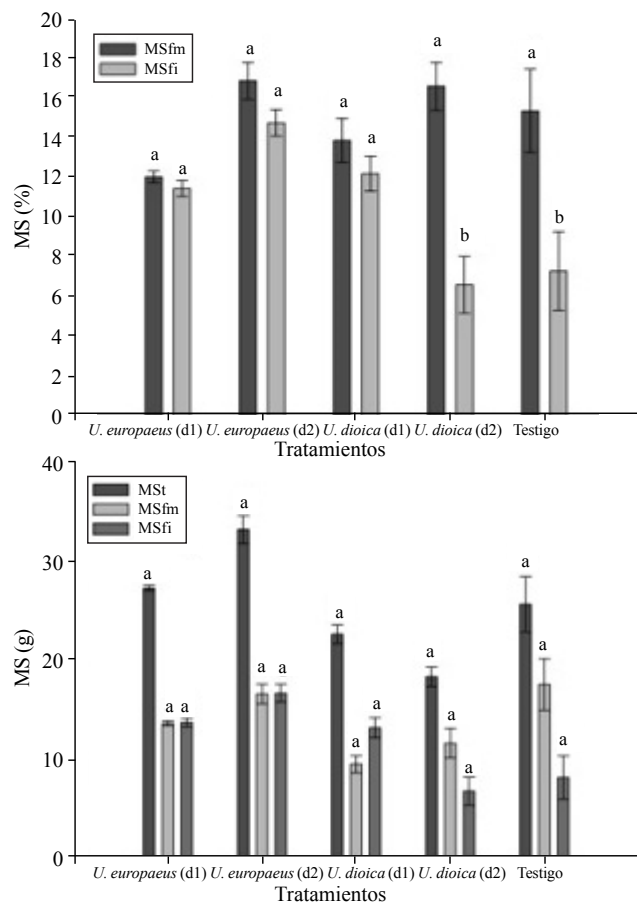


Figura 2. Producción de biomasa de fruto de *C. annuum*. A) Contenido MS (%); y B) Contenido MS (g). Letras distintas en las columnas de igual tono indican diferencias significativas según la prueba de DUNN ($p \leq 0.05$).

Figure 2. Biomass production of fruit of *C. annuum*. A) MS Content (%) and B) MS Content (g). Different letters in the same column indicate significant differences according to tone-testing DUNN ($p \leq 0.05$).

The difference between the control and *U. europaeus* d2 probably due to the lower concentration of stress-causing substances from the extract, since it corresponds to the lower dose. Moreover, the control and the most concentrated dose (*U. europaeus* d1) had negative values, which is related to the deleterious effect of alkaloids, phenolic acids and other metabolites (Reigosa and

3). Ortiz *et al.* (2005) señalan que la proporción de biomasa total generada en *C. annuum* es mayor al inicio del proceso de floración y menor durante el resto del ciclo de vida con tendencia a cero, debido a que la TRC va disminuyendo con la edad de la planta, lo que se debe al aumento gradual de tejido no asimilatorio, incrementando la proporción de la parte estructural con respecto a los tejidos metabólicamente activos, debido a la curva de crecimiento sigmoidal que caracteriza a los vegetales (Sedano *et al.*, 2005).

Pazos-Malvido, 2007), which in low levels and produce a stimulatory effect at high concentrations could eventually cause the opposite effect (Maximum and Lourenco, 2000). In the case of *U. dioica*, phenolic acids present reported by Grevsen *et al.* (2008); and Kopyt'Ko Lapinskaya (2008) and saponins (Oleszek *et al.*, 1999) may have caused the response found. In this regard, and Reigosa and Pazos-Malvido (2007) indicated that phenolic acids and other secondary metabolites have a detrimental effect on plant growth.

Cuadro 3. Tasa relativa de crecimiento (TRC g g⁻¹d⁻¹) en floración.

Table 3. Relative growth rate (TRC g g⁻¹ d⁻¹) in bloom.

Tratamiento	TRC 1 (g g ⁻¹ d ⁻¹)	TRC 2 (g g ⁻¹ d ⁻¹)	TRC 3 (g g ⁻¹ d ⁻¹)
Testigo	0.02 ± 0.21 a	0.01 ± 0.14 a	(-) 0.06 ± 0.08 c
<i>U. europaeus</i> d1	0.13 ± 0.09 a	0.03 ± 0.10 a	(-) 0.01 ± 0.04 b
<i>U. europaeus</i> d2	0.05 ± 0.04 a	0.03 ± 0.10 a	0.08 ± 0.08 a
<i>U. dioica</i> d1	0.10 ± 0.13 a	0.00 ± 0.11 a	0.07 ± 0.05 ab
<i>U. dioica</i> d2	0.07 ± 0.16 a	0.01 ± 0.07 a	0.06 ± 0.11 ab

Letras distintas en las columnas indican diferencias significativas según test de Tukey ($p \leq 0.05$).

La diferencia entre el testigo y *U. europaeus* d2 probablemente se deba a la menor concentración de sustancias causantes de estrés del extracto, dado que corresponde a la dosis más baja. Por otra parte, el testigo y la dosis de mayor concentración (*U. europaeus* d1) presentaron valores negativos, lo que se relaciona con el efecto nocivo de alcaloides, ácidos fenólicos y otros metabolitos (Reigosa y Pazos-Malvido, 2007), que en bajos niveles producen un efecto estimulador y en concentraciones elevadas pudieron eventualmente causar el efecto contrario (Máximo y Lourenco, 2000). Para el caso de *U. dioica*, la presencia ácidos fenólicos reportados por Grevsen *et al.* (2008); Lapinskaya y Kopyt'Ko (2008) y saponinas (Oleszek *et al.*, 1999) pudieron haber causado la respuesta encontrada. Al respecto, Reigosa y Pazos-Malvido (2007) señalan que ácidos fenólicos y otros metabolitos secundarios tienen un efecto detrimental en el crecimiento vegetal.

Polifenoles totales

En el Cuadro 4 se pueden observar diferencias estadísticamente significativas en la concentración de polifenoles en hoja y fruto en dos estados fenológicos de *C. annuum*. En floración el testigo presenta la mayor concentración de polifenoles en hoja, no así al finalizar el ciclo productivo en que los extractos

Total polyphenols

The Table 4 can be observed statistically significant differences in the concentration of polyphenols in the leaf and fruit in two phenological phases of *C. annuum*. At flowering the witness has the highest concentration of polyphenols in leaf, but not the end of the production cycle that extracts presented the highest values except *U. dioica* d1. Regarding the fruit evaluation is clearer effect in favor of *U. europaeus* d2.

The statistical differences found in leaf to flowering and end of the production cycle would be associated with the defense strategies of the plant under conditions of biotic and abiotic stresses (Reyes *et al.*, 2005), in this case, probably because the high level of alkaloids and lectins (Max *et al.*, 2006) of *U. europaeus*, and phenolic acids (Grevsen *et al.* 2008; Lapinskaya and Kopyt'Ko, 2008), and saponins (Oleszek *et al.*, 1999), among others present in *U. dioica*, inducing the synthesis and accumulation of low molecular weight molecules known as metabolites (Sepúlveda *et al.*, 2003), as well as the presence coumarins, quinones and steroids which are reported allelopathic (Batish *et al.*, 2008), which can contribute to the generation of stress on the species treated.

presentan los mayores valores a excepción *U. dioica* d1. Respecto de la evaluación en frutos el efecto es más claro en favor de *U. europaeus* d2.

The concentrations reported in this study are higher than those reported by Lan *et al.* (2005) who obtained in oregano (*Origanum vulgare* L.) and cinnamon (*Cinnamomum verum*)

Cuadro 4. Concentración polifenoles (mg EAG 100 g⁻¹) en hojas y frutos de *C. annuum*.
Table 4. Polyphenol concentration (mg EAG 100 g⁻¹) in leaves and fruits of *C. annuum*.

Tratamiento	Hoja		Frutos
	Floración*	Final del ciclo productivo*	Final del ciclo productivo**
Testigo	4.180.88 ± 0.41 a	2.120.81 ± 0.82 b	2.152.33 b
<i>U. europaeus</i> d1	3.606.43 ± 0.48 ab	3.162.17 ± 0.62 a	1.792.85 b
<i>U. europaeus</i> d2	4.247.95 ± 0.43 a	3.082.13 ± 0.48 ab	2.941.04 a
<i>U. dioica</i> d1	3.097.22 ± 0.46 b	3.149.72 ± 0.41 a	2.364.6 b
<i>U. dioica</i> d2	3.858.80 ± 0.42 a	2.368.18 ± 0.32 b	2.236.37 b

Letras distintas en las columnas indican diferencias significativas según la prueba de Duncan* y de Thamane** ($p \leq 0.05$).

Las diferencias estadísticas encontradas en hoja para floración y final del ciclo productivo estarían asociadas a las estrategias de defensa de la planta ante condiciones de estrés biótico y abiótico (Reyes *et al.*, 2005), en este caso, dado probablemente por el alto nivel de alcaloides y lectinas (Máximo *et al.*, 2006) de *U. europaeus*, y ácidos fenólicos (Grevsen *et al.*, 2008; Lapinskaya, y Kopyt'Ko, 2008) y saponinas (Oleszek *et al.*, 1999), entre otros presentes en *U. dioica*, induciendo la síntesis y acumulación moléculas de bajo peso molecular conocidos como metabolitos secundarios (Sepúlveda *et al.*, 2003), así como también a la presencia cumarinas, quinonas y esteroides de los que se reporta efecto alelopático (Batish *et al.*, 2008), que pueden contribuir a la generación de estrés en la especie tratada.

Las concentraciones reportadas en este estudio son superiores a las señaladas por Lan *et al.* (2005) quienes obtuvieron en orégano (*Origanum vulgare* L.) y canela (*Cinnamomum verum*) entre 540 mg EAG por 100 g⁻¹ y 1.850 mg EAG por 100 g⁻¹, respectivamente. Sin embargo, inferiores a los presentados por Pastore (2006) que reportó entre 8.000 mg EAG por 100 g⁻¹ y 12.000 mg EAG por 100 g⁻¹ en hojas de té verde.

En frutos el comportamiento fue similar al encontrado en hoja, con valores significativamente mayores ($p \leq 0.05$) en *U. europaeus* d2 con diferencias del orden de 36% respecto del testigo, lo que ha sido asociado al efecto estimulante del metabolismo secundario asociado a la presencia de alcaloides u otros compuestos (Batish *et al.*, 2008), en *C. annuum* el efecto fue probado por Adler y Chase (2007). Existen

between EAG 540 mg 100 g⁻¹ and 1.850 mg EAG 100 g⁻¹, respectively. However, lower than those presented by Pastore (2006) which reported EAG 8 000 mg per 100 g⁻¹ and EAG 12 000 mg per 100 g⁻¹ in green tea leaves.

In fruits, the behavior was similar to that found in leaf, with significantly higher values ($p \leq 0.05$) in *U. europaeus* d2 differences of about 36% compared to the control, which has been associated with secondary metabolism stimulating effect associated with the presence of alkaloids or other compounds (Batish *et al.*, 2008), *C. annuum* effect was tested by Adler and Chase (2007). There results directly associated polyphenols concentration and presence of ethylene pigments (Park *et al.*, 2006, Solomon *et al.*, 2006).

Conclusions

Aqueous extracts of *U. europaeus* and *U. dioica*, at the doses evaluated, generated effects in the concentration of biomass production and concentration of polyphenols, d2 dose being *U. europaeus* the one with the highest effect, therefore, it is feasible the use of these extracts in the cultivation of *C. annuum*, to improve functional quality of it.

End of the English version



resultados que asocian directamente la concentración de polifenoles a pigmentos y presencia de etileno (Park *et al.*, 2006; Solomon *et al.*, 2006).

Conclusiones

Los extractos acuosos de *U. europaeus* y *U. dioica*, en las dosis evaluadas, generan efectos en la concentración de la producción de biomasa y concentración de polifenoles, siendo la dosis d2 de *U. europaeus* la de mayor efecto, por lo tanto, es factible la utilización de estos extractos en el cultivo de *C. annuum*, al mejorar calidad funcional de éste.

Literatura citada

- Adler, M. and Chase, C. 2007. Comparison of the allelopathic potential of leguminous summer cover crops: Cowpea, Sunn Hemp, and Velvet bean. *HortScience* 42(2):289-293.
- Aguilar, J.; Gragega, O.; Martínez, M.; Solís, E.; Vuelvas, M.; Medina, T. y Ramírez, A. 2005. Eficiencia de fertilizantes aplicados con fertirriego en Chile ancho (*Capsicum annuum* L.). *Agric. Téc. Méx.* 2(1):177-289.
- Asenjo, M.; González, J. and Maldonado, J. 2000. Influence of humic extracts on germination and growth of ryegrass. United Kingdom. *Commun. Soil. Sci. Plant Anal.* 1-2(31):101-114.
- Ávalos, A.; Pérez-Urria, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. España. *Reduca(biología). Serie Fisiología Vegetal.* 9(2):119-145.
- Azofeifa, A. y Moreira, M. 2004. Análisis del crecimiento del Chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. cv. Hot). Costa Rica. *Agron. Costarricense.* 1(28):57-67.
- Bachman, G. R. and Metzger, J. D. 2008. Growth of bedding plants in commercial potting substrate amended with vermicompost. *Bio. Technol.* 99:3155-3161.
- Bajaj, K.; Kaur, G.; Singh, J. and Brar, J. 1979. Effect of nitrogen and phosphorus levels on nutritive values of sweet peppers (*Capsicum annuum* L.) fruits. *Plant Foods Hum. Nutr.* 4(28):287-292.
- Batish, D.; Singh, H.; Kaur, M.; Kumar, R.; Surender, K. and Yadav, S. 2008. Caffeine affects adventitious rooting and causes biochemical changes in the hypocotyls cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.). Poland. *Acta Physiol. Plantarum.* 30:401-405.
- Bellaloui, N.; Hu, Y.; Mengistu, A.; Kassem, M. and Abel, C. 2013. Effects of foliar boron application on seed composition, cell wall boron, and seed $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ isotopes in water-stressed soybean plants. *Frontiers in Plant Science.* 4:270.
- Bisby, F. 1981. Tribe 32 Genisteae. In: advances in legume systematic. Polhill, R. and Raven P. (Eds.) Royal Botanic Garden, Kew. England. 409-425 pp.
- Chatterjee, B.; Ghanti, P.; Thapa, U. and Tripathy, P. 2005. Effect of organic nutrition in spro broccoli (*Brassica aleraceae* var. italica plenck). *Vegetable Sci.* 33(1):51-54.
- Ciampi, S.; Gentili, L. and Soldatini, G. 1996. The effect of nitrogen deficiency on leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in sunflower. Ireland. *Plant Sci.* 2(118):177-184.
- El-Fouly, M. M.; Zeinab, M. M. and Salama, Z. A. 2002. Micronutrient foliar application increases salt stress tolerance of tomato seedlings. *Acta Hort.* 573: 467-474.
- Fregoni, M. 1986. Some aspects of epigeal nutrition of grapevines. In: First International Symposium of Foliar Fertilization by Schering Agrochemical Division. Alexander, A. (Ed.). Berlin, Alemania. 205-211 pp.
- Georgé, S.; Brat, P.; Alter, P. and Amiot, M. 2005. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. United States. *J. Agric. Food Chem.* 53:1370-1373.
- Giaconi, V. y Escaff, M. 1998. Cultivo de hortalizas. Universitaria, Santiago. Chile. 335 p.
- Grevsen, K.; Fretté, X. and Christensen, L. 2008. Concentration and composition of flavonol glycosides and phenolic acids in aerial parts of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) are affected by nitrogen fertilization and by harvest time. *European J. Hort. Sci.* 1(73):20-27.
- Haq, M. and Mallarino M. 2000. Soybean yield and nutrient composition as affected by early-season foliar fertilization. *Agron. J.* 92:16-24.
- Hawkesford, M.; Horst, W.; Kichey, T.; Lambers, H.; Schjoerring, J.; Skrumager, I. and White, P. 2012. Functions of macronutrients. In: Marschner's mineral nutrition of higher plants. 3th (Ed.). Marschner, P. (ed.). Academic Press. London, UK. 135-178 pp.
- Haynes, R. J. and Goh, K. M. 1977. Review on physiological pathways of foliar absorption. *Sci. Hort.* 7:291-302.
- Hossain, M. B. and Ryu, K. S. 2009. Effect of foliar applied phosphatic fertilizer on absorption pathways, yield and quality of sweet persimmon. *Sci. Hort.* 122: 626-632.
- Howe, J.; Barry, T. and Popay, A. 1988. Voluntary intake and digestion of gorse (*Ulex europaeus* L.) by goats and sheep. United Kingdom. *J. Agric. Sci.* 111:107-114.
- Hussein, M.; Shaaban, M. and El-Saady, A. 2008. Response of cowpea plants grown under salinity stress to pk-foliar applications. *Am. J. Plant Physiol.* 3:81-88.
- Jarma, A.; Rengifo, T. y Araméndiz-Tatis, H. 2006. Fisiología de Stevia (*Stevia rebaudiana*) en función de la radiación en el Caribe colombiano. Análisis de crecimiento. *Agronomía Colombiana.* 1(24):38-47.
- Kläring, H. 1999. Effects of nondestructive mechanical measurements on plant growth: a study with sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). Netherlands. *Scientia Horticulturae.* 3(81):369-375.
- Kotur, S. 2008. Fertilizer management of capsicum (*Capsicum annuum* L.) as influenced by method of raising seedlings, depth of placement and doses P using 32 P-labelled superphosphate. *Indian J. Agric. Sci.* 9(78):757-760.
- Lan, S.; Denys, C.; Kequan, Z.; Jeffrey, M. and Liangli, Y. 2005. Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. *Food Chem.* 3(100):990-997.
- Lapinskaya, E. and Kopyt'ko, Ya. 2008. Composition of the lipophilic fraction of stinging nettle (*Urtica dioica* L. and *Urtica urens* L.) homeopathic matrix tinctures. *Pharmaceutical Chem. J.* 12(42):699-702.
- Matthei, O. 1995. Manual de las malezas que crecen en Chile. Alfabeta. Santiago. Chile. 545 p.

- Máximo, P.; Lourenco, A.; Tei, A. and Wink, M. 2006. Chemotaxonomy of Portuguese *Ulex*: quinolizidine alkaloids as taxonomical markers. *United Kingdom. Phytochemistry*. 17(67):1943-1949.
- Máximo, P. and Lourenco, A. 2000. New Quinolizidine Alkaloids from *Ulex jussiaei*. *J. Natural Products*. 2(63):201-204.
- Mengel, K. and Arneke, W. W. 1982. Effect of potassium on the water potential, the pressure potential, the osmotic potential and cell elongation in leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum*. 54:402-408.
- Mitchell, A. and Chassy, A. 2009. Antioxidants and the nutritional quality of organic agriculture. *In: annual meeting of the American Advancement of Science in Chicago*. United States. 12-16 pp.
- Mohamed, S.; Helmy, H. and Magdy, N. 2013. Physiological and biochemical responses of two cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. to application of organic fertilizers and nile compost in sandy soil. *Am. J. Exp. Agric*. 3(4):698-717.
- Oleszek, W.; Hoagland, R. and Zablotowicz E. 1999. Ecological significance of plant saponins. *In: Principles and practices in plant ecology allelochemical interactions*. Inderjit, I; Dakshini, K. and Foy, C. (Eds.). CRC press. United States. 451-465 pp.
- Ortiz, J.; Reyes, P. y Ortiz, G. 2005. Análisis de crecimiento de Canavalia en zona plana del Valle del Cauca. *In: Tesis Ingeniería Agronómica*. Universidad Nacional de Colombia-Palmira. Palmira, Colombia. 10p.
- Pacheco, R.; Hernández, C.; Reyna, J.; Montes, R. y Ramírez, G. 2004. Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (díptera: culicidae). *Acta Zoologica Mexicana (nueva serie)*. 1(20):141-152.
- Park, Y.; Jung, S.; Kang, S.; Drzewiecki, J.; Namiesnik, J.; Haruenkit, R.; Barasch, D.; Trakhtenberg, S. and Gorinstein, S. 2006. *In vitro* studies of polyphenols, antioxidants and other dietary indices in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Int. J. Food Sci. Nutr*. 57(1-2):107-122.
- Pastore, R. 2006. Potential health benefits of green tea (*Camellia sinensis*). *País diet and nutrition*. 2(6):531-537.
- Reigosa, M. and Pazos-Malvido, E. 2007. Phytotoxic effects of 21 plant secondary metabolites on *Arabidopsis thaliana* germination and root growth. *United States. J. Chem. Ecol*. 7(33):1456-1466.
- Reyes, J.; Yousef, G.; Martínez, R. and Lila, M. 2005. Antioxidant capacity of fruit extracts of blackberry (*Rubus* sp.) produced in different climatic regions. *J. Food Sci*. 7(70):497-503.
- Sedano, G.; González, V.; Engleman, E. y Villanueva, C. 2005. Dinámica del crecimiento y eficiencia fisiológica de la planta de calabacita. *Rev. Chapingo. Serie Horticultura*. 2(11):291-297.
- Sepúlveda, G.; Porta, H. y Rocha, M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. México. *Rev. Mex. Fitopatol*. 3(21):355-363.
- Shaaban, M. M.; El-Fouly, M. M.; El-Zanaty, A.; Abou, A. and Abdel-Maguid, A. 2004. Halophytes and foliar fertilization as useful techniques for growing processing tomatoes in the saline affected soils. *Pakistan J. Biol. Sci*. 7:503-507.
- Solomon, A.; Golubowicz, S.; Yablowicz, Z.; Grossman, S.; Bergman, M.; Gottlieb, H.; Altman, A.; Kerem, Z. and Flaishman, M. 2006. Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *J. Agric. Food Chem*. 20(54):7717-7723.
- Taylor, K. 2009. Biological flora of the British Isles: *Urtica dioica* L. *J. Ecol*. 97:1436-1458.
- Teaca, C.; Bodirlau, R.; Opera, A.; Tanase, C. and Colceru, S. 2008. Influence of plant extracts on germination and pots-germination development of different species. *Romania. Cellulose Chem. Technol*. 1-3(42):121-127.
- Thorp, J. and Lynch, R. 2000. The determination of weeds of national significance. *National Weeds Strategy Executive Committee*, Launceston, Tasmania. 234 p.
- Wood, J.; Senthilmohan, S. and Peskin, A. 2002. Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different pHs. *Food Chemistry*. 2(77):151-161.
- Zareian, A.; Sharif, H.; Hamidi, A.; Mohammadi, G. and Ali, S. 2013. Effect of drought stress and potassium foliar application on some physiological indices of three wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Ann. Biol. Res*. 4(5):71-74.
- Zhao, X.; Chambers, Z.; Loughin, T. and Carey, E. 2007. Consumer sensory analysis of organically and conventionally grown vegetables. *J. Food Sci*. 2(72):87-91.