

EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD FUNGICIDA DE EXTRACTOS CRUDOS DE RAÍCES DE *Heliopsis longipes* CONTRA *Alternaria sp*, *Fusarium sp* Y *Rizophus SP*

G. Morales-López^a, I.C. Torres-Arteaga^a, M. E. Salas-Galván^a, D. Méndez-Valencia^a, G. Carreño-Aguilera^b, J. C. Baltazar Vera^{a,b}, A. Ramos-García^{a*}.

^a Universidad Politécnica del Bicentenario. ^b Departamento de Geomática e Hidráulica. División de Ingenierías, Universidad de Guanajuato.* aramosg@upbicentenario.edu.mx

RESUMEN:

La agricultura intensiva ha provocado el uso elevado de químicos convencionales para el control de agentes patógenos que afectan a los cultivos, causando grandes pérdidas económicas, daños a la salud y contaminación al medio ambiente. El control biológico de plagas y enfermedades en cultivos es una alternativa que busca tener resultados semejantes a la de los productos convencionales pero sin causar daño al ser humano y al medio ambiente. Las N-alcamidas son un grupo de compuestos bioactivos, que se pueden encontrar en diferentes plantas. La afinina es una alcamida que se halla en las raíces de la planta *Heliopsis longipes* que ha mostrado buena actividad antifúngica. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto fungicida de la afinina proveniente de extractos acuosos de Chilcuague (*Heliopsis longipes*) para el control del crecimiento in vitro de hongos fitopatógenos de pimiento morrón *Capsicum annum* en el Estado de Guanajuato. Los resultados de este trabajo muestran que la afinina si tuvo efecto significativo sobre el porcentaje de inhibición radial en los hongos *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.* y *Rhizophus sp*, por lo que puede considerarse a la afinina como alternativa para su control.

ABSTRACT:

Intensive farming has led to the high use of conventional chemicals to control pathogens affecting crops, causing huge economic loss, damage to health and environmental pollution. The biological control of pests and diseases in crops is an alternative that seeks to have similar results to conventional products but without causing harm to humans and the environment. The N-alkamides are a group of bioactive compounds found in different plant families. Affinin is an alkamide which is in the roots of the plant *Heliopsis longipes* which has shown good antifungal activity. The aim of this work was to determine the effect of fungicide affinin from aqueous extracts of Chilcuague (*Heliopsis longipes L.*) for controlling the in vitro growth of plant pathogenic fungi pimiento *Capsicum L. annum* in the state of Guanajuato. The results of this work show that the affinin if had a significant effect on the percentage of inhibition radial fungi *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.* and *Rhizophus sp*, therefore it can be considered as an alternative for control of these fungi.

Palabras clave: afinina, alcamida, fungicida.

Keywords: affinin, alkamide, fungicide.

Área: -Microbiología y Biotecnología

INTRODUCCIÓN

El chile es una hortaliza que se cultiva en casi todo el país en los dos ciclos agrícolas y forma parte del grupo de los principales productos hortofrutícolas exportados. No obstante, el 80% de la producción nacional se consume internamente, lo que determina su importancia como alimento, ya que, además de poseer minerales y vitaminas, es un condimento que está presente en la mayoría de los platillos

mexicanos. La rentabilidad del cultivo de chile en México es limitada año con año debido a las pérdidas ocasionadas por plagas que reducen la cantidad y la calidad de frutos que se cosechan. Debido a que la mayoría de los productores del país tienden al uso de compuestos químicos como el principal método de control, además se tiene un mayor riesgo de presencia de residuos tóxicos en la cosecha. (SAGARPA 2012) Actualmente se han buscado diferentes alternativas para disminuir el uso de insecticidas, fungidas, bactericidas, herbicidas y nemátocidas convencionales. Una de ellas es el control biológico de plagas y enfermedades de plantas el cual busca adquirir los mismos resultados que los productos convencionales pero sin causar daño al ser humano y al medio ambiente.

Las N-Alquilamidas son un grupo promisorio de compuestos bioactivos, estas biomoléculas se pueden encontrar en más de 25 familias de especies de plantas (Boonen et al, 2012). La afinina o espilantol es una alcanamida que se encuentra en las raíces de la planta *H. longipes* (Molina-Torres et al, 1996, Molina-Torres et al., 1999), la cual ha sido usada en medicina tradicional para aliviar dolores de muelas y dolor bucal y para úlceras (Correa et al., 1971; Colvard et al., 2006; Gutiérrez-Lugo et al., 1996), se ha probado su acción insecticida contra el mosquito *Anopheles albimanus* (Hernández et al. 2012), y el efecto sobre la colonización de la raíz del frijol por hongos micorrízicos y la nodulación de bacterias fijadoras de nitrógeno (Salgado et al. 2008).

Por lo que el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto fungicida de extractos crudos acuosos de raíces de *H. longipes* sobre *Alternaria sp*, *Fusarium sp* y *Rizophus sp* aislados de raíces de *Capsicum annum*. Los resultados muestran que se puede considerar a *H. longipes* como una alternativa para el control de estos hongos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis del extracto acuoso de raíces de *H. longipes*

El muestreo de raíces de *H. longipes* se realizó en el municipio Puerto de Tablas, Xichú en la Sierra Gorda del Estado de Guanajuato. Los extractos acuosos de raíces de *H. longipes* se obtuvieron a partir de 5 g de raíces húmedas, las cuales fueron trituradas manual y mecánicamente, y maceradas en agua grado 1 a diferentes temperaturas por 2 y 3 horas, cada extracto se realizó por triplicado. Los extractos se filtraron y fueron almacenados a 4⁰C hasta su uso. Las muestras de los extractos fueron analizadas en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35 UV/Vis de doble az, en modo scan. La afinina se cuantificó en base a la curva de calibración de afinina extraída de un producto comercial con concentración conocida de afinina (Fungotoxinas).

Evaluación del efecto fungicida

Se recolectó material vegetal de pimiento morrón en producción, bajo condiciones controladas de invernadero en Irapuato y Silao de la Victoria, Guanajuato; eligiendo naves con plantas o plántulas con indicios de presencia de hongos, utilizando un muestreo aleatorio, el material vegetal se extrajo con raíz y suelo. Se aislaron e

identificaron tres géneros de hongos, provenientes de las muestras vegetales recolectadas de pimienta.

Para la evaluación del efecto de los extractos se utilizaron bloques experimentales de 3 repeticiones para cada extracto y un testigo; y para cada uno de los hongos aislados del material vegetal recolectado. En la prueba de sensibilidad se utilizaron los extractos de raíz de *H.* (Tabla I), discos de papel filtro de 0.8 cm de diámetro previamente esterilizados y cajas Petri con agar nutritivo PDA (para *Fusarium* sp. y *Rhizopus* sp.) y V8 (para *Alternaria* sp.), atendiendo a la afinidad de cada género de hongo.

Tabla I. Tratamientos utilizados de extractos acuosos.

Tratamiento	Características
1	5 g de raíz húmeda triturada macerada en 10 mL de H ₂ O grado 1 durante 2 h
2	5 g de raíz húmeda triturada macerada en 10 mL de H ₂ O grado 1 durante 3 h
3	5 g de raíz húmeda triturada macerada en 10 mL de H ₂ O grado 1 durante 5 h
4	5 g de raíz seca no triturada macerada en 30 mL de H ₂ O grado 1 durante 2 h
5	5 g de raíz húmeda no triturada macerada en 30 mL de H ₂ O grado 1 durante 2 h
6	5 g de raíz húmeda no triturada macerada en 10 mL de H ₂ O grado 1 durante 2 h
7	5 g de raíz seca no triturada macerada en 10 mL de H ₂ O grado 1 durante 2 h
8	Testigo

El crecimiento o extensión radial de la colonia se determinó midiendo las tres repeticiones de los tratamientos a las 24 y 48 horas; tomando como punto de comparación el crecimiento de control, se calculó el porcentaje de inhibición radial de acuerdo a lo indicado por Singh (2003). Los resultados obtenidos para el porcentaje de inhibición radial, se analizaron estadísticamente empleando una comparación de medias con la prueba de la diferencia mínima significativa (DMS) a un nivel de significancia estadística de $\alpha = 0.05$, con el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis del extracto acuoso de raíces de *H. longipes*

El coeficiente de la curva de calibración para la cuantificación de afinina en los extractos fue de 0.988, el límite de detección de 0.2 mgmL⁻¹, la banda de absorción en UV de 240 a 380 nm. Los resultados se muestran en la Tabla I.

Tabla II. Resultados de las concentraciones de las muestras extraídas en diferentes condiciones.

Muestra	T°C	Triturado	Tiempo de macerado (h)	Concentración (mgmL ⁻¹)
M3	42	Mecánico	3	9.75
M5	39	Mecánico	2	10.35
M6	36	Mecánico	2	10.41
M15	28	Manual	2	6.05
M16	28	Manual	2	6.20

Evaluación del efecto fungicida

Los resultados del porcentaje de inhibición radial en los hongos *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.* y *Rhizophus sp.* se muestran a continuación en la tabla III.

Tabla III. Porcentaje de inhibición radial

Tratamiento	Porcentaje de inhibición radial 24 h			Porcentaje de inhibición radial 48 h		
	<i>Alternaria sp</i>	<i>Fusarium sp</i>	<i>Rhizophus sp</i>	<i>Alternaria sp</i>	<i>Fusarium sp</i>	<i>Rhizophus sp</i>
1	47.23 A	43.75 A	53.54 A	28 B	21.90 CB	0 A
2	18.18 C	7.69 ED	11.53 BC	33.33 A	15.01 ED	0 A
3	0 D	10.93 CD	10.8 BC	13.04 D	11.42 E	0 A
4	15.87 C	22 CB	22.66 B	6.46 E	19.07 CD	0 A

Tratamiento	Porcentaje de inhibición radial 24 h			Porcentaje de inhibición radial 48 h		
	<i>Alternaria sp</i>	<i>Fusarium sp</i>	<i>Rhizophus sp</i>	<i>Alternaria sp</i>	<i>Fusarium sp</i>	<i>Rhizophus sp</i>
5	39.06 BA	30.35 B	0 C	13.04 D	26.26 B	0 A
6	43.75 A	30.77 A	6.89 C	27.27 B	35.83 A	0 A
7	39.07 BA	24.99 CB	1.88 C	20 C	18 CD	0 A
8	0 D	0 ED	0 C	0 F	0 F	0 A
DMS	8.25	11.48	14.1	1.77	5.84	0

Medias seguidas por letras distintas indican diferencia significativa. Se presentan las medias de los tratamientos, su separación se realizó con la prueba de la diferencia mínima significativa (DMS). ($p < 0.05$, $n=3$) siendo los mejores tratamientos para *Alternaria sp* y *Fusarium sp* a las 24 horas el tratamiento 1 y 6, los cuales tienen mayor contenido de afinina que el resto de los tratamientos $10381.48 \mu\text{gmL}^{-1}$ y $6122.69 \mu\text{gmL}^{-1}$ respectivamente. Mientras que para el hongo *Rhizophus sp* el mejor tratamiento es el 1, lo que concuerda con Ramírez et al., 2000 quien indica que existen estudios con distintos, microorganismos que muestran una marcada tendencia a la variación considerable de la acción fungistática de la afinina, según el microorganismo que se evalúe.

Se pudo observar que el efecto fungicida de la afinina al pasar las horas se redujo como se observa en la Tabla III, por lo que a las 48 horas el mejor tratamiento para *Alternaria sp* es el tratamiento 2 con un contenido de afinina de $6056.67 \mu\text{g/ml}$, para *Fusarium sp* el tratamiento 6 siguió siendo el mejor tratamiento igual que a las 24

horas y lo que respecta al *Rhizopus sp* no se presentó diferencia significativa a las 48 horas.

Por lo cual los resultados de este trabajo muestran que la afinina sí tuvo efecto significativo sobre el porcentaje de inhibición radial en los hongos *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.* y *Rhizopus sp.* como se discutió anteriormente.

BIBLIOGRAFÍA

- Boonen, J., Baert, B., Roche, N., Burvenich, C., De Spiegeleer, B. 2010. Transdermal behaviour of the N-alkylamide spilanthol (affinin) from *Spilanthes acmella* (Compositae) extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 127, 77–84.
- Colvard, M.D., Cordell, G.A., Villalobos, R., Sancho, G., Soejarto, D.D., Pestle, W., Lobo, T.E., Perkowitz, K.M., Michel, J., (2006). Survey of medical ethnobotanicals for dental and oral medicine conditions and pathologies. *Journal of Ethnopharmacology* 107, 134–142.
- Correa, J., Roquet, S., Díaz, E., (1971). Multiple NMR analysis of the affinin. *Organic Magnetic Resonance* 3, 1–5.
- Gutiérrez-Lugo, M., Barrientos-Benitez, T., Luna, B., Ramirez-Gama, R., Bye, R., Linares, E., Mata, R., 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of some crude drug extracts from Mexican medicinal plants. *Phytomedicine* 2, 341–347.
- Hernández-Morales, A., Arvizu-Gómez, J.L.; Gómez-Luna, B.E., Ramírez-Chávez, E., Abraham-Juárez, M del R., Martínez-Soto, G., y Molina-Torres, J. (2012). Determinación de la actividad insecticida de *Heliopsis longipes* A. Gray Blake, una planta endémica del Estado de Guanajuato. *Ra Ximhai*, septiembre - diciembre, año/Vol. 8, Número 3
- Molina-Torres, J., Salgado, R., Ramírez, E., del Río, R.E., (1996). Purely olefinic alkaloids in *Heliopsis longipes* and *Acemella (Spilanthes) oppositifolia*. *Biochem. Syst. Ecol.* 24, 43–47.
- Molina-Torres, J., Salgado, R., Ramírez, E., del Río, R.E., (1995). Presence of the ornithyl ester of deca-2E,6Z,8E-trienoic acid in *Heliopsis longipes* roots. *J. Nat. Prod.* 58, 1590–1591.
- Ramírez, E., Lucas, L., Virgen, G., y Molina, J. (2000). Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotium*. *Agrociencia*, 34(2), 207-215.
- SAGARPA (2012). “Mejoramiento integral de la productividad en el cultivo de chile en México para aumentar la competitividad, mediante el incremento del rendimiento y calidad.” 2012.
- Salgado-Garciglia, R., Molina-Torres, J., López-Meza, J.E., y Loeza-Lara, P.D. (2008) Efecto del extracto crudo y los compuestos bioactivos de *Heliopsis longipes* sobre la incidencia de la antracnosis, micorrización y nodulación del frijol. *Agrociencia* 42: 679-688.
- Singh, G. 2003. Studies on essential oils. Chemical and biocidal investigations on *Tagetes erecta* leaf volatile oil. *Flavour and Fragrance J.* 18:62-65.