



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y FITOTÓXICA DE LOS
EXTRACTOS VEGETALES DE *Tulbaghia violacea*,
Piper auritum, *Capsicum chinense*, *Raphanus
sativus*, *Brassica napobrassica*, *Dieffenbachia
amoena*, *Nerium oleander***

**TESIS
QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESENTA:

MARÍA DE LOS ÁNGELES DÍAZ MOTA

Chapingo, Texcoco, México, junio de 2016.



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



Instituto de Horticultura

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y FITOTÓXICA DE LOS EXTRACTOS VEGETALES DE *Tulbaghia violacea*, *Piper auritum*, *Capsicum chinense*, *Raphanus sativus*, *Brassica napobrassica*, *Dieffenbachia amoena*, *Nerium oleander*

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de la M en C María de los Ángeles Díaz Mota autor de la presente tesis de Doctorado en Ciencias en Horticultura estuvo constituido por:

DIRECTORA:



Dra. María del Rosario García Mateos

ASESOR:



Dr. Juan Martínez Solís

ASESOR:



Dr. Marcelo Acosta Ramos

ASESOR:



Dr. Miguel Ángel Serrato Cruz

ASESORA:



Dra. Ma. Teresa Beryl Colinas León

LECTOR EXTERNO:



Dra. Ma. Antonia Pérez Olvera

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de los estudios de Doctorado.

Al Instituto de Horticultura del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, por el apoyo brindado durante mi estancia.

A la Dra. María del Rosario García Mateos por su vocación, profesionalismo, dirección, apoyo, consejos, exhortaciones y sobre todo por la oportunidad de conocerla y tomar lo mejor de usted.

Al Dr. Miguel Ángel Serrato Cruz por su apoyo incondicional, por transmitirme su compromiso y pasión por la ciencia, asimismo por sus valiosas aportaciones y sugerencias que ayudaron a mejorar significativamente el presente trabajo. Gracias.

Al Dr. Juan Martínez Solís por su apoyo, palabras de aliento, asesoría y valiosas aportaciones, solo puedo expresarle mi más sincero agradecimiento.

Al Dr. Marcelo Acosta Ramos por sus palabras de aliento, asesoría, confianza y apoyo para la culminación de la presente investigación.

A la Dra. Ma. Teresa Colinas León por su asesoría, aportes y apoyo, le expreso mis más sincero respecto y admiración.

A la Dra. Ma. Antonia Pérez Olvera por su amable colaboración como lector externo. Gracias.

A mis compañeros y amigos de generación: Caridad, Nallely, Sandra, Teresa, Cecilia, Carmen, Samir, Luis, Marcelo, Juan, Roberto y Miguel Ángel, gracias por su amistad.

DEDICATORIA

A Dios por permitirme culminar esta etapa de mi vida, gracias y te amo.

Sharon y Evelyn por ser la bendición más grande que Dios podía brindarme,
las amo y siempre será así.

A mi amado esposo Evaristo, gracias por tu amor, consejos y apoyo
incondicional. Dios te bendiga.

A ti mamita por que has sido mi ejemplo de perseverancia, por tu apoyo en
todos los momentos de mi vida, te amo.

Armando y Gerardo los amo mis queridos hermanos, solo les puedo decir
gracias y que Dios los bendiga.

***“Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni
desmayes, porque Jehová tu Dios estará contigo en dondequiera que
vayas”. Josué 1:9***

DATOS BIOGRÁFICOS

Originaria de Mangas municipio de Tezontepec de Aldama Hidalgo, realizó sus estudios de Licenciatura en la Universidad Autónoma Chapingo, obteniendo el Título de Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola. Posteriormente, realizó los estudios de Maestría obteniendo el grado de Maestra en Ciencias en Fitopatología en el año 2003 en el Colegio de Posgraduados.

En el periodo 2003-2012 se desempeñó profesionalmente en el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, donde participó en actividades de inspección y supervisión de mercancías agropecuarias.

Realizó estudios de Doctorado en el Instituto de Horticultura del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo en el periodo 2012-2015.

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| AGRADECIMIENTOS..... | iii |
| DEDICATORIA | iv |
| DATOS BIOGRÁFICOS..... | v |
| ÍNDICE..... | vi |
| ÍNDICE DE CUADROS..... | ix |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | xi |
| 1 RESUMEN..... | xiv |
| 2 INTRODUCCIÓN GENERAL..... | 1 |
| 3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 6 |
| CAPÍTULO I..... | 7 |
| MARCO DE REFERENCIA..... | 7 |
| 1. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (antracnosis) | 7 |
| 1.1 Generalidades de antracnosis..... | 7 |
| 1.2 Pérdidas por antracnosis..... | 9 |
| 1.3 Clasificación taxonómica de acuerdo con Agrios (2005): | 9 |
| 1.4 Proceso de infección..... | 10 |
| 1.5 Síntomas de antracnosis..... | 12 |
| 1.6 Control de antracnosis..... | 13 |
| 2. <i>Botrytis cinerea</i> (moho gris) | 15 |
| 2.1 Generalidades del moho gris..... | 15 |
| 2.2 Pérdidas por moho gris..... | 16 |
| 2.3 Clasificación taxonómica:..... | 17 |
| 2.4 Proceso de infección..... | 17 |
| 2.5 Síntomas de moho gris..... | 18 |
| 2.6 Control de Moho gris..... | 19 |
| 3. <i>Sphaerotheca fuliginea</i> (cenicilla) | 20 |
| 3.1 Generalidades de la cenicilla..... | 20 |
| 3.2 Pérdidas por cenicilla..... | 21 |
| 3.3 Clasificación taxonómica:..... | 21 |
| 3.4 Proceso de infección..... | 21 |
| 3.5 Síntomas de cenicilla..... | 22 |

| | |
|---|-----|
| 3.6 Control de cenicilla | 22 |
| 4 Metabolitos secundarios | 22 |
| 4.1 Clasificación de los metabolitos secundarios..... | 24 |
| 5 Extractos vegetales | 32 |
| 6 Plantas seleccionadas para el estudio | 34 |
| 6.1 <i>Capsicum chinense</i> Jacq. (Chile habanero)..... | 34 |
| 6.2 <i>Dieffenbachia amoena</i> Bull. (Amoena) | 38 |
| 6.3 <i>Piper auritum</i> Kunth (Hoja Santa) | 40 |
| 6.4 <i>Nerium oleander</i> L. (Adelfa)..... | 43 |
| 6.5 <i>Tulbaghia violacea</i> Harv. (Ajillo)..... | 47 |
| 6.6 <i>Raphanus sativus</i> L. (Nabo blanco)..... | 49 |
| 6.7 <i>Brassica napobrassica</i> (L.) Mill. (Colza)..... | 52 |
| 7 Metodologías <i>in vitro</i> para la evaluación antifúngica. | 55 |
| 8 Concentración Inhibitoria Media (CI ₅₀) | 57 |
| 9 LITERATURA CITADA..... | 58 |
| CAPÍTULO II | 86 |
| ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i> DE EXTRACTOS DE LAS ESPECIES <i>Piper auritum</i> , <i>Tulbaghia violacea</i> Y <i>Capsicum chinense</i> SOBRE <i>Colletotrichum</i> <i>gloeosporioides</i> Y <i>Botrytis cinerea</i> | 86 |
| RESUMEN..... | 86 |
| ABSTRACT | 87 |
| INTRODUCCIÓN | 88 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 91 |
| RESULTADOS | 96 |
| DISCUSIÓN | 104 |
| CONCLUSIONES..... | 110 |
| LITERATURA CITADA..... | 111 |
| CAPÍTULO III | 123 |
| FITOTOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS DE LAS ESPECIES <i>Dieffenbachia</i> <i>amoena</i> , <i>Nerium oleander</i> , <i>Raphanus sativus</i> Y <i>Brassica napobrassica</i> | 123 |
| RESUMEN..... | 123 |
| ABSTRACT | 124 |
| INTRODUCCIÓN | 125 |

| | |
|---|-----|
| MATERIALES Y MÉTODOS | 126 |
| RESULTADOS | 130 |
| DISCUSIÓN | 139 |
| CONCLUSIONES..... | 143 |
| LITERATURA CITADA..... | 144 |
| CAPÍTULO IV..... | 147 |
| EVALUACIÓN DE EXTRACTOS DE CUATRO ESPECIES VEGETALES CONTRA CENICILLA (<i>Sphaerotheca fuliginea</i>) EN PLÁNTULAS DE PEPINO BAJO INVERNADERO | 147 |
| RESUMEN..... | 147 |
| ABSTRACT | 148 |
| INTRODUCCIÓN | 149 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 151 |
| RESULTADOS | 155 |
| DISCUSIÓN | 158 |
| CONCLUSIONES..... | 162 |
| LITERATURA CITADA..... | 163 |
| 4 CONCLUSIONES GENERALES | 171 |

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO I

MARCO DE REFERENCIA

| | | |
|-----------|---|----|
| Cuadro 1. | Número de Metabolitos Secundarios (MS) reportados en plantas superiores (Irchhaiya <i>et al.</i> , 2015)..... | 24 |
| Cuadro 2. | Principales clases de terpenoides en las plantas..... | 32 |
| Cuadro 3. | Estudios de actividad biológica de extractos de <i>Capsicum chinense</i> | 37 |
| Cuadro 4. | Estudios de actividad biológica de extractos de varias especies de <i>Dieffenbachia</i> | 40 |
| Cuadro 5. | Estudios de actividad biológica de extractos de <i>Piper auritum</i> | 43 |
| Cuadro 6. | Estudios de actividad biológica de extractos de <i>Nerium oleander</i> | 46 |
| Cuadro 7. | Estudios de actividad biológica de extractos de <i>Tulbaghia violacea</i> | 48 |
| Cuadro 8. | Estudios de actividad biológica de extractos de <i>Raphanus sativus</i> | 51 |
| Cuadro 9. | Estudios de actividad biológica de extractos de <i>Brassica napobrassica</i> | 54 |

CAPÍTULO II

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA IN VITRO DE EXTRACTOS DE LAS ESPECIES *Piper auritum*, *Tulbaghia violacea* Y *Capsicum chinense* SOBRE *Colletotrichum gloeosporioides* Y *Botrytis cinerea*

| | | |
|-----------|---|-----|
| Cuadro 1. | Características geográficas de los sitios de colecta, tipo de tejido y número de registro de las tres especies de estudio..... | 92 |
| Cuadro 2. | Cuadros medios del análisis de varianza de la inhibición de dos cepas del hongo <i>C. gloeosporioides</i> y <i>B. cinerea</i> por los extractos crudos metanólicos de <i>P. auritum</i> , <i>T. violacea</i> y <i>C. chinense</i> y del extracto crudo de diclorometano de <i>C. chinense</i> | 97 |
| Cuadro 3. | Efecto de los extractos metanólicos crudos de <i>P. auritum</i> , <i>T. violacea</i> y <i>C. chinense</i> y del extracto de diclorometano crudo de <i>C. chinense</i> a seis concentraciones, en el porcentaje de inhibición en <i>C. gloeosporioides</i> y <i>B. cinerea</i> | 100 |
| Cuadro 4. | Análisis fitoquímico de los extractos metanólicos crudos de <i>P. auritum</i> , <i>T. violacea</i> y <i>C. chinense</i> y del extracto de diclorometano crudo de <i>C. chinense</i> | 104 |

CAPÍTULO III
FITOTOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS DE LAS
ESPECIES *Dieffenbachia amoena*, *Nerium oleander*,
Raphanus sativus* Y *Brassica napobrassica

| | | |
|-----------|--|-----|
| Cuadro 1. | Características geográficas de los sitios de colecta, tipo de tejido y número de registro de las cuatro especies de estudio..... | 127 |
| Cuadro 2. | Efecto de los extractos crudos en la germinación y el vigor por especie de semilla..... | 131 |
| Cuadro 3. | Análisis fitoquímico del extracto metanólico crudo de cuatro especies vegetales..... | 138 |

CAPÍTULO IV
EVALUACIÓN DE EXTRACTOS DE CUATRO
ESPECIES VEGETALES CONTRA CENICILLA
(*Sphaerotheca fuliginea*) EN PLÁNTULAS DE PEPINO
BAJO INVERNADERO

| | | |
|-----------|--|-----|
| Cuadro 1. | Características geográficas de los sitios de colecta, tipo de tejido y número de registro de las cuatro especies de estudio..... | 152 |
| Cuadro 2. | Cuadrados medios del análisis de varianza de la Severidad y Efectividad biológica de los extractos crudos metanólicos de <i>T. violacea</i> , <i>R. sativus</i> , <i>B. napobrassica</i> y <i>D. amoena</i> contra <i>S. fuliginea</i> | 155 |
| Cuadro 3. | Severidad de daño (S), Efectividad biológica (E) y Fitotoxicidad como efecto de las concentraciones de los extractos aplicados contra cenicilla en hojas de pepino..... | 157 |
| Cuadro 4. | Análisis fitoquímico de los extractos de las cuatro especies vegetales..... | 158 |

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

MARCO DE REFERENCIA

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1. | Ciclo biológico de antracnosis causada por <i>Glomerella cingulata</i> y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Agrios, 2002)..... | 12 |
| Figura 2. | Estructura de algunos de los núcleos alcaloídicos más sencillos..... | 25 |
| Figura 3. | Elementos del metabolismo del carbono en relación con las rutas de síntesis de metabolitos secundarios (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009)..... | 26 |
| Figura 4. | Estructura de compuesto azufrado (Aliina)..... | 27 |
| Figura 5. | Estructura de los glucosinolatos..... | 28 |
| Figura 6. | Estructura genérica de flavonoides..... | 29 |
| Figura 7. | Representación esquemática de varias vías de biosíntesis de productos naturales en las plantas para ilustrar cómo se coordinan las interacciones entre los compartimentos intracelulares (TCA, ciclo de ácido tricarbóxico; IPP, isopentenil difosfato; Phe, fenilalanina; G3P, gliceraldehído 3-fosfato) (Wu and Chappell, 2008)..... | 30 |
| Figura 8. | Estructura de monoterpeneo (C ₁₀)..... | 31 |
| Figura 9. | <i>Capsicum chinense</i> Jacq..... | 36 |
| Figura 10. | Estructura básica de los capsaicinoides..... | 36 |
| Figura 11. | <i>Dieffenbachia amoena</i> Bull..... | 39 |
| Figura 12. | Estructura química de la sapogenina esteroide (R=H, sapogenina esteroide)..... | 39 |
| Figura 13. | <i>Piper auritum</i> Kunth..... | 41 |
| Figura 14. | Estructura química de la Piperina..... | 42 |
| Figura 15. | <i>Nerium oleander</i> L..... | 44 |
| Figura 16. | Estructura química de la Oleandrina..... | 45 |
| Figura 17. | <i>Tulbaghia violacea</i> Harv..... | 47 |
| Figura 18. | Estructura química de Aliina..... | 48 |
| Figura 19. | <i>Raphanus sativus</i> L. | 50 |
| Figura 20. | Estructura general de los glucosinolatos..... | 51 |
| Figura 21. | <i>Brassica napobrassica</i> (L.) Mill..... | 53 |

CAPÍTULO II
ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA IN VITRO DE EXTRACTOS DE LAS ESPECIES *Piper auritum*, *Tulbaghia violacea* Y *Capsicum chinense* SOBRE *Colletotrichum gloeosporioides* Y *Botrytis cinerea*

| | | |
|-----------|--|-----|
| Figura 1. | Efecto de tres extractos metanólicos crudos de <i>P. auritum</i> (<i>P.a (M)</i>), <i>T. violacea</i> (<i>T. v (M)</i>), <i>C. chinense</i> (<i>C. c (M)</i>) y un extracto de diclorometano crudo de <i>C. chinense</i> (<i>C. c (D)</i>), en el porcentaje de inhibición micelial de dos cepas de <i>C. gloeosporioides</i> (gris y rosa) y <i>B. cinerea</i> . Medias con la misma letra dentro de las cepas son estadísticamente iguales con base en la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)..... | 98 |
| Figura 2. | Efecto de los extractos metanólicos crudos de <i>P. auritum</i> , <i>T. violacea</i> y <i>C. chinense</i> y del extracto de diclorometano crudo de <i>C. chinense</i> a seis concentraciones, en el porcentaje de inhibición de A) <i>C. gloeosporioides</i> (Cepa Gris); B) <i>C. gloeosporioides</i> (Cepa Rosa). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales con base en la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)..... | 101 |
| Figura 3. | Efecto de los extractos metanólicos crudos de <i>P. auritum</i> , <i>T. violacea</i> y <i>C. chinense</i> y del extracto de diclorometano crudo de <i>C. chinense</i> a seis concentraciones, en el porcentaje de inhibición de <i>B. cinerea</i> . Medias con la misma letra dentro de las cepas son estadísticamente iguales con base en la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)..... | 103 |

CAPÍTULO III
FITOTOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS DE LAS ESPECIES *Dieffenbachia amoena*, *Nerium oleander*, *Raphanus sativus* Y *Brassica napobrassica*

| | | |
|-----------|--|-----|
| Figura 1. | Efecto del extracto metanólico <i>D. amoena</i> sobre el porcentaje de germinación de cinco especies vegetales..... | 144 |
| Figura 2. | Efecto del extracto metanólico crudo de <i>N. oleander</i> sobre el porcentaje de germinación de cinco especies vegetales..... | 144 |
| Figura 3. | Efecto del extracto metanólico crudo de <i>R. sativus</i> sobre el porcentaje de germinación de cinco especies vegetales..... | 145 |
| Figura 4. | Efecto del extracto metanólico crudo de <i>B. napobrassica</i> sobre el porcentaje de germinación de cinco especies vegetales..... | 145 |
| Figura 5. | Efecto del extracto metanólico crudo de <i>D. amoena</i> en el crecimiento de la longitud de la raíz (LR) de cinco especies vegetales..... | 146 |

| | | |
|------------|--|-----|
| Figura 6. | Efecto del extracto metanólico crudo de <i>N. oleander</i> en el crecimiento de la longitud de la raíz (LR) de cinco especies vegetales..... | 147 |
| Figura 7. | Efecto del extracto metanólico crudo de <i>R. sativus</i> en el crecimiento de la longitud de la raíz (LR) de cinco especies vegetales..... | 147 |
| Figura 8 | Efecto del extracto metanólico crudo de <i>B. napobrassica</i> en el crecimiento de la longitud de la raíz (LR) de cinco especies vegetales..... | 148 |
| Figura 9. | Efecto del extracto metanólico crudo de <i>D. amoena</i> en el crecimiento de la longitud de la parte aérea (LPA) de cinco especies vegetales..... | 148 |
| Figura 10. | Efecto del extracto metanólico crudo de <i>N. oleander</i> en el crecimiento de la longitud de la parte aérea (LPA) de cinco especies vegetales..... | 149 |
| Figura 11. | Efecto del extracto metanólico crudo de <i>R. sativus</i> en el crecimiento de la longitud de la parte aérea (LPA) de cinco especies vegetales..... | 149 |
| Figura 12. | Efecto del extracto metanólico crudo de <i>B. napobrassica</i> en el crecimiento de la longitud de la parte aérea (LPA) de cinco especies vegetales..... | 150 |

CAPÍTULO IV

EVALUACIÓN DE EXTRACTOS DE CUATRO ESPECIES VEGETALES CONTRA CENICILLA (*Sphaerotheca fuliginea*) EN PLÁNTULAS DE PEPINO BAJO INVERNADERO

| | | |
|-----------|--|-----|
| Figura 1. | Efecto de los cuatro extractos sobre la severidad del daño y efectividad biológica en <i>S. fuliginea</i> . Medias con la misma letra son estadísticamente iguales con base en la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)..... | 156 |
|-----------|--|-----|

**ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y FITOTÓXICA DE LOS EXTRACTOS VEGETALES de
Tulbaghia violacea, *Piper auritum*, *Capsicum chinense*, *Raphanus sativus*, *Brassica
napobrassica*, *Dieffenbachia amoena*, *Nerium oleander***

**ANTIFUNGAL AND PHYTOTOXIC ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS OF *Tulbaghia violacea*,
Piper auritum, *Capsicum chinense*, *Raphanus sativus*, *Brassica napobrassica*,
Dieffenbachia amoena, *Nerium oleander***

María de los Ángeles Díaz Mota¹ y María del Rosario García Mateos²

1 RESUMEN

RESUMEN

Los aleloquímicos son metabolitos sintetizados principalmente por vegetales y participan en los mecanismos de defensa y comunicación entre especies; presentan actividad biológica contra hongos, bacterias, malezas, insectos, nematodos, entre otros. Estos productos naturales presentan ventajas con respecto a los plaguicidas sintéticos debido a que son biodegradables, no generan resistencia y provocan menos desequilibrios en el ecosistema. El objetivo del trabajo fue evaluar la actividad antifúngica de extractos vegetales *in vitro* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea* e *in vivo* sobre *Sphaerotheca fuliginea* y su actividad fitotóxica en semillas. Los extractos se obtuvieron mediante un equipo Soxhlet durante 48 h, se concentró a presión reducida en un rotaevaporador Büchi® y la naturaleza química de los metabolitos se identificó por cromatografía en capa fina. Se realizó análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$). El extracto metanólico crudo de *T. violacea* a una concentración de 100 % fue el extracto que presentó el mayor (90 %) efecto de inhibición del crecimiento micelial en las cepas gris y rosa de *Colletotrichum gloeosporioides*, con una CI_{50} de 29.3 y 23.2 %, respectivamente. En *B. cinerea* el extracto que mostró los mejores resultados fue el de diclorometano de *C. chinense* porque a la concentración de 60 % afectó el crecimiento micelial en 52.4 % y una CI_{50} de 61.7 %. En contraste, *P. auritum* a la concentración de 100 % mostró una inhibición del crecimiento micelial de 60.2 % y una CI_{50} de 84.4 %, extractos que mostraron la presencia de alcaloides en el análisis fitoquímico. El extracto metanólico de *B. napobrassica* presentó el mayor efecto fitotóxico al inhibir la germinación (85 %) de la mayoría de las semillas y afectar el crecimiento de la longitud de raíz (92 % de inhibición) y longitud de la parte aérea (76 % de inhibición). Además, el extracto de *T. violacea* fue el que mostró la mayor efectividad biológica (32.8 %) en *S. fuliginea* en plántulas de pepino en condiciones de invernadero en comparación con los demás extractos evaluados (*R. sativus*, *D. amoena* y *B. napobrassica*). Se identificaron flavonoides, terpenoides y alcaloides en *P. auritum*; flavonoides en *T. violacea*; alcaloides en *C. chinense* y glucosinolatos en *R. sativus* y *B. napobrassica*.

Palabras clave: germinación, hongos fitopatógenos, inhibición, metabolitos secundarios, vigor.

ABSTRACT

Allelochemicals are metabolites synthesized primarily by plants and are involved in their defense mechanisms and communication between species; they have biological activity against fungi, bacteria, weeds, insects and nematodes, among others. These natural products have certain advantages over synthetic pesticides because they are biodegradable, do not generate resistance and cause fewer imbalances in the ecosystem. The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of plant extracts *in vitro* on *Colletotrichum gloeosporioides* and *Botrytis cinerea* and *in vivo* on *Sphaerotheca fuliginea* and their phytotoxic activity in seeds. Extracts were obtained using a Soxhlet device for 48 h and concentrated under reduced pressure in a Büchi® rotary evaporator; the chemical nature of the metabolites was identified by thin layer chromatography. Analysis of variance and Tukey's comparison of means test ($P \leq 0.05$) were performed. Crude methanolic extract of *T. violacea* at a concentration of 100 % was the extract that had the highest (90 %) inhibition effect on mycelial growth in gray and pink strains of *Colletotrichum gloeosporioides*, with an IC_{50} of 29.3 and 23.2 %, respectively. In *B. cinerea* the dichloromethane extract of *C. chinense* showed the best results as the 60 % concentration inhibited mycelial growth by 52.4 % and had an IC_{50} of 61.7 %. By contrast, *P. auritum* at the 100 % concentration showed 60.2 % mycelial growth inhibition and an IC_{50} of 84.4. The methanolic extract of *B. napobrassica* had the highest phytotoxic effect by inhibiting germination (85 %) of most seeds and affecting root and shoot length growth (92 and 76 % inhibition, respectively). In addition, the *T. violacea* extract showed the greatest biological effectiveness (32.8 %) on *S. fuliginea* in cucumber seedlings under greenhouse conditions compared to the other extracts tested (*R. sativus*, *D. amoena* and *B. napobrassica*). The phytochemical analysis showed the presence of glucosinolates. Flavonoids, terpenoids and alkaloids were identified in *P. auritum*; *T. violacea* flavonoid; alkaloids *C. chinense* and glucosinolate in *R. sativus* and *B. napobrassica*.

Keywords: germination, phytopathogenic fungi, inhibition, secondary metabolites, vigor.

2 INTRODUCCIÓN GENERAL

En la agricultura mundial, las plagas y enfermedades son responsables de pérdidas económicas cuantiosas; el daño que ocasionan no sólo se refiere a las pérdidas de producción económica, sino también a las pérdidas en la producción biológica debida a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes atacadas por estos microorganismos (Agrios, 2005).

“Las enfermedades y las malezas en las plantas suelen ser una limitante en la producción de cualquier cultivo, por lo que un factor importante a considerar es su control. Existen diferentes métodos que pueden ser usados, pero el más empleado es la aplicación de productos químicos sintéticos” (Juárez-Becerra *et al.*, 2010).

En la búsqueda de alternativas para el control de plagas se ha estudiado el uso de productos naturales derivados de plantas, como son los metabolitos secundarios sintetizados por esos organismos como mecanismo de defensa y de comunicación. La importancia que tienen los metabolitos secundarios obtenidos de plantas se ha evidenciado recientemente por sus propiedades fitotóxicas (herbicidas) (García-Mateos *et al.*, 2013) y por ser potentes antifúngicos, antibacterianos, estimuladores del desarrollo fisiológico de la planta, entre otros efectos biológicos (Kagale, 2004).

En México se localiza el 10 % de las especies de plantas superiores del mundo (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007); no obstante la gran diversidad, existen muy pocas especies estudiadas con actividad antifúngica, en particular en los hongos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea* (Paull *et al.*, 1997; Kadir *et al.*, 2008; Juárez-Becerra *et al.*, 2010). El control de *C. gloeosporioides* en papaya

en etapa de poscosecha se logra mediante tratamiento de frutos con agua caliente, con calor o con fungicidas químicos (Couey *et al.*, 1984); sin embargo, el tratamiento térmico conduce a una mayor senescencia, mientras que los tratamientos químicos pueden causar daños que disminuyen la calidad poscosecha de la fruta (Lay-Yee *et al.*, 1998), lo que hace necesario el desarrollo de alternativas al empleo de fungicidas sintéticos para reducir los riesgos ambientales y aumentar la confianza del consumidor (Kadir *et al.*, 2008). En trabajos sobre el aprovechamiento de extractos para el biocontrol de *C. gloeosporioides*, se consigna que el extracto crudo de *Piper auritum* inhibe el crecimiento micelial (Baños-Guevara *et al.*, 2004; Hernández-Albíter *et al.*, 2007; Pineda *et al.*, 2012) y el extracto crudo de *Nerium oleander* también tiene actividad antifúngica (Bomfim-Celoto *et al.*, 2008).

El moho gris (*Botrytis cinerea*) es un hongo que se desarrolla mejor en clima fresco húmedo, y puede ser devastador si el clima lluvioso coincide con la cosecha cuando la fruta está madura y muy susceptible, de igual forma aparece en etapa de poscosecha (Juárez-Becerra *et al.*, 2010). Contra este patógeno, en estudios realizados con el extracto de *Capsicum chinense* se observa actividad antifúngica (Wilson *et al.*, 1997) respuesta que también se tiene al aplicar extractos de *Tulbaghia violacea* (Lindsey y Standen, 2004; Nteso y Pretorius, 2006).

En cuanto a sustancias vegetales fitotóxicas se ha encontrado que el extracto acuoso de *N. oleander* inhibe la germinación de cinco especies de arvenses, o bien, el extracto de *Calia secundiflora* puede estimular la germinación en *Ipomoea purpurea* (Alfonso *et al.*, 2005; García-Mateos *et al.*, 2011); sin

embargo, el extracto de *Azadirachta indica* estimula la germinación de semillas y el crecimiento de los brotes de *O. sativa* (Xuan *et al.*, 2004). Asimismo, se han realizado estudios con especies de la familia *Brassicaceae* donde se han encontrado efectos fitotóxicos en *Lactuca sativa* y *Sorghum halepense*. Este escenario novedoso y contradictorio, estimula aún más la investigación sobre la actividad fitotóxica de extractos vegetales, ya que las posibilidades de desarrollar nuevos herbicidas a partir de sustancias vegetales es un idea promisorio para la investigación nacional, sobre todo porque la importación o pago a multinacionales que patentan estos agroquímicos es considerable desde el punto de vista económico (Albuquerque *et al.*, 2011; March, 2014); las implicaciones que tienen estos agroquímicos al ambiente y al humano no son menos importantes (Gómez-Tovar y Gómez-Cruz, 2004; Chiapusio *et al.*, 2004). Además, la tendencia del costo de estos insumos no sigue una tendencia a la baja, lo que está relacionado con la costeabilidad de los sistemas de producción agrícola.

La cenicilla causada por *Sphaerotheca fuliginea*, es una enfermedad ampliamente distribuida y causa graves daños en plantas de pepino en campo e invernadero (Chávez-Solís *et al.*, 2013). El control de la enfermedad se realiza con el uso de fungicidas a base de azufre y los inhibidores de la biosíntesis de esteroides (Reuveni *et al.*, 2000). Sin embargo, se han reportado cepas resistentes a fungicidas en cucurbitáceas (Reuveni y Reuveni, 1998). Actualmente se están realizando trabajos con extractos de plantas y aceites vegetales como métodos alternativos para el control de la enfermedad (Al Surhane, 2013). Los extractos de *Reynoutria sachalinensis*, *Azadirachta indica*, *Zingiber officinale*, *Allium sativum*, *Allium cepa*, *Syzygium aromaticum*, *Olea europaea* y *Nigella sativa* se

han evaluado contra este hongo (Wurms *et al.*, 1999; Apablaza *et al.*, 2002; Tohamy *et al.*, 2002; Zhanga *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010; Al Surhane, 2013).

Retomando la información previa antes expuesta, el presente trabajo de investigación se integró de cuatro capítulos, el primero de ellos abordando el Marco de Referencia cubierto mediante investigación documental sobre temáticas centrales que componen el fenómeno de estudio. Y en los Capítulos II, III y IV en los que se realizó investigación experimental abarcando los siguientes temas: a) actividad antifúngica de extractos vegetales contra *C. gloeosporioides* y *B. cinerea* (Capítulo II); b) fitotoxicidad de los extractos en semillas de especies arvenses y cultivadas (Capítulo III); y c) la actividad antifúngica *in vivo* contra *S. fuliginea* (Capítulo IV).

Si bien hay antecedentes del efecto biológico donde se indica que los extractos de *P. auritum* sobre *C. gloeosporioides* tienen actividad antifúngica, no se cuenta con reportes sobre el efecto biológico que puede ocasionar los extractos de *T. violacea* y *C. chinense* contra ese patógeno. Por otra parte, los extractos de *T. violacea* y *C. chinense* evaluados *in vitro* contra *B. cinerea* tienen actividad antifúngica, pero extractos de *P. auritum* aún no se evalúan contra *B. cinerea*. El empleo de disolventes para la obtención de extractos vegetales es un aspecto importante para precisar ya que está relacionado con la actividad biológica, es el caso en el que se encuentran los extractos de *C. chinense* porque al comparar extractos metanólicos y los obtenidos mediante diclorometano, disolventes con diferente polaridad, afectan la eficiencia de extracción de los capsaicinoides, metabolitos secundarios responsables de la actividad antifúngica (Peusch *et al.*, 1997; Chinn *et al.*, 2011).

Acerca de la actividad alelopática del extracto de *N. oleander* puede inhibir la germinación de *L. sativa* (Anjum *et al.*, 2010); mientras que el extracto de *Dieffenbachia picta* estimula la germinación de *L. sativa* (Hoffmann *et al.*, 2007); pero los extractos de *Brassica napobrassica* y *Raphanus sativus* muestran efectos alelopáticos en *Sorghum halepense*, asimismo en *Kochia arenaria* y *L. sativa*, respectivamente (Moyer y Huang, 1997; Benedicto *et al.*, 1998; Uludag *et al.*, 2006. Efectos biológicos muy contradictorios que dificultan preveer cual podría ser la respuesta de especies vegetales sean cultivadas o arvenses a los que se les podría aplicar estos extractos; caso particular de las especies cultivadas de *Solanum lycopersicum*, *Oryza sativa* y *L. sativa* y las arvenses *Chenopodium album* y *Echinochloa crus-galli*; mismas que no han sido evaluadas por su respuesta a los extractos metanólicos de *N. oleander*, *Dieffenbachia amoena*, *B. napobrassica* y *R. sativus*, antecedentes que motivaron el Capítulo III.

Finalmente, se seleccionaron las especies *T. violacea*, *R. sativus*, *B. napobrassica* y *D. amoena*, que en estudios previos presentaron la mayor actividad antifúngica *in vitro* contra *C. gloeosporioides* y actividad fitotóxica en la germinación de semillas de especies arvenses y cultivadas, por lo que se conformó el Capítulo IV, con extractos que no se han evaluado para el control del hongo *S. fuliginea*. Por lo antes planteado, el presente estudio tuvo por objetivos los de evaluar: 1) la actividad antifúngica de extractos vegetales *in vitro* contra *C. gloeosporioides* y *B. cinerea* (Capítulo II); 2) la actividad fitotóxica en semillas de especies arvenses y cultivadas (Capítulo III); y 3) la actividad antifúngica *in vivo* contra *S. fuliginea* (Capítulo IV).

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos metanólicos crudos de *P. auritum*, *T. violacea* y *C. chinense* (y también del extracto de diclorometano) contra *C. gloeosporioides* y *B. cinerea*.
- 2.- Evaluar el efecto fitotóxico de los extractos metanólicos de *D. amoena*, *N. oleander*, *R. sativus* y *B. napobrassica* en la germinación y vigor de las plántulas de *Chenopodium album*, *Echinochloa crus-galli*, *Lactuca sativa*, *Solanum lycopersicum* y *Oryza sativa*.
- 3.- Evaluar la severidad del daño y la efectividad (% de control) de los extractos de *T. violacea*, *R. sativus*, *B. napobrassica* y *D. amoena* contra *S. fugilinea* en plántulas de pepino en condiciones de invernadero, así como su posible fitotoxicidad.

CAPÍTULO I

MARCO DE REFERENCIA

1. *Colletotrichum gloeosporioides* (antracnosis)

1.1 Generalidades de antracnosis

Colletotrichum es un habitante común en los cultivos y con frecuencia no ocasiona síntomas de enfermedad en los órganos de la planta; en los frutos de algunas especies frutales solo se manifiesta cuando el pericarpio es debilitado, o cuando ocurren aumentos en los niveles de etileno como resultado de procesos de maduración de los frutos (Adaskaveg y Hartin, 1997).

La enfermedad de antracnosis ocasionada por este hongo se encuentra distribuida a escala mundial y ocasiona pérdidas económicas en pre y poscosecha en regiones tropicales, subtropicales y de clima templado (Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004; Peres *et al.*, 2005). Las enfermedades inducidas por este hongo incluyen: antracnosis, marchitamiento, pudrición radical, mancha foliar, pudrición de flores y tizón en plántulas (Kim *et al.*, 2001). Incluyen una gran diversidad de hospedantes tales como gramíneas (maíz y sorgo), solanáceas (tomate, chile y papa), cucurbitáceas (melón, sandía y pepino) (Sitterly y Keinath, 1996), rosáceas (fresa) (Xiao *et al.*, 2004; Denoyes-Rothan *et al.*, 2005) y cultivos anuales como leguminosas (frijol, soya, chícharo y leguminosas forrajeras) (Lenné, 1992). Asimismo, diversas especies de *Colletotrichum* se han reportado afectando un gran número de cultivos perennes como aguacate, plátano, cítricos, café, mango, papaya, pasiflora, guayaba, guanábana, cacao, hule, manzana, durazno, olivo y almendro, así como cultivos industriales: algodón, caña de

azúcar y tabaco (Afanador-Kafuri *et al.*, 2003; Talhinhos *et al.*, 2005; Alarcón *et al.*, 2007).

El hongo *Colletotrichum* presenta un micelio septado de coloración hialina o castaña clara. Las conidias son producidas en estructuras especializadas llamadas acérvulos, que se forman en la superficie de los tejidos infectados. Los acérvulos separados tienen forma de disco o cojín, de textura cerosa y pueden ubicarse en forma subepidermal, epidermal o subcuticular. Típicamente presentan setas o espinas negras en los bordes o entre el conidióforo; los acérvulos están formados por pseudoparénquima con paredes delgadas o gruesas, conidióforos simples, elongados con numerosas conidias. Las conidias son hialinas curvadas y fusiformes, y por lo general un acérvulo setoso (Holliday, 1995; Barnett y Hunter 1998).

El género *Colletotrichum* tiene una enorme variación ecológica, morfológica y patogénica, las diferentes formas en la naturaleza varían desde saprófito a cepas parasíticas (Mena, 1999). *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. es el agente causal de una diversidad de daños y síntomas en diferentes frutales tropicales y subtropicales en México, y afecta diferentes órganos vegetales de la planta, así como en distintas etapas fenológicas del cultivo. Para 1992 se reconocieron 900 especies de *Colletotrichum* y cerca de 600 variantes de *C. gloeosporioides* (Bailey y Jeger, 1992; Gutiérrez *et al.*, 2001).

Las conidias son producidas en masas mucilaginosas típicamente hundidas, de color rosado y con un contorno irregular en las lesiones, este tipo de lesiones que con frecuencia se observa sobre las hojas, frutos y ramas es conocido como

antracnosis; sin embargo, en algunos frutos también es frecuente observar lesiones como chancros, cicatrices, verrugas o costras con relieve (Mena, 1999).

1.2 Pérdidas por antracnosis

A nivel mundial, se han estimado pérdidas poscosecha causada por antracnosis en papaya entre 40 a 100 % (INIFAP, 2007), en aguacate (*Persea americana* Mill.) enfermedad que ocasiona pérdidas cercanas al 20 % de la producción nacional (Rodríguez-López *et al.*, 2008), en tomate de árbol, manzano y mora causa pérdidas superiores al 50 % cuando se cultivan a campo abierto (Saldarriaga, 2006).

Así mismo, existen diversos reportes donde se señalan pérdidas importantes en papaya durante la etapa poscosecha, por ejemplo Brasil reporta mermas de 50 % (Bolkan *et al.* 1976), Costa Rica de 33 % (Guzmán, 1998), Pakistan de 35 % (Pantástico, 1979), Filipinas, Hawai y Taiwan de 20-26, 75 y 24 %, respectivamente (Paull *et al.*, 1997).

De acuerdo con Zavala-León y Alejo (2012), las pérdidas poscosecha de papaya en México fluctúan entre 18 y el 30 %; sin embargo, la antracnosis, causada por *C. gloeosporioides* constituye la principal enfermedad.

1.3 Clasificación taxonómica de acuerdo con Agrios (2005):

Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. & Sacc. (Anamorfo) y su telemorfo *Glomerella cingulata* Spauld. & H. Schrenk (estado perfecto, subdivisión Ascomycotina) han sido implicados en numerosas enfermedades de las plantas en muchas regiones agrícolas del mundo (Latunde-Dada, 2001).

Reino: Fungi

División: Eumycota

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Coelomycetes

Orden: Melanconiales

Género: *Colletotrichum*

Especie: *C. gloeosporioides*

1.4 Proceso de infección

Una característica de especies de *Colletotrichum*, es que pueden causar infecciones latentes o quiescentes sobre los frutos, que posteriormente se desarrollan durante la fase de maduración. Las diferentes especies sobreviven por largos periodos sobre los desechos vegetales o en el suelo; el patógeno más común en los trópicos es *C. gloeosporioides* (Holliday, 1995).

El proceso de infección de *C. gloeosporioides* se inicia con el contacto del hongo y el fruto, sin ser necesaria la presencia de una herida para facilitar la entrada del hongo. La fuente de inóculo puede tener su origen en plantas enfermas (hojas, flores y frutos). Las esporas son transportadas a través de salpicaduras y el viento, hasta los frutos que se encuentran en desarrollo. Uno de los conidios se establece en la superficie del fruto y germinan si la humedad relativa es cercana a 100 % y si la temperatura oscila entre 25 y 29 °C, entonces, el hongo produce una enzima llamada cutinasa, la cual es esencial en la penetración al tejido verde del fruto de papaya. Después de varias horas, el tubo germinativo se alarga y la punta se hincha para formar una estructura conocida como apresorio, el cual mantiene el hongo firmemente unido al fruto. El crecimiento fúngico se detiene y

posiblemente una hifa subcuticular permanece temporalmente inactiva, hasta que el fruto madura (Figura 1) (Dickman *et al.*, 1982; Coates y Gowanlock, 1993). Por lo general, este microorganismo se adquiere cuando el fruto está en la fase inmadura, y permanece en forma quiescente o latente y la reactivación se manifiesta principalmente en la etapa de poscosecha, cuando el fruto ingresa en la etapa climatérica o de maduración, es decir, cuando las condiciones de temperatura, humedad y nutrimentos son adecuadas para la germinación de esporas y el desarrollo micelial, ya que en esta etapa numerosas enzimas degradan los carbohidratos presentes en el fruto, transformándolos en azúcares sencillos y ácidos orgánicos, necesarios para la nutrición y desarrollo del hongo. De tal forma que las hifas subcuticulares que habían permanecido inactivas o quiescentes, vuelven a estimularse y se ramifican a través del tejido hospedero, al que invade rápidamente, produciendo los síntomas típicos de antracnosis (Dickman y Álvarez, 1983; Coates y Gowanlock, 1993). Es decir, las infecciones quiescentes en el contexto de enfermedades de poscosecha involucran la inhibición del desarrollo del patógeno a través de condiciones fisiológicas impuestas por el hospedero hasta que se lleva a cabo el estado de maduración. Una vez que el hongo penetra la capa exterior del fruto, este permanece allí en estado de quiescencia o dormancia hasta que ocurren cambios en la superficie del fruto los cuales proporcionan las condiciones adecuadas para permitir una infección.

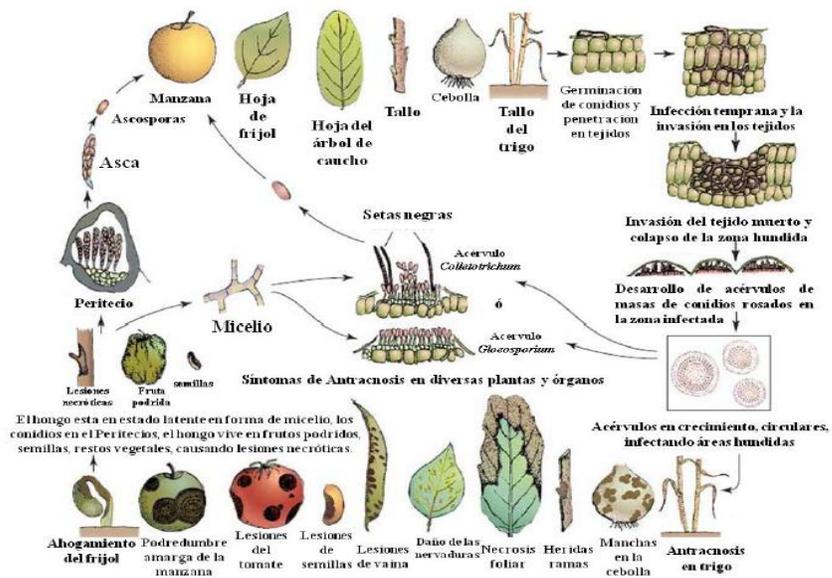


Figura 1. Ciclo biológico de antracosis causada por *Glomerella cingulata* y *Colletotrichum gloeosporioides* (Agris, 2002).

1.5 Síntomas de antracosis

Dickman y Álvarez (1983) señalan que durante la etapa de madurez fisiológica, el fruto no muestra evidencias de infección, los síntomas se desarrollan durante la fase de maduración posclimatérica. Así, la infección se presenta cerca de la madurez o durante el manejo poscosecha.

En frutos de papaya, los síntomas de antracosis consisten en lesiones semicirculares o angulares color café con hundimientos, extendiéndose como lesiones húmedas y en las cuales el hongo irrumpe como esporas de color salmón, que se desarrollan en masas y algunas veces en anillos concéntricos (Snowdon, 1990; Bailey y Jeger, 1992). La pulpa debajo de la lesión es la primera en ponerse blanda, pero la pudrición es limitada en extensión, el perímetro de la lesión se vuelve duro y negro, ya que el fruto opone resistencia al ataque. Algunas

veces se presentan pequeñas manchas cafés, las cuales se desarrollan dentro de la lesión típica de antracnosis (Snowdon, 1990).

1.6 Control de antracnosis

El método de control más utilizado es la aplicación de fungicidas sintéticos; sin embargo, el uso de productos químicos en la fruticultura ha sido restringido en muchos países (Dayan *et al.*, 2009), por lo que hay otros métodos de control, como el uso de tratamientos hidrotérmicos (Prusky *et al.*, 1999), aplicación de aire caliente (Coates *et al.*, 1993), luz ultravioleta (Stevens *et al.*, 1997), atmósferas modificadas (Karabulut y Baykal, 2004), extractos de plantas (Bautista-Baños *et al.*, 2003) y microorganismos como agentes de control biológico (Spadaro y Gullino, 2004).

Para el control químico de la antracnosis se han recomendado los fungicidas azoxystrobin, benomilo, captan, clorotalonil, imazalil, mancozeb, metil kresoxim, procloraz y thiabendazol (Zavala-León *et al.*, 2005; Cristóbal *et al.*, 2006). De estos fungicidas recomendados, solo Azoxystrobin, Clorotalonil, Mancozeb y Thiabendazol están permitidos para su uso en papaya por parte de la Agencia de Protección al Ambiente (EPA) de los Estados Unidos de América. Otros fungicidas que cuentan con registro de EPA son Ferbam, Maneb, Mefenoxam, Pyraclostrobin y Tryfloxystrobin (US Environmental Protection Agency).

El control químico basado en el uso de fungicidas Benzimidazoles, ha provocado resistencia en *C. gloeosporioides* (Waller, 2004; Tavares y Souza, 2005). Entre los productos recomendados para el control de enfermedades poscosecha en frutales tropicales y subtropicales se encuentran el Procloraz (ingrediente activo: N-propil-N-[2-(2,4,6-triclorofenoxi) etil] imidazol-1-carboxamida) e Imazalil

(ingrediente activo: (RS)-1-(β -aliloxi-2,4-diclorofeniletil) imidazol), que se utilizan ampliamente en Centro y Sudamérica, principalmente para el control de la antracnosis en plátano, mango y cítricos (Zavala-León *et al.*, 2005; INIFAP, 2007). Las estrobilurinas (QoI) son un grupo de fungicidas que inhiben la respiración mitocondrial bloqueando el sitio Qo del complejo citocromo bc₁, esta inhibición bloquea la transferencia de electrones entre el citocromo b y el citocromo c₁, con lo cual, se provoca una deficiencia en la producción de energía en las células del hongo, deteniéndose la producción de ATP, éste grupo pertenece el azoxystrobin, trifloxystrobin, pyraclostrobin, estos productos se han registrado en numerosos países (Barlett *et al.*, 2002).

Las estrobirulinas tienen actividad principalmente preventiva, curativa, con efectos translaminares (penetra la lámina foliar). Las esporas de los hongos son más susceptibles a este grupo de fungicidas que el micelio de estos, por tanto, las estrobirulinas son altamente eficientes en el control de la germinación de esporas y la penetración al hospedero (Hamdy, 2007).

El azoxystrobin pertenece a la clase química de los metoxiacrilatos, su nombre químico es Metil (E)-2-(2-(6-(2-cianofenoxi) pirimidin-4-iloxi-fenil-3-metoxiacrilato), es un fungicida con actividad preventiva, curativa y erradicante, inhibe la germinación de esporas y el crecimiento micelial; con propiedades sistémicas y traslaminares (Hamdy, 2007). Es un fungicida que ha mostrado un control eficiente en varias enfermedades y cultivos, ha sido eficiente para el control de la antracnosis por *Colletotrichum acutatum* en jitomate; en evaluaciones *in vitro* en mango, inhibe completamente el crecimiento de *C. gloeosporioides* y en aplicaciones de campo controla la enfermedad en panículas, hojas y frutos (Rui

et al., 2004; Bubici *et al.*, 2006; Gutierrez *et al.*, 2006; Sundravadana *et al.*, 2007).

En precosecha, la aplicación del fungicida reduce la incidencia de la antracnosis por *C. gloeosporioides* en frutos de mandarina (Zhang y Timmer, 2007).

2. *Botrytis cinerea* (moho gris)

2.1 Generalidades del moho gris

Botrytis cinerea Pers. es el agente causal del “Moho gris”, el cual infecta más de 200 especies vegetales distintas (herbáceas anuales y plantas perenes), generando serias pérdidas económicas antes y después de la recolección (Holz *et al.*, 2007). Es una enfermedad de importancia en Estados Unidos de Norte América, Canadá, Irak, Japón y la India (Coley-Smith *et al.*, 1980). El patógeno puede atacar al cultivo en cualquier estado de desarrollo del mismo y puede infectar cualquier parte de la planta. Debido a la considerable incidencia del patógeno y a las repercusiones económicas que tiene en cultivos de importancia tales como vid, tomate, fresa, espárragos, frijol, remolacha, zanahoria, apio, coliflor, pepino, melón, berenjena, escarola, lechuga, cebolla, pimiento, papa, frambuesa, tomate y algunas ornamentales, como begonias, caléndula, crisantemo, dalia, estatices, geranio, hortensias, orquídeas, petunias, rosas, girasoles (Elad *et al.*, 1996; Agrios, 1997; Cota *et al.*, 2008; Töfoli *et al.*, 2011).

El micelio se encuentra formado por un conjunto de hifas o filamentos tabicados y cilíndricos, los cuales se multiplican de forma vegetativa mediante división citoplásmica; se considera una estructura de resistencia, tiene la capacidad de vivir por largo tiempo en bulbos, semillas y partes vegetativas de las plantas. A partir del micelio, generalmente envejecido, se forman diversas estructuras tales como los macroconidióforos, microconidióforos y esclerocios cuya función es la

propagación y supervivencia en condiciones desfavorables (Holz *et al.*, 2007). Los conidios son las principales estructuras de dispersión y de resistencia del hongo, se consideran de corta duración en el campo y su supervivencia está determinada por la temperatura, humedad, actividad microbiana y la exposición a la luz. Los conidios son capaces de sobrevivir sobre la superficie vegetal, manteniendo su viabilidad y capacidad infectiva bajo condiciones adversas (Holz *et al.*, 2007)

Los esclerocios son considerados las estructuras de mayor importancia involucradas en la supervivencia y reproducción del hongo. Pueden sobrevivir bajo condiciones ambientales adversas y producir estructuras llamadas apotecios, las cuales tienen una considerable capacidad de producción de conidios. La formación de estas estructuras está influenciada por varios factores como la temperatura, la luz, el pH y la composición del tejido sobre el cual se desarrollan. Dentro de los esclerocios se encuentra pigmentos melánicos y una reserva de nutrientes (Holz *et al.*, 2007).

2.2 Pérdidas por moho gris

Se estima que alrededor de 20 % de la cosecha mundial es afectada por *B. cinerea* ocasionando una inversión de billones de euros anuales para su control (Plascencia-Tenorio *et al.*, 2012). Para fresa se han reportado pérdidas superiores a 50 % de la producción (Averre *et al.*, 2003). Otras pérdidas se estiman en 20-25 % de los cultivos de fresa en España, y 20 % de las flores cortadas en Holanda (Plascencia-Tenorio *et al.*, 2012). En los países tropicales, se pierde cerca del 25 % de los productos hortofrutícolas entre la cosecha y consumo (Narayanasamy, 2006).

De acuerdo con Snowdon (1990) las podredumbres por *B. cinerea* son habituales en el almacenamiento de frutas como los cítricos (especialmente limones y mandarinas), manzanas, peras y fruta de pepita en general, uva, melocotones y fruta de hueso, fresas, etc.

El nombre *B. cinerea* aparece mencionado por primera vez por von Haller (1771), en su “Synopsis Methodica Fungorum”. En 1866, de Bary descubre la conexión genética entre este patógeno y *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (Rosslénbroich y Stuebler, 2000). Posteriormente este último fue identificado como el estado perfecto o sexual (teleomorfo) del patógeno, sin embargo ocurre raramente en la naturaleza (Faretra *et al.*, 1988), por lo que el nombre del estado imperfecto o asexual (anamorfo) *B. cinerea*, es comunmente preferido para referirse a este hongo.

2.3 Clasificación taxonómica:

Reino: Fungi

División: Deuteromycota

Clase: Hyphomycetes

Familia: *Moniliaceae*

Género: *Botrytis*

Especie: *cinerea*

2.4 Proceso de infección

Las esporas de *B. cinerea* se pueden producir sobre cualquier material vegetal y transportarse a grandes distancias por corrientes de aire (Jarvis, 1977). Una vez que la espora ha alcanzado la superficie del huésped se inicia el ciclo de infección que, para facilitar su descripción y estudio, puede considerarse dividido en varias

fases: 1) la adhesión y germinación de las esporas sobre la superficie del huésped; 2) su penetración en el tejido vegetal o bien, a través de heridas o de aberturas naturales, directamente mediante la participación de distintas actividades enzimáticas o mediante la participación de diversos procesos mecánicos (incluyendo la diferenciación de estructuras de penetración en algunos sistemas); 3) el establecimiento del patógeno en la zona de penetración, determinando la muerte de las células adyacentes en el punto de penetración y dando lugar a la formación de una lesión primaria como consecuencia de la expresión de los mecanismos de defensa de la planta; 4) en muchos casos se inicia entonces una fase de latencia durante la cual los mecanismos de defensa de la planta parecen controlar al patógeno que permanece localizado en las áreas de necrosis correspondientes a las lesiones primarias; 5) transcurrido un tiempo, en algunas lesiones primarias el patógeno es capaz de vencer las barreras defensivas de la planta e inicia su disseminación en el tejido vegetal circundante a partir de las lesiones, determinando la colonización y la maceración del tejido infectado en un breve periodo de tiempo. El patógeno sobre el tejido infectado produce una nueva generación de esporas que pueden iniciar un nuevo ciclo de infección (Benito *et al.*, 2000).

2.5 Síntomas de moho gris

La podredumbre gris, causada por *B. cinerea*, considerado como el principal patógeno que afecta el cultivo de fresa en campo así como en poscosecha, infecta cualquier parte de la planta en cualquier estado de desarrollo, la enfermedad se presenta inicialmente como una mancha marrón-amarillenta

hacia el final de cáliz, y a los pocos días se cubre de una apariencia polvosa de moho gris en toda la superficie de la fruta provocando una pudrición, en las hojas se forman manchas de color café necrosadas en un estado latente para dispersarse y seguir con la infección (Chaves y Wang, 2004; Ullio y Macarthur, 2004).

2.6 Control de Moho gris

Es una enfermedad policíclica con la producción de inóculo abundante durante la primavera, verano y otoño, por lo que su control resulta difícil.

Debido a la incidencia de *B. cinerea*, los altos niveles de daño por producción en poscosecha y durante el transporte obligan, para su control, la utilización de fungicidas químicos, aumentándose con ello los costos, así como los riesgos para las personas que entran en contacto con dichos productos (Garcés de Granada y Orozco de Amézquita, 2004).

Para el control de *B. cinerea* se han usado productos químicos como benzimidazoles, las dicarboximidias, fenhexamida, pirimetanil (Yourman *et al.*, 2000). La resistencia a benomyl, lo mismo que la resistencia múltiple a otros benzimidazoles y a las dicarboximidias, por parte del hongo, es usual hoy en día (Garcés de Granada y Orozco de Amézquita, 2004). Además, el uso de fungicidas con un solo sitio de acción favorece el desarrollo de cepas resistentes de *B. cinerea* (Leroux *et al.*, 2007). Varios fungicidas con diferentes sitios de acción se han introducido con el objetivo de controlar el moho gris. Algunos de estos fungicidas tienen múltiples sitios de acción (captan, clorotalonil), mientras que otros tienen un solo sitio de acción (boscalid, ciprodinil, fludioxonil,

fenhexamida, fluazinam, piraclostrobina, pirimetanil) (Chatzidimopoulos *et al*, 2013; FRAC, 2016). Fenhexamida es el único miembro de la Clase III “Inhibidores de la C3-reductasa”, las Clases I, II y IV son inhibidores de la dimetilación del esterol, inhibidores de la reductasa e isomerasa y epoxidasa, respectivamente, en la biosíntesis de esterol en las membranas de las células fúngicas (FRAC, 2016).

Actualmente, el control químico se basa principalmente en fungicidas con un modo de un solo sitio de acción (Latorre y Torres, 2012). En consecuencia, el riesgo de desarrollo de resistencia es de media a alta (Kim *et al*, 2010; FRAC, 2016), y se necesitan estrategias anti-resistencia para evitar la rápida aparición de cepas de *B. cinerea* resistentes, por lo que se han utilizado otros métodos como el uso de plásticos con filtros ultra – violeta que afectan la esporulación de *B. cinerea*; reducción de la humedad; aumento de la ventilación; además se han utilizado los microorganismos parásitos como *Gliocladium roseum* y aplicaciones de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viridae* (Chaves y Wang, 2004; Garcés de Granada y Orozco de Amézquita, 2004; Molina-Mercader *et al.*, 2006).

3. *Sphaerotheca fuliginea* (cenicilla)

3.1 Generalidades de la cenicilla

Sphaerotheca fuliginea Schlechtend.: Fr, Pollaci ocasiona la enfermedad conocida como cenicilla y el efecto fundamental es la defoliación en cultivos como el pepino, melón, sandía y calabaza (Glawe, 2008). Para el control de esta enfermedad se han utilizado tradicionalmente fungicidas sintéticos; sin embargo, éstos productos representan un riesgo para el ambiente y la salud, lo que ha

provocado políticas sanitarias por parte de las agencias reguladoras de diversos países más severas en el uso de agroquímicos (Glawe, 2008).

3.2 Pérdidas por cenicilla

El ataque de enfermedades fungosas como la cenicilla en pepino disminuyen drásticamente el rendimiento y calidad de los frutos (Abbod y Lösel, 2003). Las pérdidas de producción que provoca, alcanza alrededor de 50 %, y el efecto fundamental es la defoliación (melón, pepino y calabacín).

3.3 Clasificación taxonómica:

Reino: Fungi

División: Eumycota

Subdivisión: Ascomycota

Clase: Leotiomycetes

Orden: Erysiphales

Familia: *Erysiphaceae*

Género: *Sphaerotheca*

Especie: *fuliginea*

3.4 Proceso de infección

La infección de la planta huésped comienza con las ascosporas sexuales, o en la infección asexual, los conidios germinan en la superficie de la hoja de las plantas o de células madre, lo que resulta en el micelio septado de células uninucleadas. El micelio externo da lugar a conidióforos cortos y erectos, cada uno de los cuales lleva una sola fila de esporas en forma de barril, el menor de ellos en la base (las partes afectadas se vuelven con un aspecto pulverulento blanco).

3.5 Síntomas de cenicilla

En las hojas se observan manchas pequeñas con un crecimiento blanco polvoriento en su superficie. Las manchas se van uniendo hasta cubrir toda la hoja. El ataque por este hongo comienza en el envés de las hojas, pero en ataques severos el crecimiento polvoriento se puede observar en el haz de las hojas, en los peciolos y en los tallos. Las hojas severamente afectadas se tornan amarillas y se secan. Los frutos rara vez se ven afectados, pero de serlo, se altera su textura y sabor afectando su calidad en el mercado (Arias y Fuentes, 2012).

3.6 Control de cenicilla

El control de la enfermedad se ha realizado con la aspersion de fungicidas sistémicos, aunque el hongo ha adquirido resistencia a ciertos productos (Arias y Fuentes, 2012). Por otra parte, se ha demostrado que la aplicación de fertilizantes foliares que contienen fósforo y potasio podría ser una medida complementaria para el manejo de *S. fuliginea* en pepino, conocida como terapia de fertilización foliar que nutre a la planta a la vez que la protege de fitopatógenos a mediano y largo plazo (Reuveni y Reuveni, 1998). También el uso de sales de fosfatos y potásicas tienen efecto fungicida sin generar efectos fitotóxicos sobre la planta, particularmente de pepino (Reuveni *et al.*, 2000). El producto comercial Regalia Maxx, cuyo ingrediente activo es el extracto de *Reynoutria sachalinensis*, promueve la defensa de la cenicilla en cucurbitáceas y solanáceas.

4 Metabolitos secundarios

Un tejido vegetal, como toda materia viva, se encuentra en un estado dinámico desde el punto de vista químico. Hay una constante síntesis y degradación de biomoléculas o metabolitos que determina el dinamismo de los sistemas

biológicos, pero a su vez, al estar en equilibrio la velocidad de síntesis (o aparición) con la degradación (o desaparición) de componentes celulares, las concentraciones de los mismos se mantienen aproximadamente constantes, estacionarias. Los compuestos químicos celulares (metabolitos) pueden ser clasificados en primarios y secundarios. Los compuestos primarios son todos aquellos esenciales para el funcionamiento de toda materia viva, responsables de su estructura y de todas las reacciones necesarias para mantener el estado vital y posibilitar el crecimiento, el desarrollo y la reproducción, comprenden los carbohidratos, los lípidos y las proteínas (Ringuelet y Viña, 2013).

Los compuestos secundarios cumplen funciones que no resultan estrictamente vitales en los tejidos y representan en ocasiones compuestos de desecho del metabolismo. Los metabolitos secundarios en general no están directamente involucrados con el crecimiento y desarrollo, ni participan en procesos tales como la obtención de energía. Muchos de ellos son aprovechados por la planta que los sintetiza para interactuar con el medio, ya sea para atraer insectos y otros polinizadores, repeler predadores u organismos dañinos, impedir la competencia con otras plantas, adaptarse a condiciones adversas de suelo o clima, etc. Los metabolitos secundarios cumplen preferentemente funciones ecológicas (Ringuelet y Viña, 2013; Irchhaiya *et al.*, 2015).

Gran diversidad de metabolitos secundarios se han utilizado y se siguen empleando por el hombre para aplicarlos en la industria farmacéutica, perfumística, alimentaria (como suplementos, aditivos o colorantes) y en agricultura, etc. Éstos son los comúnmente llamados productos naturales vegetales y representan moléculas con variadas estructuras, diferentes

propiedades de solubilidad y distintos orígenes biosintéticos. En muchos casos, los metabolitos secundarios pueden ser materia prima para sintetizar otros compuestos útiles, originando productos de semisíntesis (Ringuelet y Viña, 2013; Irchhaiya *et al.*, 2015).

Algunos autores mencionan que pueden llegar a existir más de 100 000 metabolitos secundarios involucrados en la defensa de todas las especies de plantas y de los cuales solo se conoce el 10 % (Cuadro 1) (Mazid, 2011; Irchhaiya *et al.*, 2015).

Cuadro 1. Número de Metabolitos Secundarios (MS) reportados en plantas superiores (Irchhaiya *et al.*, 2015).

| Tipo de metabolito secundario | Número aproximado |
|--|--------------------------|
| MS que contienen nitrógeno | |
| Alcaloides | 21 000 |
| Amino ácidos no proteícos | 700 |
| Aminas | 100 |
| Glucósidos cianogénicos | 60 |
| Glucosinolatos | 100 |
| Alcamidas | 150 |
| Lectinas, péptidos, polipéptidos | 2 000 |
| MS sin nitrógeno | |
| Monoterpenos incluyendo iridooides | 2 500 |
| Sesquiterpenos | 5 000 |
| Diterpenos | 2 500 |
| Triterpenos, esteroides, saponinas | 5 000 |
| Tetraterpenos | 500 |
| Flavonoides, taninos | 5 000 |
| Fenilpropanoides, lignina, cumarinas, lignanos | 2 000 |
| Poliacetilenos, ácidos grasos, ceras | 1 500 |
| Antraquinonas y otros policétidos | 750 |
| Ácidos grasos | 200 |

4.1 Clasificación de los metabolitos secundarios

Con el fin de establecer un ordenamiento, estos compuestos se clasificarán teniendo en cuenta: su origen biosintético, las características estructurales comunes y las propiedades de solubilidad.

Compuestos nitrogenados y azufrados: caracterizados por poseer nitrógeno y/o azufre en su estructura, de solubilidad y origen biosintético diverso pero mayoritariamente derivados de aminoácidos.

Los alcaloides constituyen un grupo de numerosos compuestos secundarios nitrogenados aislados tradicionalmente de plantas vasculares, aunque actualmente se ha reportado también la presencia de un número creciente de este tipo de metabolitos en algunos animales, insectos y microorganismos. Estructuralmente contienen uno o varios átomos de nitrógeno en su molécula, a menudo formando parte de un anillo heterocíclico (Figura 2) (Henning, 2013).

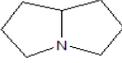
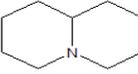
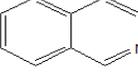
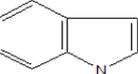
| NÚCLEO ALCALOÍDICO | ESTRUCTURA | PRECURSOR BIOSINTÉTICO | EJEMPLO |
|--------------------|---|------------------------|--|
| PIRROLIDINA |  | ORNITINA | NICOTINA |
| TROPANO |  | ORNITINA | ATROPINA COCAÍNA |
| PIPERIDINA |  | LISINA | CONÍNA |
| PIRROLIZIDINA |  | ORNITINA | RETRONECINA |
| QUINOLIZIDINA |  | LISINA | LUPININA |
| ISOQUINOLEÍNA |  | TIROSINA | CODEÍNA MORFINA |
| INDOL |  | TRIPTOFANO | PSILOCIBINA RESERPINA ESTRICNINA |

Figura 2. Estructura de algunos de los núcleos alcaloídicos más sencillos.

Las rutas biosintéticas son diversas y los precursores que utilizan las plantas son los aminoácidos: L-ornitina, L-arginina, L-lisina, histidina, L-fenilalanina, L-triptófano o L-tirosina; y en menor proporción otros compuestos que pueden

intervenir como la L-prolina, el ácido antranílico, el ácido nicotínico, y otros (Figura 3) (Henning, 2013).

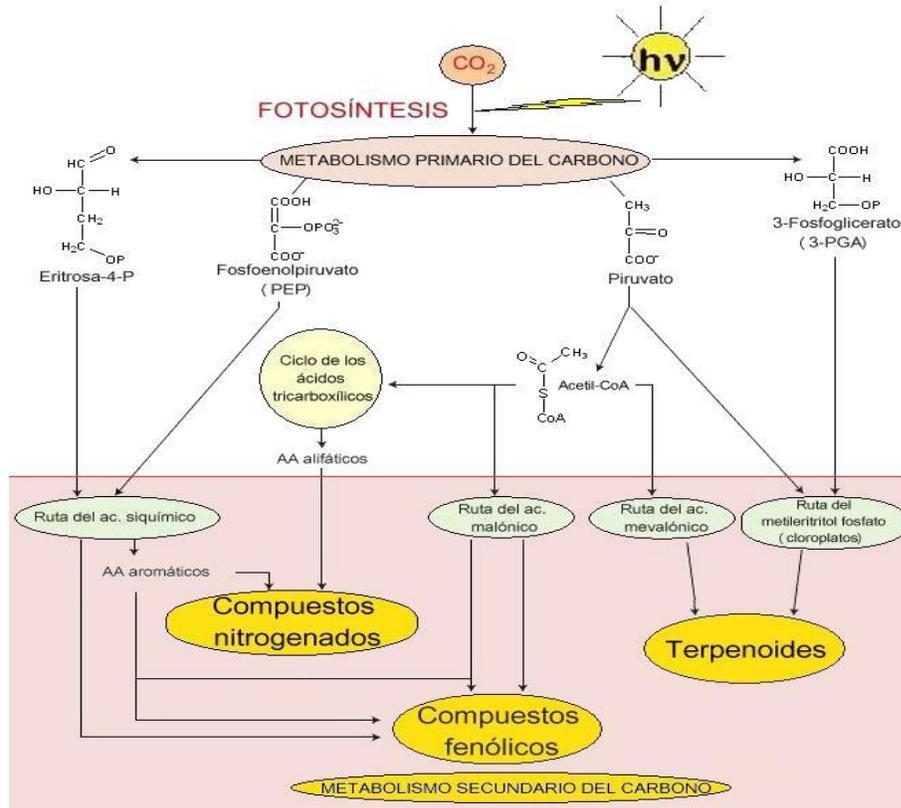


Figura 3. Elementos del metabolismo del carbono en relación con las rutas de síntesis de metabolitos secundarios (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009).

La mayoría de los compuestos azufrados se encuentran en forma reducida en los aminoácidos de cisteína y metionina, y por lo tanto, constituyentes de proteínas. Ambos aminoácidos son precursores de otros compuestos que contienen S, como coenzimas (CoA), vitaminas (biotina, tiamina) y metabolitos secundarios (Alinas, glucosinolatos) (Pandey, 2015).

Los compuestos azufrados suelen contener uno o dos átomos de azufre, como en el dimetil-disulfuro liberado de tejidos de muchas especies del género *Allium* (Figura 4). Los compuestos azufrados, en general, desempeñan una acción muy

importante en la defensa de la planta contra insectos, hongos y bacterias existentes en la fauna y microbiota propias del suelo, además de ser responsables del fuerte olor característico. La mayoría de los componentes azufrados no están presentes en las células intactas, por ejemplo, cuando un ajo es machacado, partido o cortado, varios de sus componentes azufrados son liberados, abandonando el interior de las células vegetales; entonces interaccionan unos con otros para desencadenar una cascada de reacciones químicas, generando un elevado conjunto de componentes (Henning and Yordaz, 2013; Irchhaiya *et al.*, 2015).

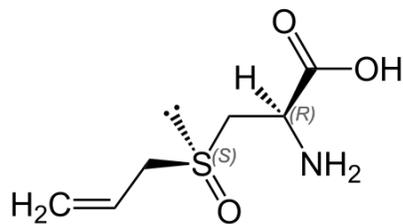


Figura 4. Estructura de compuesto azufrado (Aliina)

Los glucosinolatos actúan como repelentes alimenticios y pueden ser tóxicos para los herbívoros cuando se encuentran en altas concentraciones. La toxicidad de estos compuestos se debe a la capacidad que tienen para liberar isotiocianatos, compuestos potencialmente tóxicos, por acción de la enzima mirosinasa presente en la planta (Viladomat and Bastida, 2015). Algunas especies que sintetizan estos compuestos son: *Brassica campestris* (nabo), *B. chinensis* (col china), *B. napus* (colza), *B. nigra* (mostaza negra), *B. oleracea* (repollo), *Nasturtium officinale* (berro) y *Raphanus sativus* (rábano), entre otras (Henning and Yordaz, 2013).

La biosíntesis de estos compuestos en plantas deriva principalmente de aminoácidos y la diversidad de estructuras va unida a la de sus precursores: tirosina, fenilalanina, triptófano, homometionina, homofenilalanina. Los glucosinolatos se forman por descarboxilación de los aminoácidos en aldoximas que seguidamente incorporaran un átomo de azufre para luego unirse al azúcar (por el dador de glucosilos: UDP-glucosa) y una posterior sulfatación (Figura 5). Estas rutas metabólicas probablemente estén relacionadas con aquellas que utilizan las plantas para la síntesis de glicósidos cianogénicos (Hopkins *et al.*, 2009).

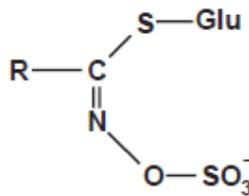


Figura 5. Estructura de los glucosinolatos

De acuerdo con Henning and Yordaz (2013), para su mejor estudio, los glucosinolatos se puede clasificar según la naturaleza de sus radicales R en:

- alifáticos (gluconapina, progoitrina, gluconapoleiferina, glucobrasicanapina, sinigrina, glucoerucina, glucocaparina, glucoiberina, glucoiberiverina).
- aromáticos (gluconasturtina, glucotropeolina, glucosinalbina).
- indólicos (glucobrasicina, neoglucobrasicina).

Compuestos fenólicos: con al menos un grupo hidroxilo unido a uno o más anillos aromáticos en su estructura química, la mayoría hidrosolubles y derivados biosintéticamente del ácido shikímico.

Los compuestos fenólicos pueden ser simples, de bajo peso molecular, se pueden clasificar en función del número y disposición de sus átomos de carbono y son comúnmente conjugados con los azúcares y ácidos orgánicos. Los compuestos fenólicos se pueden clasificar en dos grupos: los flavonoides y los no flavonoides (Figura 6) (Irchhaiya *et al.*, 2015).

Están presentes en altas concentraciones en la epidermis de las hojas y la piel de las frutas, desempeñan papeles importantes y variados. En las plantas, los flavonoides están implicados en diversos procesos como protección de UV, pigmentación, la estimulación de la fijación de nitrógeno en los nódulos y resistencia a las enfermedades (Irchhaiy *et al.*, 2015).

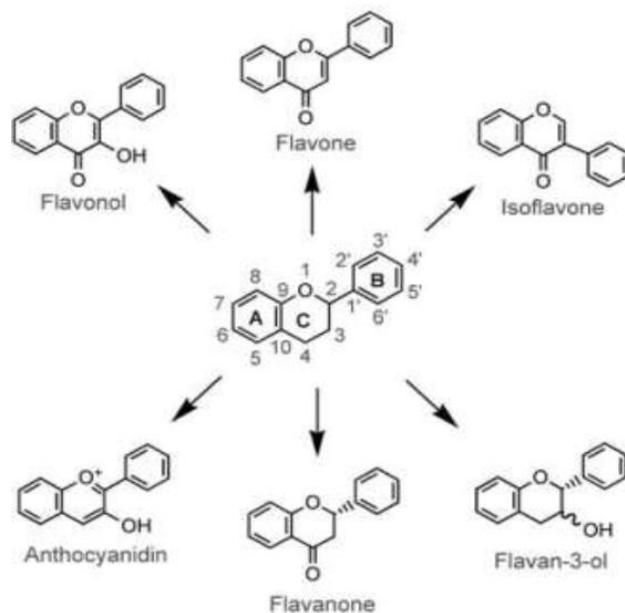


Figura 6. Estructura genérica de flavonoides

Compuestos terpenoides: con la molécula de isopreno como unidad estructural, liposolubles, y biosintéticamente asociados a la vía del ácido mevalónico o a la vía gliceraldehído fosfato - ácido pirúvico, dependiendo de la clase de terpenoides en cuestión.

La biosíntesis de los terpenoides está compartimentalizada. Los sesquiterpenos (C15), triterpenos (C30) y politerpenos son producidos en *compartimentos* citosólicos y en el retículo endoplasmático, mientras que el isopreno (C5), monoterpenos (C10), diterpenos (C20) y tetraterpenos (C40) se sintetizan en los plástidos (Figura 7) (Croteau *et al.*, 2000).

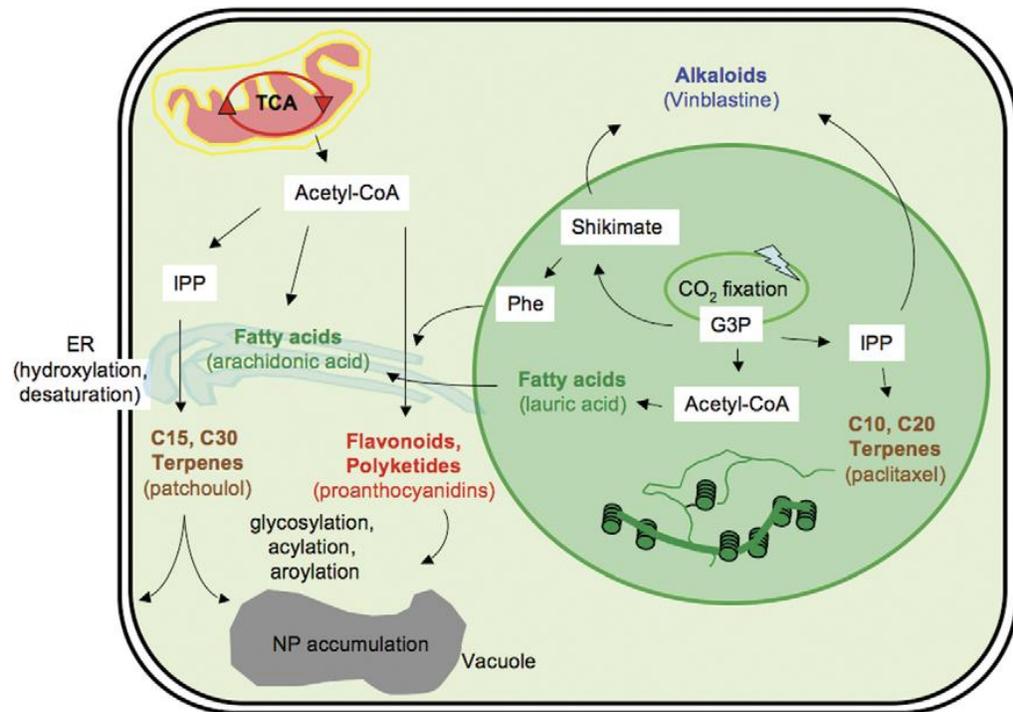


Figura 7. Representación esquemática de varias vías de biosíntesis de productos naturales en las plantas para ilustrar cómo se coordinan las interacciones entre los compartimentos intracelulares (TCA, ciclo de ácido tricarboxílico; IPP, isopentenil difosfato; Phe, fenilalanina; G3P, gliceraldehído 3-fosfato) (Wu and Chappell, 2008).

El Diccionario de Productos Naturales enumera más de 30000 terpenos, principalmente de origen vegetal, que abarca sabores y fragancias, antibióticos, hormonas vegetales y animales, lípidos de membrana, atrayentes y repelentes alimentarios de insectos, y los mediadores de los procesos de transporte de electrones esenciales que son las etapas de generación de energía de la

respiración y la fotosíntesis (Irchhaiy *et al.*, 2015). La producción, acumulación, emisión y secreción de terpenoides está generalmente asociada con la presencia de estructuras anatómicas altamente especializadas: tricomas glandulares, cavidades secretoras, glándulas epidérmicas, conductos y cavidades resiníferas, canales laticíferos (Ringuelet, 2013). Los terpenoides son la familia más grande y diversa de productos naturales, que van en estructura lineal a moléculas policíclicas y el tamaño de los hemiterpenes desde cinco carbonos hasta politerpenos que forman miles de unidades de isopreno. Todos los terpenoides se sintetizan a través de la condensación de unidades de isopreno (C5) y se clasifican por el número de unidades de cinco carbonos presentes en la estructura de núcleo (Figura 8). Muchas moléculas de sabor y aromáticas, tales como mentol, linalol, geraniol y cariofileno están formados por monoterpenos (C10), con dos unidades de isopreno, y sesquiterpenos (C15), con tres unidades de isopreno. Otros compuestos bioactivos, tales como diterpenos (C20), triterpenos (C30) y tetraterpenos (C40) muestran propiedades muy especiales (Cuadro 2) (Ringuelet, 2013).

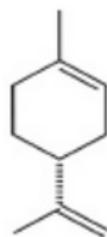


Figura 8. Estructura de monoterpeneo (C₁₀)

Cuadro 2. Principales clases de terpenoides en las plantas

| Unidades de isopreno | N° de C | Clase | Ejemplos |
|----------------------|---------|----------------|--|
| 1 | 5 | Hemiterpenos | Isovaleraldehído en esencia de <i>Eucaliptus spp.</i> |
| 2 | 10 | Monoterpenos | Componentes de aceites esenciales Mentol, mirceno, limoneno, pineno. Otros componentes de aceites esenciales. |
| 3 | 15 | Sesquiterpenos | Ácido abscísico (hormona) |
| 4 | 20 | Diterpenos | Ácidos diterpénicos en resinas (ácido abiético) Fitol. Componentes de algunas esencias. Giberelinas. Steviósido. Diterpenos tóxicos. |
| 5 | 25 | Sesterpenos | En hongos. Escasos y poco importantes hasta el presente. |
| 6 | 30 | Triterpenos | Esteroles (colesterol). Triterpenos verdaderos: amirina, limonina |
| 8 | 40 | Tetraterpenos | Carotenoides (carotenos y xantófilas) |
| N | n | Politerpenos | Caucho en <i>Hevea brasiliensis</i> |

5 Extractos vegetales

Las plantas, en su evolución han desarrollado mecanismos de defensa contra insectos, hongos, bacterias y otros organismos nocivos, y los metabolitos secundarios producidos por ellas constituyen una de esas barreras; por dicha razón, las plantas han sido capaces de protegerse de plagas por sí mismas antes de que el hombre jugara un rol activo para protegerlas (Wilson, 1997). Así mismo, el hombre ha aprovechado estas propiedades y utiliza plantas para repeler o eliminar las plagas que afectan sus cultivos y alimentos almacenados (Chirinos, 2009).

El uso de extractos naturales para el control de enfermedades de importancia agrícola es cada vez más aceptado debido a la necesidad de emplear compuestos eficaces que no provoquen efectos negativos en la salud ni en el ambiente (Chirinos, 2009), por lo que es conveniente no utilizar plantas que estén en vías de extinción, para la preparación de los extractos. Las características que debe tener la planta bioplaguicida ideal son:

- a) Ser perenne.
- b) Estar ampliamente distribuida y en grandes cantidades en la naturaleza, o bien, que se pueda cultivar.
- c) El órgano aprovechable de la planta debe ser renovable, como hojas, flores o frutos.
- d) No ser destruida cada vez que se necesite recolectar (evitar el uso de raíces y cortezas).
- e) Requerir poco espacio, manejo, agua y fertilización.
- f) No debe tener un alto valor económico.
- g) Efectiva a bajas dosis.
- h) Rendimiento

Ventajas

La búsqueda de extractos vegetales está orientada a la obtención de productos con actividad selectiva, que no generen resistencia y con adecuada biodegradabilidad, condición que cumplen la mayoría de los metabolitos secundarios vegetales presentes en los extractos. A estas condiciones se agrega que el producto tenga la disponibilidad asegurada, es decir potencialmente capaz de ser producido a costos razonables para los sistemas agrícolas a utilizarse (Arango, 2013).

De acuerdo con Chirinos (2009), las principales ventajas del uso de los extractos naturales son los siguientes:

- a) Por ser biodegradables no producen desequilibrios en el ecosistema, al ser de origen vegetal estos bioplaguicidas provocan un impacto mínimo

sobre la fauna benéfica, son efectivos contra enfermedades y no tienen restricciones toxicológicas.

- b) Son conocidos por el agricultor ya que generalmente se encuentran en su medio.
- c) La mayoría de los extractos tiene diversos usos, como es el caso de aquellos empleados por sus propiedades terapéuticas y efectos repelentes, entre otros.
- d) Su rápida degradación disminuye el riesgo residual en los alimentos.
- e) Algunos pueden ser usados poco tiempo antes de la cosecha.
- f) Muchos de estos compuestos no causan fitotoxicidad.
- g) Desarrollan resistencia más lentamente que productos sintéticos.

6 Plantas seleccionadas para el estudio

6.1 *Capsicum chinense* Jacq. (Chile habanero)

Clasificación taxonómica

| | |
|-------------|--------------------------|
| ORDEN: | Solanales |
| FAMILIA: | <i>Solanaceae</i> |
| SUBFAMILIA: | Solanoideae |
| TRIBU: | Capsiceae |
| GENERO: | <i>Capsicum</i> L., 1753 |
| ESPECIE: | <i>chinense</i> Jacq. |

El chile fue uno de los primeros cultivos domesticados en mesoamérica por lo que ahora se ha convertido en un ingrediente casi obligado en la comida mexicana (Barreiro, 1998). México es el país del mundo con la mayor variedad

genética de *Capsicum*; su riqueza genética se debe en gran parte a la diversidad de climas y suelos, pero también a las prácticas tradicionales de cultivo que efectúan los pequeños productores utilizando las semillas de los frutos seleccionados de las plantas nativas (Latournerie-Moreno *et al.*, 2002).

Arbustos pequeños de hasta 1.5 m de alto, glabros a pubescentes; dos o más flores por nudo, ocasionalmente solitarias, pendientes (raramente erectas); cáliz del fruto maduro carece de dientes y presenta una marcada constricción anular en su base; corola blanca-verdosa o verde-amarillenta (ocasionalmente blanca lechosa o púrpura); sin manchas difusas en la base de los pétalos; pétalos de la corola usualmente rectos; anteras de color violeta a azul, raramente amarillas; frutos pendientes, persistentes, de pulpa firme, de colores café rojo, melocotón, amarillo naranja, amarillo limón, o crema, de varias formas; semillas de color crema a amarillo (Figura 9) (Krishna De, 2003).

Entre la gran diversidad del género *Capsicum*, el chile habanero (*C. chinense* Jacq.) se ha convertido en un símbolo y ejemplo en pungencia, debido a su más alto contenido de capsaicina encontrado en el fruto (Borges-Gómez *et al.*, 2010).



Figura 9. *Capsicum chinense* Jacq.

Composición química

El chile habanero es una fuente rica de fitoquímicos, como la capsaicina. La capsaicina (trans-8-metil-N-vanillil-6-nonenamida), es un alcaloide o capsaicinoide constituido por un esqueleto vanilloide, una amida y una cadena sencilla hidrofóbica (Figura 10), cuya fórmula semidesarrollada es $C_{18}H_{27}NO_3$. La capsaicina es el principal constituyente de la pungencia de los chiles habaneros (Chinn, *et al.*, 2011).

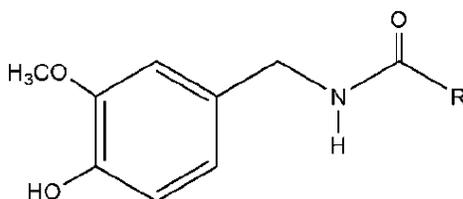


Figura 10. Estructura básica de los capsaicinoides

Actividad biológica

Con el extracto *C. chinense* se ha evaluado la actividad biológica contra insectos, ácaros, hongos y bacterias (Cuadro 3).

Cuadro 3. Estudios de actividad biológica de extractos de *Capsicum chinense*.

| Especie | Estudio y organismo | Literatura |
|--------------------------|---|---------------------------------------|
| <i>Capsicum chinense</i> | Actividad antibacteriana contra <i>Bacillus cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Clostridium sporogenes</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> . | Cichewicz y Thorpe, 1996 |
| | Actividad antifúngica contra <i>Botrytis cinerea</i> | Wilson <i>et al.</i> , 1997 |
| | Efecto acaricida contra <i>Tetranychus urticae</i> | Antonious <i>et al.</i> , 2006 |
| | Actividad antifúngica contra <i>Penicillium expansum</i> | Ikeura <i>et al.</i> , 2011 |
| | Actividad repelente contra insectos | Chinn <i>et al.</i> , 2011 |
| | Efecto insecticida contra <i>Bemisia tabaco</i> | Castillo-Sánchez <i>et al.</i> , 2012 |

Usos

Una exposición excesiva a la capsaicina puede ser tóxica causando irritación sobre el área en contacto o provocar problemas respiratorios, también puede ocasionar algunos tipos de cáncer debido a la ingestión de altas cantidades, la capsaicina ha sido ampliamente estudiada en investigaciones experimentales y clínicas por sus propiedades farmacéuticas, neurológicas y antioxidantes (Chinn *et al.*, 2011).

La capsaicina posee propiedades antimicrobiales lo cual abre puertas para explorar su potencial como un inhibidor potencial de microorganismos patogénicos en alimentos. Adicionalmente, tiene utilidad como repelente de pájaros, animales e insectos, como un bioplaguicida (Chinn *et al.*, 2011).

De acuerdo con Borges-Gómez *et al.* (2010), la importancia de los capsaicinoides se debe a que además de proporcionar el sabor picante, se utilizan en la industria farmacéutica, de armas, tabacalera, cosmética, de pinturas, entre otras como ingrediente activo en diversos productos.

6.2 *Dieffenbachia amoena* Bull. (Amoena)

Clasificación taxonómica

| | |
|-------------|------------------------|
| ORDEN: | <i>Alismatales</i> |
| FAMILIA: | <i>Araceae</i> |
| SUBFAMILIA: | <i>Aroideae</i> |
| TRIBU: | <i>Dieffenbachieae</i> |
| GENERO: | <i>Dieffenbachia</i> |
| ESPECIE: | <i>amoena</i> |

Introducida en Europa a finales del siglo XIX, proviene fundamentalmente de las selvas vírgenes de América Central y América del Sur, aunque es una especie difundida por toda América tropical.

La planta *D. amoena* se presenta en forma de arbusto de un metro de altura y puede llegar a una altura de 3.5 m. La planta posee tallos carnosos duros y rígidos; sus hojas son oblongadas con peciolo fuertemente aplanado de color verde profundo, el haz es brillante y presenta manchas blanquecinas irregulares a lo largo de los nervios secundarios en disposición pinnada; el envés es opaco y su color verde es más claro (Hunter y Becerra, 1976).

La inflorescencia, con pedúnculo y espata inflada en utrículo, alberga la porción basal femenina del espádice cuyos estigmas son verdes con pétalos blancos; la parte superior del espádice corresponde a la parte masculina de la inflorescencia, con estigmas de pétalos rosados (Figura 11) (Hunter y Becerra, 1976).



Figura 11. *Dieffenbachia amoena* Bull.

Composición química

Hunter y Becerra (1976) confirmaron la presencia de 2 glucoalcaloides esteroidales y 2 sapogeninas esteroidales y siendo los principios activos más importantes, encontrados en la *D. amoena* (Figura 12).

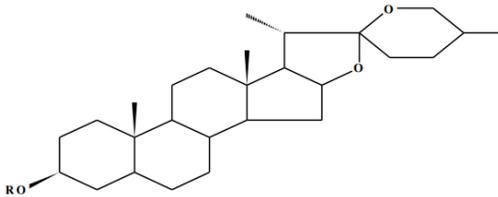


Figura 12. Estructura química de la sapogenina esteroide (R=H, sapogenina esteroide)

Actividad biológica

Los extractos de *Dieffenbachia* spp. se han evaluado principalmente contra insectos y ácaros; asimismo, se tienen estudios por su actividad alelopática (Cuadro 4).

Cuadro 4. Estudios de actividad biológica de extractos de varias especies de *Dieffenbachia*.

| Especie | Estudio y organismo | Literatura |
|-----------------------------------|---|--------------------------------|
| <i>Dieffenbachia maculata</i> | Reacción de <i>Spodoptera littoralis</i> sobre la alimentación de larvas y adultos | Antonious <i>et al.</i> , 1992 |
| <i>Dieffenbachia amoena</i> | Actividad insecticida <i>Opogona sacchari</i> | Benedicto <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Dieffenbachia brasiliensis</i> | Evaluación de la actividad acaricida de diferentes extractos para el control de <i>Tetranychus urticae</i> | Potenza <i>et al.</i> , 1999a |
| <i>Dieffenbachia brasiliensis</i> | Evaluación del efecto de extractos de 45 especies de plantas para el control de <i>Ceratitis capitata</i> . | Potenza <i>et al.</i> , 1999b |
| <i>Dieffenbachia brasiliensis</i> | Evaluación acaricida de extractos para el control de <i>Oligonychus ilicis</i> (Mc Gregor). | Potenza <i>et al.</i> , 2003b |
| <i>Dieffenbachia brasiliensis</i> | Evaluación de extractos vegetales para el control de <i>Blattella germanica</i> . | Potenza <i>et al.</i> , 2003a |
| <i>Dieffenbachia picta</i> | Actividad alelopática | Hoffmann <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Dieffenbachia brasiliensis</i> | Evaluación de la toxicidad de compuestos sintéticos y naturales sobre <i>Tetranychus urticae</i> y <i>Phytoseiulus macropilis</i> . | Veronez <i>et al.</i> , 2012 |

Usos

D. amoena se utiliza frecuentemente como planta de interior debido a su tolerancia a la sombra y tiene uso empírico por mujeres indígenas como anticonceptivo (Hunter y Becerra, 1976; Costa de Pasquale *et al.*, 1984). Una planta rica en oxalatos cuya savia lechosa resulta tóxica por contacto o ingestión (Shofner y Kimball, 2011).

6.3 *Piper auritum* Kunth (Hoja Santa)

Clasificación taxonómica

| | |
|----------|----------------------|
| ORDEN: | Piperales |
| FAMILIA: | <i>Piperaceae</i> |
| GENERO: | <i>Piper</i> |
| ESPECIE: | <i>auritum</i> Kunth |

Planta herbácea que crece en climas tropicales y se mantiene siempre verde, es un arbusto o árbol pequeño de hasta dos metros de altura. Tallo grueso y erecto con nudos, que en algunas zonas se descortezaza. Hojas pecioladas, alternas, ovales, puntiagudas con nervaduras membranosas y largas (entre 15 y 25 cm de largo por 12-21 cm de anchura, con pubescencia corta que le proporciona un tacto ligeramente aterciopelado. Inflorescencia en forma de espigas florales axilares y pecioladas. Flores aclamídeas. En la madurez, la espiga se llena de diminutos frutos en drupa de 0,8 – 1 milímetro de diámetro, glabros de color verde pálido amarillento, que reservan cada uno una semilla en su interior (Figura 13).



Figura 13. *Piper auritum* Kunth.

Los aceites esenciales extraídos de plantas pertenecientes a la tribu Pipereae, familia *Piperaceae*, inhiben el crecimiento de un amplio grupo de microorganismos que causan infecciones importantes en el hombre, plantas y animales (Delgado y Cuca, 2007).

Composición química

Los aceites esenciales en el género *Piper*, aislados de material vegetal, son un complejo de compuestos mixtos volátiles. Químicamente, presenta metabolitos secundarios derivados de terpenos, compuestos oxigenados y algunos compuestos que contribuyen a la actividad biológica (Olivero-Verbel *et al.*, 2009). En extractos metanólicos se ha identificado la presencia de flavonoides y alcaloides (Castañeda *et al.*, 2007; Olivero-Verbel *et al.*, 2009; Delgado-Barreto *et al.*, 2012). Aniszewski (2007) señala que algunos alcaloides se consumen en los alimentos como parte del producto final (piperina, cafeína, capsaicina, entre otros) (Figura 14).

Sánchez *et al.* (2009) señalan que los trabajos relacionados con la composición de *P. auritum* coinciden con la presencia de safrol como componente mayoritario. Castro y Poveda (1983) y Gupta *et al.* (1985) informan que el safrol es el constituyente principal del aceite esencial de caisimón, encontrándose en una concentración de 70 a 85 % de la composición total. Recientemente, Blanco *et al.* (2006) señalaron que el aceite esencial de esta especie contiene una fracción oxigenada como componente mayoritario, la cual es rica en safrol, b- linalol, cineol y acetato de terpineol, así como una fracción hidrocarbonada rica en sesquiterpenos.

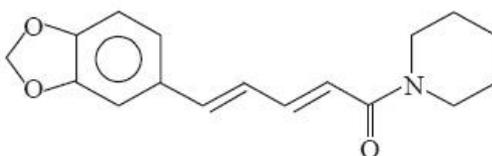


Figura 14. Estructura química de la Piperina.

Actividad biológica

Con el extracto de *P. auritum* se han realizado investigaciones para evaluar la actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides*; bacterias fitopatógenas e insectos plaga (Cuadro 5).

Cuadro 5. Estudios de actividad biológica de extractos de *Piper auritum*.

| Especie | Estudio y organismo | Literatura |
|----------------------|--|--|
| <i>Piper auritum</i> | Control biológico de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . | Baños-Guevara <i>et al.</i> , 2004 |
| | Actividad antifúngica sobre <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | Hernández-Albíter <i>et al.</i> , 2007 |
| | El efecto antibacteriano contra <i>Xanthomonas albilineans</i> y <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>Avenae</i> | Sánchez <i>et al.</i> , 2009 |
| | Desarrollo de productos con actividad plaguicida y antitumoral para <i>Artemia salina</i> y <i>Xanthomonas albilineans</i> | Sánchez <i>et al.</i> , 2011 |
| | Efecto antialimentario y la toxicidad de los extractos en larvas de <i>Spodoptera exigua</i> | Delgado-Barreto <i>et al.</i> , 2012 |
| | Actividad antiplasmodial y citotóxica de extractos etanólicos de especies de género <i>Piper</i> | Mesa-Vanegas <i>et al.</i> , 2012 |
| | Actividad contra <i>Colletotrichum acutatum</i> y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | Pineda <i>et al.</i> , 2012 |

Usos

Las plantas del género *Piper* son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de vaginitis, desórdenes intestinales y antimicrobiano, además es citotóxico en células a nivel mitocondrial (Mesa *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2008). Los metabolitos secundarios encontrados en los extractos, obtenidos de diferentes partes de estas plantas, muestran actividad antifúngica, insecticida, antialimentaria, estimulante, bactericida y citotóxica (Oliveira *et al.*, 2004; Delgado y Cuca, 2007; Mesa *et al.*, 2007).

6.4 *Nerium oleander* L. (Adelfa)

Clasificación taxonómica

ORDEN: Gentianales

FAMILIA: *Apocynaceae*
SUBFAMILIA: *Apocynoideae*
GENERO: *Nerium*
ESPECIE: *oleander*

N. oleander es originaria de la India y Pakistán, se distribuye a través de los Himalayas, Nepal hacia el oeste de Cachemira (Chaudhary y Prasad, 2014). Es un arbusto de 1 a 4 m de altura con ramas erectas. Las hojas son ternadas, sésiles, coriáceas, gruesas, lanceoladas, agudas y de color verde oscuro. La inflorescencia es una cima con flores pedunculadas, olorosas, de color rojo, rosa o blanco. El cáliz está formado por 5 sépalos soldados y la corola simpétala cortamente tubular. Poseen 5 lóbulos patentes laciniados en la base que, en conjunto, toma aspecto de corona. El fruto está formado por dos largos folículos fusiformes (aunque a menudo uno aborta) con semillas numerosas (Figura 15).



Figura 15. *Nerium oleander* L.

Composición química

Gran parte de los metabolitos secundarios presentes en la planta tienen actividad biológica y corresponden principalmente a los glicósidos cardiotónicos entre los que se encuentran: oleandrina, oleandrigenina, diacetiloleandrina, odorósido, nerióside, nerifolina y betulina (Figura 16) (Zhao *et al.*, 2007). De acuerdo con el tamizaje fitoquímico realizado por Santhi *et al.* (2011), en *N. oleander* se encontró presencia de glicósidos cardiotónicos y de alcaloides, posiblemente los responsables de la acción farmacológica y la toxicidad de la especie.

Alfonso *et al.* (2005) y Celis *et al.* (2008), señalan que adelfa presenta triterpenos, fenoles y flavonoides. Toda la planta es peligrosa pero de manera especial las flores, las hojas y el látex, contiene heterósidos cardiotónicos como la oleandrina de acción parecida a la digitoxina y otros principios activos son el digitalósido, el neirósido y el oleandrósido.

Siddiqui *et al.* (2012) reportan triterpenos pentacíclicos, ácido oleanderocinoico, glicosidos cardenolidos, flavonoides, quercetina-5-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranoside y kaempferol-5-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranoside y oleandigósido.

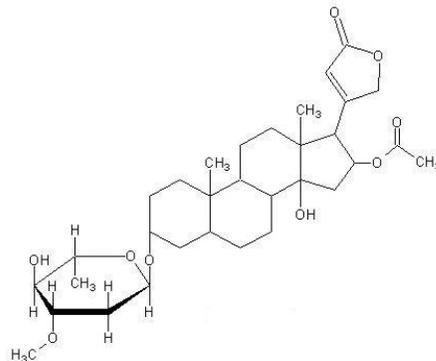


Figura 16. Estructura química de la Oleandrina.

Actividad biológica

Con el extracto de *N. oleander* se han realizado principalmente estudios de fitotoxicidad y actividad alelopática; aunque también se tienen trabajos sobre *C. gloeosporioides*, *Alternaria solani* y *Bipolaris oryzae*; también se ha evaluado la actividad insecticida (trips en cebolla) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Estudios de actividad biológica de extractos de *Nerium oleander*.

| Especie | Estudio y organismo | Literatura |
|------------------------|---|------------------------------------|
| <i>Nerium oleander</i> | Actividad insecticida contra Trips en cebolla | Pawar <i>et al.</i> , 2003 |
| | Actividad fitotóxica en <i>Echinochloa crus-galli</i> y <i>Monochoria vaginalis</i> | Khanh <i>et al.</i> , 2005 |
| | Actividad antifúngica sobre <i>Bipolaris oryzae</i> | Harish <i>et al.</i> , 2007 |
| | Actividad antifúngica sobre <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | Bomfim-Celoto <i>et al.</i> , 2008 |
| | Actividad alelopática en <i>Lactuca sativa</i> L. | Anjum <i>et al.</i> , 2010 |
| | Actividad fitotóxica sobre <i>Parthenium hysterophorus</i> L. | Kumar <i>et al.</i> , 2011 |
| | Actividad antifúngica sobre <i>Alternaria solani</i> | Nashwa y Abo-Elyousr, 2012 |
| | Actividad fitotóxica en <i>Cynodon dactylon</i> L. | Maharaj y Prabhakaran, 2014 |
| | Actividad antifúngica <i>Alternaria alternata</i> | Singh <i>et al.</i> , 2014 |

Usos

En medicina homeopática las hojas se utilizan para tratar enfermedades del sistema nervioso, hemiplejía y condiciones paralíticas, lo anterior bajo estricta supervisión médica. *Nerium oleander* L. es una planta muy estudiada desde el punto de vista toxicológico. También existen cremas para el tratamiento de la piel por sus propiedades antioxidantes (Chaudhary y Prasad, 2014).

6.5 *Tulbaghia violacea* Harv. (Ajillo)

Clasificación taxonómica

| | |
|-------------|-----------------------|
| ORDEN: | Asparagales |
| FAMILIA: | <i>Amaryllidaceae</i> |
| SUBFAMILIA: | Allioideceae |
| TRIBU: | Tulbaghieae |
| GENERO: | <i>Tulbaghia</i> |
| ESPECIE: | <i>violacea</i> |

Especie originaria de Sudáfrica presenta hojas acintadas, largas y estrechas, erectas, un poco carnosas y con aroma a ajo (Belewa *et al.*, 2011). Desarrolla rizomas que se extienden formando matas espesas. Presenta flores rosadas, tubulares, agrupadas (hasta 20) en umbelas terminales en el extremo de los tallos floríferos. Florece muy abundantemente desde abril a finales de noviembre (Figura 17).



Figura 17. *Tulbaghia violacea* Harv.

Composición química

Desde el punto de vista fitoquímico, en el ajo, y las demás especies de la familia con el mismo olor, entre ellas el ajillo, abundan compuestos azufrados del tipo organosulfurados -alil-sulfuros, propionaldehídos, propintol y disulfuro de vinilo (Figura 18) (Shaath *et al.*, 1995; Haciseferogullar *et al.*, 2005; Nishida *et al.*, 2008). La planta también contiene flavonoides y otros compuestos azufrados derivados de la cisteína (López-Sáez y Pérez-Soto, 2010). Auger y Thibout (2004) indican la presencia de compuestos azufrados del tipo organosulfurados (sulfóxido de S-etil-cisteína).

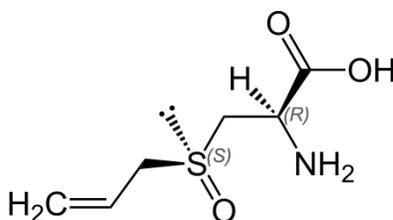


Figura 18. Estructura química de Aliina

Actividad biológica

Los extractos crudos de *T. violacea* se han evaluado principalmente contra hongos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Estudios de actividad biológica de extractos de *Tulbaghia violacea*.

| Especie | Estudio y organismo | Literatura |
|---------------------------|---|-----------------------------|
| <i>Tulbaghia violacea</i> | Actividad antifúngica contra <i>B. cinerea</i> , <i>Pythium ultimum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> . | Lindsey y Standen, 2004 |
| | Actividad antifúngica contra <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Mycosphaerella pinodes</i> , <i>Botryosphaeria dothidea</i> y <i>P. ultimum</i> | Nteso y Pretorius, 2006 |
| | Actividad Antifúngica contra <i>Puccinia triticina</i> | Cawood <i>et al.</i> , 2010 |
| | Actividad antifúngica contra <i>Aspergillus flavus</i> | Belewa <i>et al.</i> , 2011 |

Usos

El género *Tulbaghia* cuenta con aproximadamente 63 especies con valor nutritivo, ornamental y medicinal. En África, por siglos se ha utilizado en medicina tradicional (Adeyemi y Van Staden, 2013). *Tulbaghia* (ajo silvestre), es un género de plantas más estrechamente relacionados con el género *Allium*, tanto en la familia *Alliaceae*. Los indígenas de Africa usan varias especies del género como alimento y extractos medicinales, y algunas especies se cultivan como plantas ornamentales (Lyantagaye, 2011).

6.6 *Raphanus sativus* L. (Nabo blanco)

Clasificación taxonómica

| | |
|----------|---------------------|
| ORDEN: | Brassicales |
| FAMILIA: | <i>Brassicaceae</i> |
| GENERO: | <i>Rhaphanus</i> |
| ESPECIE: | <i>sativus</i> |

Originario de Europa y Asia, introducido y cultivado en casi todo el mundo (Pérez-Gutiérrez y Lule-Pérez, 2004). Planta herbácea, anual o bienal, cultivada como anual, alógama de autoincompatibilidad variable. Raíz pivotante, desde periférica hasta napiforme, gruesa y carnosa, de carne blanca. Tallos erectos, fistulosos, de hasta 1,5 m de altura (Figura 19). Hojas basales en roseta de 5-30 cm de longitud, con lóbulos desiguales e irregularmente dentados. Hojas caulinares menos lobuladas y dentadas, de 25-40 x 10-15 cm, con peciolos mas cortos que los de las hojas basales. Flores con pedicelos de 7-0 mm, en racimos axilares y terminales. Sépalos oblongo-lineares, de 6-10 mm de longitud. Corola de 1,5-1,7

cm de diámetro. Pétalos verdosos o violáceos, rara vez blancos de 0,8-2 cm de longitud. Estambres 6. Artejo inferior de la silicua con 1-2 semillas y artejo superior, de 2-7 cm de longitud y con 12-14 semillas redondeadas, de 2-4 mm de color castaño claro y con la testa finamente reticulada.



Figura 19. *Raphanus sativus* L.

Composición química

Las plantas de la familia *Brassicaceae* contienen principalmente glucosinolatos (Granados-Sánchez y Ruíz-Puga, 2008). Molina-Vargas (2013) señala que los metabolitos secundarios conocidos como glucosinolatos son muy abundantes en la familia *Brassicaceae*. Los glucosinolatos son compuestos heterosídicos aniónicos responsables de olores fuertes, irritantes y de los sabores picantes característicos de especies como mostaza, rábano, berro, etc. La estructura básica de un glucosinolato contiene un azúcar, un grupo sulfato y una parte no glucídica variable (Figura 20) (Ringuelet y Viña, 2013).

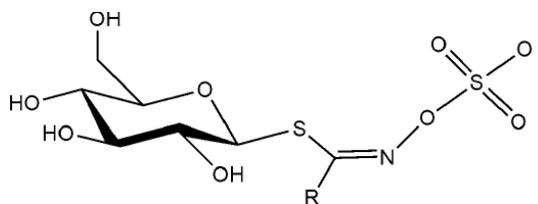


Figura 20. Estructura general de los glucosinolatos.

El análisis cualitativo de diferentes extractos de semilla de *R. sativus* revelan la presencia de alcaloides, flavonoides, glucósidos, fenoles, taninos, saponina y esteroides, los cuales pueden ser los responsables de la actividad antibacteriana contra *E. coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphalococcus aureus*, *Shigella sonnie*, *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* (Ahmad *et al.*, 2012)

Actividad biológica

Se tienen pocos trabajos de extractos de *R. sativus* contra organismos plaga en cultivos (Cuadro 8); sin embargo se han estudiado principalmente en el área farmacéutica (Pérez-Gutierrez y Lule-Perez, 2004).

Cuadro 8. Estudios de actividad biológica de extractos de *Raphanus sativus*.

| Especie | Estudio y organismo | Literatura |
|--------------------------------|--|------------------------------------|
| | Actividad antifungal contra <i>Fusarium culmorum</i> | Pérez-Gutierrez y Lule-Perez, 2004 |
| <i>Raphanus sativus</i> | Actividad alelopática en <i>Lactuca sativa</i> y <i>Shorghum halepense</i> | Uludag <i>et al.</i> , 2006 |

Usos

En homeopatía se utiliza para curar el dolor de cabeza, insomnio y diarrea crónica, asimismo es útil en transtornos del hígado y la vesícula biliar (Singh y Singh, 2013). También se usa en la preparación de algunos alimentos.

6.7 *Brassica napobrassica* (L.) Mill. (Colza)

Clasificación taxonómica

| | |
|----------|---------------------|
| ORDEN: | Brassicales |
| FAMILIA: | <i>Brassicaceae</i> |
| GENERO: | <i>Brassica</i> |
| ESPECIE: | <i>Napobrassica</i> |

El origen de este cultivo posiblemente tuvo lugar en Asia. Posteriormente se fue practicando a lo largo del Mediterráneo, de tal forma que, griegos y romanos cultivaban esta planta con fines alimenticios y medicinales (Smekalova, 2008). Planta anual o bienal. Raíz cónica, gruesa, de color amarillo a violeta. Altura: 100-150 cm. Tallo ramificado, glabro. Flor: Corola regular (actinomorfa), de color amarillo, de aproximadamente 1-1,5 cm transversalmente; cuatro pétalos, de 10-15 mm de largo. Cuatro sépalos, seis estambres, de los cuales cuatro son largos y dos cortos. Gineceo unido, un solo carpelo. La inflorescencia es un racimo que se alarga en la etapa de producción de frutos. Flores bastante parangonables con los brotes. Hojas: Alternas, inferiores con pecíolo, superiores sin pecíolo, amplexicaulas. Limbo glabro, de color verde azulado, hojas basales con lóbulos poco profundos, hojas superiores enteras, lanceoladas (Figura 21). Fruto: Vaina extendida bastante erecta con muchas semillas, se abre longitudinalmente, en general de 5-8 cm de largo, termina en un pico redondeado, de 1-2 cm de largo, sin semillas.



Figura 21. *Brassica napobrassica* (L.) Mill.

Composición química

Las propiedades antifúngicas de las plantas de la familia *Brassicaceae* se atribuyen principalmente a los isotiocianatos que se forman al ser dañadas, los cuales son responsables en parte de su particular sabor y están entre los agentes naturales del control orgánico más efectivos de enfermedades causadas por hongos (Ortega-Centeno *et al.*, 2010; Shapiro *et al.*, 2005).

Regnault-Roger *et al.* (2004) mencionan que las Brasicaceas productoras de glucosinolatos han demostrado una clara actividad herbicida; además, en la mayor parte de los estudios sobre los efectos nematicidas se ha recomendado el empleo de abonos verdes a base de diferentes especies, tanto silvestres como cultivadas, para luchar por biofumigación contra los nematodos formadores de agallas o quistes en las raíces.

Actividad biológica

Los extractos de *B. napobrassica* se han evaluado en nematodos y bacterias; así como por su actividad alelopática en monocotiledóneas y dicotiledóneas (Cuadro 9).

Cuadro 9. Estudios de actividad biológica de extractos de *Brassica napobrassica*.

| Especie | Estudio y organismo | Literatura |
|-------------------------------------|---|---------------------------------------|
| <i>Brassica napobrassica</i> | Actividad alelopática en <i>Kochia arenaria</i> | Moyer y Huang, 1997 |
| | Nematicida contra <i>Xiphinema index</i> | Aballay e Insunza, 2002 |
| | Nematicida contra <i>Meloidogyne javanica</i> | Dos Santos Neves <i>et al.</i> , 2005 |
| | Actividad alelopática en <i>Shorgum halepense</i> | Uludag <i>et al.</i> , 2006 |
| | Actividad antibacteriana contra <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> y <i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>Alliicola</i> | Kowalska y Smolinska, 2008 |
| | Alternativa viable a la utilización del bromuro de metilo contra microorganismos del suelo. | Ortega-Centeno <i>et al.</i> , 2010 |

Usos

Se cultiva por todo el mundo para producir forraje ya que es una abundante fuente de proteínas vegetales. Además las semillas son ricas en aceite (hasta 45 %), en grasas monoinsaturadas y ácido linoleico. Este aceite se utiliza como lubricante, para la fabricación de jabón y detergentes, para combustibles y biodiesel, en la alimentación e industria alimentaria (Ringuelet y Viña, 2013).

7 Metodologías *in vitro* para la evaluación antifúngica.

Método de Difusión en agar: Bauer *et al.* (1966) implementaron la metodología *in vitro*, para la evaluación de la actividad antimicrobiana, mediante protocolos de difusión del producto en cajas Petri con medio de cultivo que se mezcla con el compuesto en una proporción definida. Para luego, colocar un disco (5-10 mm de diámetro) con desarrollo del hongo fitopatógeno en el centro de la caja sobre la superficie del medio y evaluar la inhibición del crecimiento radial respecto del control (Hadacek y Greger, 2000; Folman *et al.*, 2004). Una variación de esta metodología, es disponer una suspensión de esporas (10-20 μ l) en el centro de la caja (Hadacek y Greger, 2000), o bien, colocar la suspensión (0.5-1 ml) distribuida sobre la superficie del medio de cultivo, donde se colocan discos de papel filtro (3-5 mm de diámetro) impregnados con el extracto, para medir el halo de inhibición (zonas libres de micelio) (Dardari *et al.*, 2004). También se pueden colocar discos con crecimiento de hongo (7 mm) enfrentados con discos (5 mm) inoculados con el extracto, conservando una distancia entre ellos de 20-25 mm, dentro de cajas Petri con medio de cultivo (Chairusia *et al.*, 2005), para estimar el crecimiento radial.

Las desventajas de la metodología de difusión en agar es el uso de cantidades grandes del compuesto, la volatilización, el tipo de agar, el pH, la cantidad de agar, todos estos factores pueden afectar la zona de inhibición (Scorzoni *et al.*, 2016).

Método de Dilución: Además de estos ensayos de difusión en medio sólido, se han desarrollado protocolos de dilución (microdilución y macrodilución) en medio líquido, en placas tipo ELISA de 96-pozos, para evaluar la susceptibilidad de los

fitopatógenos, que permite evaluar la germinación de los conidios, mediante observación directa por microscopia (Slawecki *et al.*, 2002), así como la interferencia en el crecimiento del hongo, por determinación de la absorbancia. La técnica de microdilución es más económica (se utiliza menor cantidad de inóculo y del compuesto), proporciona resultados reproducibles y la biomasa fúngica se evalúa visualmente o por espectrofotometría (Scorzoni *et al.*, 2016).

Método colorimétrico: Algunas especies de hongos no generan suficiente biomasa fúngica para aplicar la dilución por microdilución, por lo que alternativamente, la biomasa se puede determinar colorimétricamente en el que la actividad metabólica y la biomasa de los hongos pueden estimarse utilizando una sustancia colorimétrica. Es decir la microdilución colorimétrica se utiliza para rastrear compuestos con actividad antifúngica (Scorzoni *et al.*, 2016).

Otros protocolos que buscan evaluar únicamente una variable, como la inhibición de la germinación, al disponer en láminas de vidrio un volumen (μl) del compuesto y de la suspensión de esporas del hongo, como lo realizado por Silva *et al.* (2001) donde evaluaron extractos de *Caryocar brasiliense* frente a *Botrytis cinerea*.

Método de disco por volatilización: El método se utiliza para probar la actividad antifúngica de la fase de vapor de los aceites esenciales. La técnica consiste en colocar un disco del hongo de interés (diámetro 6 mm) en la caja y se aplican diferentes volúmenes de aceite esencial en papel filtro esterilizado, las cajas se cierran herméticamente con parafilm y se incuban en posición invertida. Se evalúa el porcentaje de inhibición del crecimiento radial con respecto al control (Ali *et al.*, 2015).

8 Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀)

Para el Cálculo de la CI₅₀ y sus respectivos límites estadísticos de confianza al 95 % se utiliza el método Probit, ya sea manualmente o con ayuda de paquetes estadísticos que tengan este procedimiento. El método de análisis Probit permite estimar la CI₅₀ ajustando los datos mediante una técnica de probabilidad para estimar los valores que siguen una distribución logarítmica de tolerancias. El porcentaje de organismos afectados o muertos por la acción tóxica de una sustancia se transforma a unidades Probit. Esta transformación permite el ajuste a una línea de regresión, en la cual la concentración perteneciente al Probit 0.5 corresponderá a la cantidad de sustancia capaz de inhibir a la mitad de la población (Díaz-Báez *et al.*, 2004).

9 LITERATURA CITADA

- Aballay, E. y B. Insunza V. 2002. Evaluación de plantas con propiedades nematocidas en el control de *Xiphinema index* en vid de mesa cv Thompson seedless en la zona central de Chile. Agricultura Técnica 62: 357-367.
- Abbod, J. K. and D. Lösel M. 2003. Changes in carbohydrate composition of cucumber leaves during the development of powdery mildew infection. Plant Pathology 52:256-265.
- Adaskaveg, J. E. and R. Hartin, J. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. Phytopathology 87: 979-987.
- Adeyemi, O. A. and J. Van Staden. 2013. The genus *Tulbaghia* (Alliaceae). A review of its ethnobotany, pharmacology, phytochemistry and conservation needs. Journal of Ethnopharmacology 149: 387-400.
- Afanador-Kafuri, L., D. Minz, M. Maymon and S. Freeman. 2003. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. Phytopathology 93:579-587.
- Agrios, G. N. 1997. Plant Pathology. Fourth Edition. Academic Press, San Diego, California. 552 p.
- Agrios, G. N. 2002. Fitopatología. Editorial Limusa. México, D.F. 838 p.
- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Academic Press. Nueva York. 803 p.

- Ahmad, F. B., I. Hasan, D. Kamal Chishti and H. Ahmad. 2012. Antibacterial Activity of *Raphanus sativus* Linn. Seed Extract. Global Journal of Medical Research 12: 25-33.
- Alarcón, R. J. J. and M. Chavarriaga W. 2007. Diagnóstico precoz de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) (Penz) Penz and Sacc. En tomate de árbol mediante el empleo de infecciones quiescentes. Agronomía 15: 89-102.
- Albuquerque, M., R. Santos, L. Lima, P. Melo-Filho, R. Nogueira and C. Cámara-Ramos. 2011. Allelopathy, an alternative tool to improve cropping systems. A review. Agronomy for Sustainable Development 31: 379-395.
- Alfonso, M. R., Y. Villasana, M. Lorenzo E., D. Álvarez, D. Pérez y H. Uranga. 2005. Análisis fitoquímico de cinco plantas con actividad alelopática. *In*: Memorias XVII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas. Varadero, Matanzas, Cuba. pp. 592-595.
- Ali, A., T. Wee Pheng and M. A. Mustafa. 2015. Application of lemongrass oil in vapour phase for the effective control of anthracnose of 'Sekaki' papaya. Journal of Applied Microbiology 118: 1456-1464.
- Al Surhane, A. M. 2013. Efficiency of the Extracts of Some Plants on Squash Powdery Mildew. Mediterranean Journal of Social Sciences 4: 39-49.
- Aniszewski, T. 2007. Alkaloids-Secrets of Life. Elsevier. The Netherlands. 316 p.
- Anjum, A., U. Hussain, Z. Yousaf, F. Khan and A. Umer. 2010. Evaluation of allelopathic action of some selected medicinal plant on lettuce seeds by using sandwich method. Journal of Medicinal Plants Research 4: 536-541.

- Antonious, A. G., G. Hegazy, M. El-Sharaawy F. and L. Youssef A. 1992. Reaction of feeding the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) on certain plant leaves. 3: Latent effect of larval feeding. Journal article Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent 57: 707-713.
- Antonious, G. F., J. Meyer E. and J. Snyder C. 2006. Toxicity and repellency of hot pepper extracts to spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. Journal of Environmental Science and Health 41: 1383-1391.
- Apablaza, G., M. Díaz J., R. San Martín y E. Moya. 2002. Control de oidio de las cucurbitáceas con saponinas presentes en extractos de quillay (*Quillaja saponaria*). Ciencia e Investigación Agraria 29: 83-90.
- Arias, L. A. y L. Fuentes S. 2012. Manejo de plagas y enfermedades. *In*: Manual de Producción de Pimiento Bajo Invernadero. C. Bojacá R. and O. Monsalve (eds.). Editorial Fundación Universidad de Bogota Jorge Tadeo Lozano, Colombia. pp. 142-143.
- Arango, M. C. 2013. Intervención de los compuestos secundarios en las interacciones biológicas. *In*: Productos Naturales Vegetales. Ringuelet, J. y S. Viña (eds.). Editorial de la Universidad de La Plata. La Plata, Buenos Aires, Argentina. pp. 191-256.
- Auger, J. y E. Thibout. 2004. Sustancias azufradas de los *Allium* y de las crucíferas: potencial fitosanitario. *In*: Biopesticidas de Origen Vegetal. Regnault-Roger, C., B. J. Philogene R. y C. Vincent (eds.). Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 77-92.

- Ávalos-García, A. y E. C. Pérez-Urria. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca. Serie Fisiología Vegetal*. 2: 119-145.
- Averre, Ch., R. Jones and R. Milholland. 2003. Strawberry Diseases and their Control. Fruit Disease information. Note 5. Plant Pathology Extension. North Carolina State Univ. U.S. 9 p.
- Bailey A., J. and J. Jeger M. 1992. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. British Society for Plant Pathology. C.A.B. International. 388 p.
- Baños-Guevara, P. E., E. Zavaleta-Mejía, M. T. Colinas-Leon, I. Luna-Romero. y J. G. Gutierrez-Alonso. 2004. Control biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* ((Penz.) Penz. y Sacc.) en papaya Maradol roja (*Carica papaya* L.) y fisiología poscosecha de frutos infectados. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22: 198-205.
- Barnett, H. L. and B. Hunter B. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. The American Phytopathological Society. USA. 218 p.
- Barlett, D. W., J. Clough M., J. Godwin R., A. Hall A., M. Hamer, and B. Parr-Dobrzanski. 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Management Science* 58: 649-662.
- Barreiro, P. M. 1998. Una Hortaliza de México para el Mundo. *Claridades Agropecuarias* No.56. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México, D.F. 24 p.
- Bauer, A. W., W. Kirby M., J. Sherris C. and M. Turck. 1966 Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* 45: 493-496.

- Bautista-Baños, S., M. Hernández-López, E. Bosquez-Molina, and C. Wilson L. 2003. Effect of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides* anthracnose level and quality of papaya fruit. *Crop Protection* 22: 1087-1092.
- Blanco, N. H., A. Ramos R. y A. Vizoso P. 2006. Evaluación tóxica y genotóxica del extracto fluido de *Piper auritum* H. B. K. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 11: 3-4.
- Benedicto, L. H., E. Bergmann C., M. Potenza R., M. Sato E. and R. Nishimori K. 1998. Evaluation of the control of *Opogona sacchari* (Bojer, 1856) (Lepidoptera: *Tineidae*) using plant extracts in laboratory conditions. *Journal Arquivos do Instituto Biológico (Sao Paulo)* 65: 21-27.
- Benito, E. P., M. Arranz y A. Eslava P. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Revista Iberoamericana de Micología* 17: S43-S46.
- Belewa, V., H. Baijnath and B. Somai M. 2011. Aqueous extracts from the bulbs of *Tulbaghia violacea* are antifungal against *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Safety* 31: 176–184.
- Bolkan, H. A., F. Cupertino P., J. Dianese C. and A. Takatsu. 1976. Fungi associated with pre and post-harvest fruit rots on papaya and their control in central Brazil. *Plant Disease Reporter* 60: 605-609.
- Bomfim-Celoto, M. I., M. Stradioto-Papa F., L. Silvado-Sacramento V. e F. Juari-Celoto. 2008. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. *Acta Scientiarum. Agronomy* 30: 1-5.
- Borges-Gómez, L., L. Cervantes-Cárdenas, J. Ruiz-Novelo, M. Soria-Fregoso, V. Reyes-Oregel y E. Villanueva-Couoh. 2010. Capsaicinoides en chile

- habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) bajo diferentes condiciones de humedad y nutrición. *Terra Latinoamericana* 28: 35-41.
- Bubici, G., M. Amenduni M., C. Colella, M. D'Amico and M. Cirulli. 2006. Efficacy of acibenzolar-S-methyl and two strobilurins, azoxystrobin and trifloxystrobin, for the control of corky root of tomato and verticillium wilt of eggplant. *Crop Protection* 25: 814-820.
- Castañeda, M. L., A. Muñoz, J. Martínez R. y E. Stanshenko E. 2007. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Scientia et Technica* 33: 165-166.
- Castillo-Sánchez, L. E., J. J. Jiménez-Osornio y M. A. Delgado-Herrera. 2012. Actividad biológica *in vitro* del extracto de *Capsicum chinense* Jacq contra *Bemisia tabaci* Genn. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 18: 345-356.
- Castro, C. O. y L. Poveda J. 1983. *Piper auritum* H.B.K. familia *Piperaceae*. Estudio preliminar del aceite esencial de sus hojas. *Ingeniería de Ciencias Químicas* 7:24-25.
- Cawood, M. E., J. Pretorius C., A. Van Der Westhuizen J. and Z. Pretorius A. 2010. Disease development and PR-protein activity in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings treated with plant extracts prior to leaf rust (*Puccinia triticina*) infection. *Crop Protection* 29: 1311-1319.
- Celis, A., C. Mendoza, M. Pachon, J. Cardona, W. Delgado y L. Cuca E. 2008. Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia *Piperaceae*. Una revisión. *Agronomía Colombiana* 26: 97-106.

- Cichewicz, R. H. and P. Thorpe A.1996. The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 52: 61-70.
- Chaudhary, K. and D. Prasad N. 2014. A review on: *Nerium oleander* Linn. (Kaner). *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 6: 593-597.
- Chatzidimopoulos, M., D. Papaevaggelou and A. Pappas C. 2013. Detection and characterization of fungicide resistant phenotypes of *Botrytis cinerea* in lettuce crops in Greece. *European Journal of Plant Pathology* 137: 363–376.
- Chaves, N. y A. Wang. 2004. Combate al moho gris (*Botrytis cinerea*) de la fresa mediante *Gliocladium roseum*. *Agronomía Costarricense* 28: 73-85.
- Chiapusio, G., C. Gallet, J. Dobremez F. and F. Pellisier. 2004. Compuestos alelopáticos: ¿herbicidas del futuro? *In: Biopesticidas de Origen Vegetal*. Regnault-Roger, C., B. J. Philogene R. and C. Vincent (eds.). Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 153-171.
- Chinn, M. S., R. R. Sharma-Shivappa and J. Cotter L. 2011. Solvent extraction and quantification of capsaicinoids from *Capsicum chinense*. *Food and Bioproducts Processing* 89: 340-345.
- Chirinos, J. 2009. Uso de extractos naturales como una alternativa ecológica para el control de enfermedades en plantas. Aspectos fitosanitarios. INIA Divulga. Venezuela. pp. 40-42.

- Coates, L. M. and D. Gowanlock. 1993. Infection process of *Colletotrichum* species in tropical and subtropical fruits. Proceeding in an International Agricultural Research (ACIAR) 30: 162-168.
- Coates, L. M., G. Johnson I., and A. Cooke W. 1993. Postharvest disease control in mangoes using high humidity hot air and fungicide treatments. Annals of Applied Biology 123: 441-448.
- Coley-Smith, J. R., K. Verhoeff and W. Jarvis R. 1980. The Biology of *Botrytis*. Academic Press, London. 318 p.
- Cota, L., L. Maffia, E. Mizubuti y P. Macedo. 2008. Control biológico de la podredumbre gris de la fresa por *Clonostachys rosea* en condiciones de campo. Control Biológico 46: 515-522
- Couey, H. M., A. Alvarez M. and M. Nelson G. 1984. Comparison of hot water spray and immersion treatment for control of postharvest decay of papaya. Plant Disease 68: 436–437.
- Costa de Pasquale, R., S. Ragusa, C. Circosta and A. Forestieri M. 1984. Investigations on *Dieffenbachia amoena* Gentil. I. endocrine effects and contraceptive activity. Journal of Ethnopharmacology 12: 293-303.
- Cristóbal, A. J., J. Tun-Suárez M. y R. Méndez-González. 2006. Prevención y control integral de enfermedades. *In*: Paquete Tecnológico de Producción de Papaya (*Carica papaya* L.). Cituk, C. D. E. (ed.). SEP-Instituto Tecnológico de Conkal. pp. 33-37.
- Croteau, R., T. Kutchan M. and N. Lewis G. 2000. Natural products (secondary metabolites). *In*: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Buchanan,

- B. B., W. Gruissem and R. Jones L. (eds.). Rockville, USA. American Society of Plants Physiologists. pp. 1250-1318.
- Dardari, Z., M. Boudouma, A. Sebban, A. Bahloul, S. Kitane and M. Berrada. 2004. 1-Phenyl-3-toluy-4-[*ortho*-1'-(N-ethyl-2'-methylpropylamine)] phenylpyrazole, synthesis and evaluation of the *in vitro* antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum*. *Farmaco* 59: 673-678.
- Dayan, F. E., C. Cantrell L. and S. Duke O. 2009. Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17: 4022-4034.
- Denoyes-Rothan, B., G. Guérin, E. Lerceteau-Kohler and G. Risser. 2005. Inheritance of resistance to *Colletotrichum acutatum* in *Fragaria x ananassa*. *Phytopathology* 95: 405-412.
- Delgado, A. W. y S. L. Cuca E. 2007. Composición química del aceite esencial de *Piper hispidum*. *Revista Productos Naturales* 1: 5-8.
- Delgado-Barreto, E., M. R. García-Mateos, M. C. Ybarra-Moncada, C. Luna-Morales y M. T. Martínez-Damián. 2012. Propiedades entomotóxicas de los extractos vegetales de *Azardichta indica*, *Piper auritum* y *Petiveria alliacea* para el control de *Spodoptera exigua* Hübner. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 18: 55-69.
- Díaz-Báez, M. C., G. D. Bulus-Rossini y Y. Pica-Granados. 2004. Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad. *In: Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas*. Castillo-Morales, G. (ed.). Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. pp. 99-124.

- Dickman, M. B. and A. Álvarez M. 1983. Latent infection of papaya caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Plant Disease 67: 748-750.
- Dickman, M. B., S. Patil S. and P. Kolatukkudi E. 1982. Purification, characterization and role in infection of an extracellular cutinolytic enzyme from *Colletotrichum gloeosporioides* on *Carica papaya*. Physiological Plant Pathology 20: 333-347.
- Dos Santos Neves, W., L. Grassi De Freitas, R. Dallemole-Giaretta, C. F. Silva Fabry, M. Coutinho M., O. Dhingra D., S. Ferraz e A. Demuner J. 2005. Atividade de extractos de Alho (*Allium sativum*), mostarda (*Brassica campestris*) e pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) sobre a eclosao de juvenis de *Meloidogyne javanica*. Nematologia Brasileira 29: 273-278.
- Elad, Y., N. Malathrakis y A. Dik. 1996. El control biológico de las enfermedades incitado *Botrytis* y mildiú de los cultivos de invernadero. Crop Protection 15: 229-240.
- Faretra, F., E. Antonacci and S. Pollastro. 1988. Sexual behaviour and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*. Journal of General Microbiology 134: 2543-2550.
- Folman, L. B., M. J. Klein E. M., J. Postma, J. Van Veen A. 2004. Production of antifungal compounds by *Lysobacter enzymogenes* isolate 3.1T8 under different conditions in relation to its efficacy as a biocontrol agent of *Phythium aphanidermatum* in cucumber. Biological Control 31: 145-154.
- Fungicide Resistance Action Committee. 2016. FRAC Code List ©.In: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). Brussels, Belgium. pp.1-10.

- Garcés de Granada, E. y M. Orozco de Amézquita. 2004. Algunos problemas patológicos y fisiológicos de la floricultura en Colombia. Ed. UNIBIBLOS. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia 167 p.
- García-Mateos, M. R., A. M. Castillo, J. M. Zárate-Hernández y R. M. Barrón-Yáñez. 2011. Extractos de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev con potencial actividad fitotóxica. *Interciencia* 36: 779-784.
- García-Mateos, M. R., C. Sánchez-Navarro, J. Martínez-Solís y M. Pérez-Grajales. 2013. Actividad fitotóxica de los extractos de chile manzano (*Capsicum pubescens* R & P). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 19: 23-33.
- Glawe, D. A. 2008. The powdery mildews: A review of the world's most familiar (Yet poorly known) plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 46: 25–51.
- Gómez-Tovar, L. y M. A. Gómez-Cruz. 2004. La agricultura orgánica en México y en el mundo. *CONABIO. Biodiversitas* 55:13-15.
- Granados-Sánchez, D. y P. Ruiz-Puga. 2008. Ecología de la herbivoría. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 14: 51-63.
- Gupta, M. P., T. Arias D., N. Williams H., R. Bos and D. H. Tattje E. 1985. Safrole the main component of the essential oil from *Piper auritum* of Panama. *Journal of Natural Products* 48: 330.
- Gutiérrez J., G. A., D. Nieto A., D. Téliz O., E. Zavaleta M., H. Vaquera H., T. Martínez D. y F. Delgadillo S. 2001. Características de crecimiento, germinación, esporulación y patogenicidad de aislamientos de

- Colletotrichum gloeosporioides* Penz. obtenidos de frutos de mango (*Mangifera indica* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 19: 90-93.
- Gutierrez C., L. J., Y. Wang, E. Lutton and B. B. McSpadden Gardener. 2006. Distribution and fungicide sensitivity of fungal pathogens causing anthracnose-like lesions on tomatoes grown in Ohio. Plant Disease 90: 397-403.
- Guzmán, D. 1998. Guía para el cultivo de la papaya (*Carica papaya*). Sistema unificado de información institucional. Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, de Costa Rica. 26 p.
- Haciseferogullar, H., M. Ozcan, F. Demir and S. Calisir. 2005. Some nutritional and technological properties of garlic (*Allium sativum* L.). Journal of Food Engineering 68: 463-469.
- Hadacek, F. and H. Greger. 2000. Testing of antifungal natural products: methodologies comparability of results and assay choice. Phytochemical Analysis 11:137-147.
- Hamdy, B. 2007. Review of strobilurin fungicide chemicals. Journal of Environmental Science and Health 42: 441-451.
- Harish, S, D. Saravanakumar, R. Radjacommar, E. Ebenezar G and K. Seetharaman. 2007. Use of plant extracts and biocontrol agents for the management of brown spot disease in rice. Biocontrol 53: 555-567.
- Henning, C. P. 2013. Compuestos secundarios nitrogenados: Alcaloides. In: Productos Naturales Vegetales. Ringuélet, J. y S. Viña (eds.). Editorial de la Universidad de La Plata. La Plata, Buenos Aires, Argentina. pp. 18-61.

- Henning, C. P. and R. Yordaz. 2013. Otros compuestos secundarios nitrogenados y compuestos azufrados. *In: Productos Naturales Vegetales*. Ringuelet, J. y S. Viña. (eds.). Editorial de la Universidad de La Plata. La Plata, Buenos Aires, Argentina. pp. 62-90.
- Hernández-Albíter, R. C., L. L. Barrera-Necha, S. Bautista-Baños and L. Bravo-Luna. 2007. Antifungal potential of crude plant extracts on conidial germination of two isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz and Sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25: 180-185.
- Hoffmann F., C. E., L. A. Salles das Neves, C. Freitas-Bastos e G. Luz-Wallau. 2007. Atividade alelopática de *Nerium oleander* L. e *Dieffenbachia picta* Schott em sementes de *Lactuca sativa* L. e *Bidens pilosa* L. *Revista de Ciências Agroveterinárias* 6: 11-21.
- Holliday, P. 1995. *Fungus diseases of tropical fruits*. Dovel Publication, Inc. New York. 624 p.
- Holz, G., S. Coertze, and B. Williamson. 2007. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. *In: Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Elad. Y., B. Williamson, P. Tudzynski and N. Denle (eds.). Springer, USA pp: 9-27.
- Hopkins, R. J., N. M. Van Dam and J. J. Van Loon A. 2009. Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions. *Annual Review of Entomology* 54: 57–83.
- Hunter, Z. E. y C. Becerra V. 1976. Estudios químicos y aspectos farmalógicos de un anticonceptivo vegetal. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmaceuticas* 2: 5-35.

- Ikeura, H., N. Somsak, F. Kobayashi, S. Kanlayanarat and Y. Hayata. 2011. Application of selected plant extracts to inhibit growth of *Penicillium expansum* on apple fruits. *Plant Pathology Journal* 10: 79-84.
- INIFAP. 2007. Reporte Anual de Investigación e Innovación Tecnológica. Campo Experimental Mocochoá, Yucatán 302 p.
- Irchhaiya, R., A. Kumar, A. Yadav, N. Gupta, S. Kumar, N. Gupta, S. Kumar, V. Yadav, A. Prakash and H. Gurjar. 2015. Metabolites in plants and its classification. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4: 287-305.
- Jarvis, W. R. 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species: taxonomy, physiology and pathogenicity. Canada Department of Agriculture. Harrow, Ontario, Canada. 204 p.
- Juárez-Becerra, G. P., M. E. Sosa-Morales y A. López-Malo. 2010. Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 4: 14-23.
- Kadir, J., M. Rahman A., T. M. Mahmud M., R. Rahman A. and M. Begum M. 2008. Extraction of antifungal substances from *Burkholderia cepacia* with antibiotic activity against *Colletotrichum gloeosporioides* on Papaya (*Carica papaya*). *International Journal of Agriculture and Biology* 10: 15-20.
- Kagale, S., T. Marimuthu, B. Thayumanavan, R. Nandakuman and R. Samiyappan. 2004. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 65: 91-100.

- Karabulut, O. A. and N. Baykal. 2004. Integrated control of postharvest disease of peaches with a yeast, hot water and modified atmosphere packaging. *Crop Protection* 23: 431-435.
- Khanh, T. D., N. Hong H., T. Xuan D. and I. Chung M. 2005. Paddy weed control by medicinal and leguminous plants from Southeast Asia. *Crop Protection* 24: 421-431.
- Kim, K. D., B. Oh J. and J. Yang. 2001. Differential interactions of a *Colletotrichum gloeosporioides* isolate with green and red pepper fruits. *Phytoparasitica* 27: 1-10.
- Kim, Y. K. and C. Xiao L. 2010. Resistance to pyraclostrobin and boscalid in populations of *Botrytis cinerea* from stored apples in Washington State. *Plant Disease* 94: 604-612.
- Kowalska, B. and U. Smolinska. 2008. The effect of selected plant materials and extracts on the development of bacterial diseases on onion. *Vegetables Crops Research Bulletin* 68:33-45.
- Krishna De, A. 2003. *Capsicum: The Genus Capsicum*. Medicinal and Aromatic Plants. Industrial Profiles Vol. 33. Taylor & Francis, London and New York. 275 p.
- Kumar, N. A., N. Divyashree R., K. Kiran, G. Pavithra S., B. Rohini, A. Sangeeta and S. Srinivas. 2011. Inhibitory effects of *Nerium oleander* L. and its compounds, rutin and quercetin, on *Parthenium hysterophorus* L. *Journal of Agricultural Science* 3: 123-137.

- Latorre, B. A. and R. Torres. 2012. Prevalence of isolates of *Botrytis cinerea* resistant to multiple fungicides in Chilean vineyards. *Crop Protection* 40: 49-52.
- Latournerie-Moreno, L., J. L. Chávez-Servia, M. Pérez-Pérez, G. Castañón-Nájera, S. A. Rodríguez-Herrera, L. M. Arias-Reyes y P. Ramírez-Vallejo. 2002. Valoración *in situ* de la diversidad morfológica de chiles (*Capsicum annum* L. y *Capsicum chinense* Jacq.) en Yaxcabá, Yucatán. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25: 25-33.
- Latunde-Dada, A. O. 2001. *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. *Molecular Plant Pathology* 2: 187-198.
- Lay-Yee, M., G. Clare K., R. Petry J., R. Fullerton A. and A. Gunson. 1998. Quality and disease incidence of 'Waimanalo Solo' papaya following forced-air heat treatments. *Horticultural Science* 33: 878–880.
- Lenné, J. M. 1992. *Colletotrichum* diseases of legume. *In: Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Bailey, J. A. and M. J. Jeger (eds.). CAB International. Wallingford, U. K. pp. 134-166.
- Leroux, P. 2007. Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. *In: Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Elad, Y., B. Williamson, P. Tudzinski and N. Delen. (eds.). Springer Verlag, Dordrecht, The Netherlands. pp. 195-222.
- Lindsey, K. and J. Standen V. 2004. Growth inhibition of plant pathogenic fungi by extracts of *Allium sativum* and *Tulbaghia violacea*. *South African Journal of Botany* 70: 671-673.

- Liu, F., Y. Zhuge Y., C. Yang Y., S. Jin X., J. Chen, H. Li and G. Dai H. 2010. Control effects of some plant extracts against cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) and their stability study. *European Journal of Horticultural Science* 75: 147–152.
- López-Sáez, J. A. y J. Pérez-Soto. 2010. Fitoquímica y valor ecológico del olor a ajo en los vegetales. *Medicina naturista* 4: 15-23.
- Lyantagaye, S. L. 2011. Ethnopharmacological and phytochemical review of *Allium* species (sweet garlic) and *Tulbaghia* species (wild garlic) from Southern Africa. *Tanzania Journal of Science* 37: 58-72.
- Maharaj, S. and J. Prabhakaran. 2014. Evaluation of bioherbicidal potential of *Nerium oleander* on growth and development of Bermuda grass (*Cynodon dactylon* L.). *International Journal of Advanced Research* 2: 625-635.
- March, G. J. 2014. Agricultura y plaguicidas. Fundación Agropecuaria para el Desarrollo de Argentina. 261 p.
- Mazid, M., T. Khan and F. Mohammad. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Journal Biology and Medicine* 3: 232-249.
- Mena, G. 1999. Epidemiología y control de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) en mango. México. 47 p.
- Mesa, A. C., J. Montiel, C. Martínez, B. Zapata, N. Pino y J. Bueno G. 2007. Actividad *in vitro* anti-candida y anti-aspergillus de aceites esenciales de plantas de la familia *Piperaceae*. *Scientia et Técnica* 13: 247-249.
- Mesa-Vanegas, A. M., J. F. Toro Suaza, F. Cardona-Naranjo y S. Blair Trujillo. 2012. Actividad antiplasmodial y citotóxica de extractos etanólicos de

- especies de género *Piper*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 11: 154 – 162.
- Molina-Mercader, G., S. Zaldúa-Flores, G. González-Vargas y E. Sanfuentes-Von Stowasser. 2006. Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. Bosque 27: 126-134.
- Molina-Vargas, L. F. 2013. Mechanism of action of isothiocyanates. A review. Agronomía Colombiana 31: 68-75.
- Moyer, J. R. and H. Huang C. 1997. Effect of aqueous extracts of crop residues on germination and seedling growth of ten weed species. Botanical Bulletin of Academia Sinica 38: 131-139.
- Narayanasamy, P. 2006. Postharvest Pathogens and Disease Management. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, USA. 578 p.
- Nashwa S., M. A. and K. A. Abo-Elyousr M. 2012. Evaluation of various plants extracts against the early blight disease of tomato plants under greenhouse and field conditions. Plant Protection Sciences 48: 74-79.
- Nishida, M., T. Hada, K. Kuramochi, H. Yoshida and Y. Mizushin. 2008. Diallyl sulfides: selective inhibitors of family X DNA polymerases from garlic (*Allium sativum* L.). Food Chemistry 108: 551-560.
- Nteso, L. and J. Pretorius C. 2006. *Tulbaghia violacea* L. I: *In vitro* antimicrobial properties towards plant pathogens. Australian Journal of Agricultural Research 57: 511–516.

- Oliveira L., H. W., C. Ehringhausm H. and P. Yoshio K. 2004. Genetic diversity of *Pimenta longa* genotypes (*Piper* spp., *Piperaceae*) of the Embrapa Acre germplasm collection. *Genetics and Molecular Biology* 27: 74-82.
- Olivero-Verbel, J., J. Güette-Fernández and E. Stashenko. 2009. Acute toxicity against *Artemia franciscana* or essential oils isolated from plants of the genus *Lippia* and *Piper* collected in Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 5: 419-427.
- Ortega-Centeno, S., D. Guillén-Sánchez, M. Ramos-García, R. Troncoso-Rojas, R. Villanueva-Arce, E. Bosquez-Molina, L. L. Barrera-Necha y S. Bautista-Baños. 2010. Métodos de inoculación y evaluación de extractos botánicos e isotiocianatos de la familia *Brassicaceae* en el control de la roya del gladiolo. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 16: 13-21.
- Pandey, R. 2015. Mineral nutrition of plants. *In: Plant Biology and Biotechnology. Volume I: Plant Diversity, Organization, Function and Improvement.* Bahadur, B., M. Venkat Rajam, L. Sahijram, K. V. Krishnamurthy (eds.). Springer, New Delhi, India. pp. 499 - 538.
- Pantástico, E. B. 1979. Fisiología de la Post recolección, Manejo y Utilización de Frutas y Hortalizas Tropicales y Subtropicales. Ed. Continental. México, D.F. 663 p.
- Pawar, D. B., S. Warade D., K. Lawande E. and S. Patil K. 2003. Effect of different organic products on onion thrips. *In: Approaches for Sustainable Development of Onion and Garlic.* Singh, K., K. Lawande E., U. Pandey, B., Lallan Singh and S. Bhonde K. (eds.). pp. 209-220.

- Paull, R. E., W. Nishijima R., M. Reyes and C. Cavaletto. 1997. A review of postharvest handling and losses during marketing of papaya (*Carica papaya* L.). *Postharvest Biology and Technology* 11: 165-179.
- Peres, N. A., L. Timmer W., J. Adaskaveg E., J. Correll C. 2005. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease* 89: 784-796.
- Pérez-Gutiérrez, R. M. and R. Lule-Perez. 2004. *Raphanus sativus* (Radish): Their Chemistry and Biology. *The Scientific World Journal* 4: 811-837.
- Pineda M., R., S. Vizcaíno P., C. M. García P., J. H. Gil G. and D. L. Durango R. 2012. Chemical composition and antifungal activity of *Piper auritum* Kunth and *Piper holtonii* C. DC. against phytopathogenic fungi. *Chilean Journal of Agricultural Research* 72: 507-5015.
- Plascencia-Tenorio, R. I., V. Olalde-Portugal, H. G. Mena-Violante, L. F. Ceja-Torres, J. Venegas-González, G. Oyoque-Salcedo y M. V. Angoa-Pérez. 2012. Antagonismo *in vitro* de aislados bacterianos de fresa comercial y silvestre vs. *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*. *Ra Ximhai* 8: 103-110.
- Potenza M., R., R. Nishimori K., M. Sato E., M. F. Pasouza Filho and L. Benedicto H. 1999a. Evaluation of plant extracto on the control of *Ceratitis capitata* (Wied, 1824) (Diptera: Tephritidae) in laboratory conditions. *Journal Arquivos do Instituto Biológico (Sao Paulo)* 66: 123-131.
- Potenza M., R., A. Takematsu P., A. Sivieri P., M. Sato E. and C. Passerotti M. 1999b. Acaricide effect of some plant extracts on *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) in the laboratory. *Journal Arquivos do Instituto Biológico (Sao Paulo)* 66: 31-37.

- Potenza M., R., V. Arthur, J. F. Felicio D., M. Rossi H. and M. Sakita N. 2003a. Evaluation of irradiated vegetable extracts (60 Co) of *Allamanda cathartica* (L.) and *Dieffenbachia brasilensis* (Veiech) to control of *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). Journal Arquivos do Instituto Biológico (Sao Paulo) 70 (3): 3-8.
- Potenza M., R., A. Takematsu P., T. Jocys, J. F. Felicio D., M. Rossi H. and M. Sakita N. 2003b. Acaricide evaluation of extracts for the control of coffe red mite *Oligonychus ilicis* (McGregor) (Acari: Tetranychidae). Journal Arquivos do Instituto Biológico (Sao Paulo) 70 (3): 9-16.
- Prusky, D., Y. Fuschs, I. Kobiler, I. Roth, A. Weksler, Y. Shalom, E. Fallik, G. Zauberman, E. Pesis, M. Akerman, O. Ykutiely, A. Weisblum, R. Regev, and L. Artes. 1999. Effect of hot water brushing, Prochloraz treatment and waxing on the incidence of black spot decay caused by *Alternaria alternata* mangoes fruits. Postharvest Biology and Technology 15: 165-174.
- Ringuelet, J. 2013. Terpenoides. *In: Productos Naturales Vegetales*. Ringuelet, J. y S. Viña. (eds.). Editorial de la Universidad de La Plata. La Plata, Buenos Aires, Argentina. pp. 151-190.
- Ringuelet, J. y S. Viña. 2013. Introducción a los productos naturales vegetales. *In: Productos Naturales Vegetales*. Ringuelet, J. y S. Viña. (eds.). Editorial de la Universidad de La Plata. La Plata, Buenos Aires, Argentina. pp. 4-17.
- Regnault-Roger, C. 2004. ¿Nuevos fitoinsecticidas para el tercer milenio? *In: Biopesticidas de Origen Vegetal*. Regnault-Roger, C., B. J. Philogene R., C. Vincent. (eds.). Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 19-40.

- Reuveni, R. and M. Reuveni. 1998. Foliar-Fertilizer therapy – a concept in integrated pest management. *Crop Protection* 17: 111-118.
- Reuveni, R., G. Dor, M. Raviv, M. Reuveni and S. Tuzun. 2000. Systemic resistance against *Shaerotheca fuliginea* in cucumber plants exposed to phosphate in hydroponics system, and its control by foliar spray of mono-potassium phosphate. *Crop Protection* 19: 355-361.
- Rodríguez-López, E. S., J. M. González-Prieto y N. Mayek-Pérez. 2008. La infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en Aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos Bioquímicos y Genéticos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 53: 11
- Rosslénbroich, H. J. and D. Stuebler. 2000. *Botrytis cinerea* - History of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection* 19: 557-561.
- Rui, S. J., F. Da Costa M., R. E. Marinho M., G. S. Nunes S., J. Filho A. e V. Miranda S. 2004. Utilizacao de Azoxistrobina no controle da Antracnose da Mangueira. *Fitopatologia Brasileira* 29: 193-196.
- Saldarriaga-Cardona, A. J., R. Castaño-Zapata y R. Arango-Isaza. 2008. Caracterización del agente causante de la antracnosis en tomate de árbol, manzano y mora. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias* 32: 145-156.
- Sánchez, Y., O. Pino, T. Correa M., E. Naranjo y A. Iglesia. 2009. Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* Kunt (Caisimón de Anís). *Revista Protección Vegetal* 24: 39-46.

- Sánchez, Y., O. Pino, J. Lazo F., Y. Abreu, E. Naranjo y A. Iglesia. 2011. Actividad promisorio de aceites esenciales de especies pertenecientes a la tribu Piperaceae frente a *Artemia salina* y *Xanthomonas albilineans*. Revista Protección Vegetal 26: 45-51.
- Santhi, R., G. Lakshami, A. Priyadarshini M. and L. Anandraj. 2011. Phytochemical screening of *Nerium oleander* leaves and *Momordica charantia* leaves. International Research Journal of Pharmacy 2: 131-135.
- Scorzoni, L., F. Sangalli-Leite, J. de Lacorte Singulani, A. C. Alves de Paula e Silva, C. B. Costa-Orlandi, A. M. Fusco-Almeida and M. J. S. Mendes-Giannini. 2016. Searching new antifungals: The use of *in vitro* and *in vivo* methods for evaluation of natural compounds. Journal of Microbiological Methods 123: 68–78.
- Scott, I. A., H. Jensen R., B. J. Philogene R. and J. Arnason T. 2008. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. Phytochemistry Reviews 7: 65-75.
- Shaath, N., F. Flores B. and M. Osman A. 1995. The essential oil of *Allium sativum* L., Liliaceae (garlic). Developments in Food Science 37: 2025-2037.
- Shapiro, T., J. Fahey, K. Wade, K. Stephenson and P. Talalay. 2005. Bulletin of chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts. Department of Pharmacology and Molecular Sciences, The Johns Hopkins University, School of Medicine, Baltimore, Maryland, U.S.A. pp. 27.

- Shofner, J. D and A. Kimball B. 2011. Plant-induced dermatitis. *In: Wilderness Medicine*. Auerbach P. S. (ed). 6th ed. Philadelphia, Mosby Elsevier. pp. 63-65.
- Siddiqui, B. S., N. Khatoon, S. Begum, A. Farooq D., K. Qamar, H. Bhatti A. and S. Ali K. 2012. Flavonoid and cardenolide glycosides and a pentacyclic triterpene from the leaves of *Nerium oleander* and evaluation of cytotoxicity. *Phytochemistry* 77: 238-244.
- Silva, M., M. Gracas, P. Estevao, M. Losada, J. Aparecida de Souza, N. Pereira e I. de Oliveira. 2001. Efeito fungitóxico dos extractos de *Caryocar brasiliense* Camb. sobre os fungos *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum trumcatum* e *Fusarium oxysporum*. *Ciências Agrotecnicas Lavras*. 1: 1410-1419.
- Singh, G., S. Gupta and N. Sharma. 2014. *In vitro* screening of selected plant extracts against *Alternaria alternata*. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* 2: 344-351.
- Singh, P. and J. Singh. 2013. Medicinal and therapeutic utilities of *Rhaphanus sativus*. *International Journal of Plant, Animal and Enviromental Science* 3: 103-105.
- Sitterly, W. R. and A. Keinath P. 1996. Anthracnose *In: Compendium of Cucurbit Diseases*. Zitter, T. A., D. Hopkins L. and C. Thomas E. (eds.). APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. pp. 24-25.
- Smekalova, T. N. 2008. Major crops and crop wild relatives of Russia. *Crop Wild Relative* 6: 18-19.

- Snowdon, A. L. 1990. A color Atlas of postharvest diseases and disorders of fruit and vegetables. Vol. 1: General introduction and fruit. University of Cambridge. England: Wolfe Scientific. 302 p.
- Spadaro, D. and M. Gullino L. 2004. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit disease. *International Journal of Food Microbiology* 91: 185-194.
- Stevens, C. V., A. Khan, J. Lu Y., C. Wilson L., P. Pusey L., E. C. Igwegbe K., K. Kabwe, Y. Mafolo, J. Liu , E. Chalutz and S. Droby. 1997. Integration of ultraviolet light with yeast treatment for control of postharvest storage rot of fruits and vegetables. *Biological Control* 10: 98-103.
- Sundravadana, S., D. Alice, S. Kuttalam and R. Samiyappan. 2007. Efficacy of azoxystrobin on *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. growth and on controlling mango anthracnose. *Journal of Agricultural and Biological Science* 2: 10-15.
- Talhinhas, P., S. Sreenivasaprasad, J. Neves and H. Oliveira. 2005. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 2987-2998.
- Tavares, G. M. and P. Souza E. 2005. Effects of fungicides on the *in vitro* control of *Colletotrichum gloeosporioides*, the anthracnosis etiologic agent of the papaya tree (*Carica papaya* L.). *Ciência e Agrotecnologia* 29: 52-59.
- Töfoli, J. G., J. Ferrari T., R. Domingues J. e E. M. Nogueira C. 2011. *Botrytis* sp. Em espécies hortícolas: hospedeiros, sintomas e manejo. *Biológico, Divulgação Técnica, São Paulo* 73: 11-20.

- Tohamy M., R. A., A. Aly Z., T. Abd El-Moity H. and L. Abd-El-Moneim. 2002. Evaluation of some plant extracts in controlling damping-off and mildew diseases of cucumber. *Egyptian Journal of Phytopathology* 2: 71-80.
- Uludag, A., I. Uremis, M. Arslan and D. Gozcu. 2006. Allelopathy studies in weed science in Turkey-a review. *Journal of Plant Diseases and Protection* 20: 419-426.
- Ullio, L. and E. Macarthur. 2004. Strawberry disease control guide. *Journal NSW Agriculture* 3: 236-244.
- Veronez, B., M. Sato E. and R. Nicastro L. 2012. Toxicity of synthetic and natural compounds on *Tetranychus urticae* o predator *Phytoseiulus macropilis*. *Journal Pesquisa Agropecuária Brasileira* 47: 511-518.
- Viladomat, F. and J. Bastida. 2015. General overview of plant secondary metabolism. *In: Plant Biology and Biotechnology. Volume I: Plant Diversity, Organization, Function and Improvement.* Bahadur, B., M. Venkat Rajam, L. Sahijram, K. V. Krishnamurthy (eds.). Springer, New Delhi, India. pp. 539-568.
- Waller, J. M. 2004. *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. *In: Colletotrichum: Biology, Pathology and Control.* Bailey, J. A. and M. Jeger J. (eds.). CAB International, Oxon, UK. pp. 167-185.
- Wharton, P. S. and J. Diéguez-Uribeondo. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anuales del Jardín Botánico de Madrid* 61: 3-22.
- Wilson, C. L., J. Solar M., A. El Ghaouth and M. Wisniewski E. 1997. Rapid Evaluation of plant extract and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 81: 204-210.

- Wu, S. and J. Chappell. 2008. Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future. *Current Opinion in Biotechnology* 19: 145-152.
- Wurms, K., C. Labbe, N. Benhamou and R. Belanger R. 1999. Effects of milsana and benzothiadiazole on the ultrastructure of powdery mildew haustoria on cucumber. *Phytopathology* 89: 728–736.
- Xiao, C. L., S. MacKenzie J. and D. Legard E. 2004. Genetic and pathogenic analyses of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from strawberry and noncultivated host. *Phytopathology* 94: 446-453.
- Xuan, T. D., T. Eiji, T. Hiroyuki, M. Mitsuhiro, T. Khanh D. and I. Chung M. 2004. Evaluation on phytotoxicity of neem (*Azadirachta indica*. A. Juss) to crops and weeds. *Crop Protection* 23: 335-345.
- Yourman, L., S. Jeffers N. and R. Dean A. 2000. Genetic Analysis of Isolates of *Botrytis cinerea* Sensitive and Resistant to Benzimidazole and Dicarboximide Fungicides. *Phytopathology* 90: 851-859.
- Zavala-León, M. J., J. M. Tun-Suárez, J. Cristóbal-Alejo, E. Ruiz-Sánchez, O. Gutiérrez-Alonso, M. Vázquez-Calderón y M. Méndez-González. 2005. Control poscosecha de la antracnosis en papaya y sensibilidad de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. a fungicidas organosintéticos. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 11: 251-255.
- Zavala-León, M. J. y J. Alejo C. 2012. Escala logarítmica diagramática de severidad de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en papaya (*Carica papaya*). *Fitosanidad* 16: 83-86.

- Zhanga, Z. Y., G. Daia H., Y. Zhugea Y. and Y. Lib B. 2008. Protective effect of *Robinia pseudoacacia* Linn1 extracts against cucumber powdery mildew fungus, *Sphaerotheca fuliginea*. *Crop Protection* 27: 920–925.
- Zhang, J. and L. Timmer W. 2007. Preharvest application of fungicides for postharvest disease control on early season tangerine hybrids in Florida. *Crop Protection* 26: 886-893.
- Zhao, M., L. Bai, L. Wang, A. Toki, T. Hasegawa, M. Kikuchi, M. Abe, J. Sakai, R. Hasegawa, Y. Bai, T. Mitsui, H. Ogura, T. Kataoka, S. Oka, H. Tsushima, M. Kiuchi, K. Hirose, A. Tomida, T. Tsuruo and M. Ando. 2007. Bioactive cardenolides from the stems and twigs of *Nerium oleander*. *Journal of Natural Products* 70: 1098-1103.

CAPÍTULO II

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE EXTRACTOS DE LAS ESPECIES *Piper auritum*, *Tulbaghia violacea* Y *Capsicum chinense* SOBRE *Colletotrichum gloeosporioides* Y *Botrytis cinerea*

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó el efecto inhibitorio del crecimiento de micelio *in vitro* de dos cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* (CG y CR) y una cepa de *Botrytis cinerea* por extractos metanólicos crudos de *Piper auritum*, *Tulbaghia violacea* y *Capsicum chinense* y del extracto de diclorometano crudo de *Capsicum chinense*. Seis concentraciones (50 a 100 %) de cada extracto se prepararon mediante extracción en Soxhlet. Los bioensayos de la actividad antifúngica se realizaron de acuerdo con la metodología de difusión de disco. Las variables que se evaluaron fueron: porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (porcentaje de ICM) y Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀). Análisis de varianza y prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) fueron los procedimientos estadísticos empleados para ICM. En el bioensayo contra *C. gloeosporioides* el mayor porcentaje de ICM ($P \leq 0.05$) se observó con el extracto metanólico crudo de *T. violacea* en las dos cepas, superando al control positivo (Amistar) en 11.2 % (CI₅₀ 29.2 % CG) y 15.5 % (CI₅₀ 23.2 % CR). Para el caso de *B. cinerea* el extracto de diclorometano crudo de *C. chinense* 60 % y el extracto metanólico de *P. auritum* 100 %, mostraron el mayor porcentaje de inhibición (52.4 y 60.2 %, respectivamente); las CI₅₀ para *C. chinense* y para *P. auritum* fueron: 61.7 y 84.4 %, respectivamente. Por cromatografía en capa fina, se identificaron flavonoides, terpenoides y alcaloides en el extracto metanólico crudo de *P. auritum*; flavonoides y alcaloides para *T. violacea* y *C. chinense*, respectivamente.

Palabras clave: alcaloides, flavonoides, inhibición, micelio, terpenoides

IN VITRO ANTIFUNGAL ACTIVITY OF EXTRACTS OF THE SPECIES *Piper auritum*, *Tulbaghia violacea* AND *Capsicum chinense* ON *Colletotrichum gloeosporioides* AND *Botrytis cinerea*

ABSTRACT

This study evaluated the inhibitory effect on mycelium growth *in vitro* of two strains of *Colletotrichum gloeosporioides* (CG and CR) and one strain of *Botrytis cinerea* by crude methanolic extracts of *Piper auritum*, *Tulbaghia violacea* and *Capsicum chinense* and crude dichloromethane extract of *Capsicum chinense*. Six concentrations (50 to 100 %) of each extract were prepared by Soxhlet extraction. Bioassays of the antifungal activity were performed using the disk diffusion method. The variables evaluated were: percentage of mycelial growth inhibition (percentage MGI) and Mean Inhibitory Concentration (IC₅₀). Analysis of variance and Tukey's test ($P \leq 0.05$) were the statistical procedures used for MGI. In the bioassay against *C. gloeosporioides* the highest percentage MGI ($P \leq 0.05$) was observed with the crude methanolic extract of *T. violacea* in the two strains, outperforming the positive control (Amistar) by 11.2 % (IC₅₀ 29.2 % CG) and 15.5 % (IC₅₀ 23.2 % CR). In the case of *B. cinerea* the 60 % crude dichloromethane extract of *C. chinense* and the 100 % methanolic extract of *P. auritum* 100 % showed the highest inhibition percentage (52.4 and 60.2 %, respectively); the IC₅₀ for *C. chinense* and *P. auritum* were 61.7 and 84.4 %, respectively. Use of thin layer chromatography identified flavonoids, terpenoids, and alkaloids in the crude methanolic extract of *P. auritum*, and flavonoids and alkaloids in *T. violacea* and *C. chinense*, respectively.

Keywords: alkaloids, flavonoids, inhibition, mycelium, terpenoids

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas el uso indiscriminado de fungicidas ha provocado algunos problemas ambientales (Cooke *et al.*, 2003), y de salud pública, además de contribuir al desarrollo de organismos resistentes a fungicidas sintéticos (Anand y Bhaskaran, 2009; Ademe *et al.*, 2013). Una alternativa para el control de hongos fitopatógenos es el uso de extractos vegetales, ya que numerosas plantas contienen metabolitos secundarios con actividad biológica (Pandey *et al.*, 2014). Algunos autores estiman que en la gran diversidad vegetal se pueden encontrar más de 100 000 metabolitos secundarios involucrados en el mecanismo de defensa de las mismas, pero solamente se han identificado fitoquímicamente el 10 % (Sateesh *et al.*, 2004; Mazid, 2011). Algunos de estos metabolitos de origen vegetal (fenoles, flavonoides, quininas, aceites esenciales, alcaloides, saponinas, esteroides, taninos, cumarinas, entre otros) (Tripathi y Shukla *et al.*, 2010) presentan propiedades antimicrobianas; se trata de sustancias bioactivas naturales que podrían usarse para el control de fitopatógenos (Ademe *et al.*, 2013; Sharifi Rad *et al.*, 2013). El uso de extractos vegetales presentan ciertas ventajas en el control de los fitopatógenos con respecto a los fungicidas sintéticos: a) son biodegradables (Brielmann *et al.*, 2006); b) no producen desequilibrios en el ecosistema (Chirinos *et al.*, 2009); c) provocan un impacto mínimo en los organismos (Meepagala *et al.*, 2002; Fokialakis *et al.*, 2006); d) no generan resistencia en patógenos (Chirinos *et al.*, 2009); y e) disminuyen el riesgo residual en los alimentos (Barrera-Necha *et al.*, 2008).

En México se localiza el 10 % de las especies de plantas superiores del mundo y aproximadamente 40 % de ellas son endémicas (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007); no obstante esta gran diversidad, se ha investigado poco a estas especies por su actividad antifúngica; y en particular los hongos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea*, patógenos importantes que atacan un amplio rango de hospederos y que pueden causar pérdidas cuantitativas y/o cualitativas (calidad de la fruta) en etapa de precosecha o poscosecha de frutos como aguacate, papaya, manzana, cítricos, plátano, plantas ornamentales, hortalizas, entre otros (Talhinhas *et al.*, 2005; Juárez-Becerra *et al.*, 2010). Aunque se tienen experiencias sobre la evaluación de extractos vegetales de especies de composición química específica como *Azadirachta indica* (triterpenos), *Jatropha curcas* (terpenos), *Xanthium strumarium* (alcaloides), *Mentha cordifolia* (flavonoides), *Piper sarmentosum* (fenoles), *Phytolacca tetramera* (saponinas triterpenoides), *Phytolacca dodecandra* (saponinas triterpenoides), *Quillaja saponaria* (saponinas triterpenoides), *Allium fistulosum* (compuestos azufrados, flavonoides), *Magnolia liliflora* (fenoles), entre otras, para controlar *C. gloeosporioides* y *B. cinerea*, no se ha logrado que el extracto vegetal supere o iguale el efecto de los productos químicos comerciales formulados con cobre, benzimidazoles, dicarboximidias (Miclea and Puia, 2010; Rahman *et al.*, 2011; Bajpai and Kang, 2012; Bussaman *et al.*, 2012; Saha *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2013; Alves da Silva *et al.*, 2014). Plantas como *Piper auritum* (alcaloides, flavonoides), *Tulbaghia violacea* (compuestos azufrados, flavonoides) y *Capsicum chinense* (alcaloides) contienen metabolitos diferentes a los consignados para las especies anteriores y se reporta actividad biológica de

extractos de estas especies contra bacterias (Sánchez *et al.*, 2009), insectos (Castillo-Sánchez *et al.*, 2012; Delgado-Barreto *et al.*, 2012), ácaros (Antonious, 2006) y hongos (Hernández-Albíter *et al.*, 2007; Ikeura *et al.*, 2011). En relación con el efecto antifúngico en las especies antes referidas se sabe que extractos de *P. auritum* presentan actividad contra *C. gloeosporioides*, pero no se tienen reportes contra *B. cinerea* (Baños-Guevara *et al.*, 2004; Hernández-Albíter *et al.*, 2007; Pineda *et al.*, 2012). En contraste, extractos de *T. violacea* evaluados *in vitro* afectan la actividad de *Phytium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Mycosphaerella pinodes*, *Aspergillus flavus*, *Botryosphaeria dothidea*, *Puccinia triticina* y *B. cinerea*; hasta antes del presente estudio no se había reportado la respuesta del extracto de *T. violacea* contra *C. gloeosporioides* (Lindsey y Van Staden, 2004; Nteso y Pretorius, 2006, Cawood *et al.*, 2010; Belewa *et al.*, 2011). En el caso caso de *C. chinense* se cuenta con antecedentes de su actividad contra *Penicillium expansum* y *B. cinerea*, pero no para *C. gloeosporioides* (Wilson *et al.*, 1997; Ikeura *et al.*, 2011). Además, se destaca que estos efectos biológicos están relacionados con los diferentes disolventes, por lo que es posible encontrar propiedades bioactivas distintas; para ejemplificar la importancia que esto último, Chinn *et al.* (2011) reportan que al probar tres tipos de disolventes la acetona predispone un alto rendimiento de capsaicinoides. Considerando la información antes descrita, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos metanólicos crudos de *P. auritum*, *T. violacea* y *C. chinense* (y también del extracto de diclorometano) contra *C. gloeosporioides* y *B. cinerea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especies vegetales. Las muestras vegetales (hojas, tallos, raíces y frutos) de las especies *Piper auritum* Kunth, *Tulbaghia violacea* Harv. y *Capsicum chinense* Jacq., se recolectaron de manera aleatoria, tanto para su identificación taxonómica como para la preparación de extractos. En todos los casos el material biológico obtenido estuvo libre de plagas, enfermedades y sin daños físicos (Cuadro 1). *Piper auritum* (hoja santa) y *T. violacea* (ajillo) se recolectaron en el mes de septiembre de 2014, ambas en etapa de floración, la primera bajo el dosel de árboles y la segunda de campo abierto, sobre esta última se desconoce el manejo al que se sometieron. Los frutos de *C. chinense* se recolectaron en el mes de agosto de 2014, en una parcela cultivada con chile habanero (tampoco se tuvo referencia del manejo técnico). Las muestras se trasladaron en hielera al laboratorio de Fitoquímica de Preparatoria Agrícola para su secado, molienda y preparación de extractos. Para la certificación taxonómica de las muestras biológicas se prepararon dos ejemplares de herbario por especie, los cuales se depositaron en el Herbario-Hortorio “Jorge Espinoza Salas” de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características geográficas de los sitios de colecta, tipo de tejido y número de registro de las tres especies de estudio.

| Especie | Familia | Lugar de recolecta | Ubicación | Tejido | Número de registro* |
|--------------------|-----------------------|------------------------------|-------------------------|----------------|---------------------|
| <i>P. auritum</i> | <i>Piperaceae</i> | Hueyapan de Ocampo, Veracruz | 18° 09' LN y 95° 09' LO | Hoja | 313014 |
| <i>T. violacea</i> | <i>Amaryllidaceae</i> | Cuautla, Morelos | 18° 49' LN y 99° 01' LO | Toda la planta | 313012 |
| <i>C. chinense</i> | <i>Solanaceae</i> | Mixquiahuala, Hidalgo | 20° 13' LN y 99° 12' LO | Fruto | 313016 |

*Herbario-Hortorio "Jorge Espinoza Salas" de Preparatoria Agrícola de la UACH.

Preparación del extracto crudo. El material vegetal de cada especie se secó separadamente en una estufa (Fanem LTDA) a temperatura constante ($50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 48 h, y después se molió en un molino Thomas-Wiley Mill (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, EE.UU.). Los extractos metanólicos (Reactivo Baker[®] ACS) de *P. auritum*, *T. violacea* y *C. chinense* y el de diclorometano (Reactivo Baker[®] ACS) de *C. chinense* se obtuvieron mediante un equipo Soxhlet (NOVATECH) durante 48 h. Posteriormente, los extractos se concentraron a presión reducida en un rotaevaporador (Büchi[®] R-210) (García-Mateos *et al.*, 2007). Diferentes concentraciones de los extractos se prepararon (50, 60, 70, 80, 90 y 100 % v/v) para las pruebas de actividad antifúngica.

Análisis fitoquímico. Por cromatografía en capa fina (CCF) de gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck) se detectó cualitativamente la presencia de alcaloides, flavonoides, terpenoides y glucosinolatos en los extractos metanólicos crudos de cada especie. Para la identificación de alcaloides se usó como eluyente metanol:diclorometano (8:2 % v/v) y el agente cromogénico fue el reactivo Dragendorff, la presencia de manchas color marrón en la cromatoplaaca indicaron la presencia de alcaloides. Para la identificación de flavonoides se empleó como eluyente una mezcla de butanol: ácido acético: agua (BAW) en proporción

40:10:50 % (v/v), los agentes cromogénicos fueron 2-aminoetil difenilborinato (NP) y polietilenglicol 4000 (PEG); los componentes se visualizaron mediante UV (Cole-Parmer) a una longitud de onda de 365 nm para observar la fluorescencia de color anaranjado esperada para flavonoides (Wagner y Bladt, 1996). Para la identificación de terpenoides se utilizó como eluyente una mezcla de tolueno:acetato de etilo (85:15 % v/v), el agente cromogénico empleado fue vainillina al 1 % en etanol y ácido sulfúrico al 10 % en etanol, la presencia de manchas en la placa de color violeta indicó prueba positiva para terpenoides (Wagner y Bladt, 1996). Para la identificación de glucosinolatos se utilizó como eluyente una mezcla de n-butanol:n-propanol:ácido acético:agua (3:1:1:1 % v/v), la placa se asperjó con ácido tricloroacético al 25 % (v/v) en cloroformo y se colocó en la estufa a 110 °C por 10 min. Posteriormente, la placa se asperjó con una mezcla de hexacianoferrato (III) de potasio al 1 % (p/v) y cloruro de hierro (III) al 5 % (p/v) en una proporción de 1:1, la presencia de manchas color azul en la cromatoplaça indicó prueba positiva (Wagner y Bladt, 1996).

Aislamiento e Identificación de *C. gloeosporioides* y *B. cinerea*. Los hongos *C. gloeosporioides* y *B. cinerea* se aislaron de frutos de papaya y de fresa en etapa de madurez de consumo con síntomas de antracnosis y moho gris, respectivamente; éstos fueron adquiridos en el mercado local San Antonio en Texcoco de Mora. Se tomaron fragmentos del tejido enfermo de un tamaño aproximado de 5 x 5 mm, involucrando tejido infectado (20 %) y tejido sano (80 %). Los trozos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2 % v/v durante 1.5 min, se enjuagaron en agua destilada y esterilizada el enjuague se realizó tres veces, finalmente se secaron sobre toallas absorbentes esterilizadas. Cinco

trozos de fruto de papaya y de fresa se colocaron por separado en cada caja Petri con el medio de cultivo papa dextrosa-agar (PDA), las cajas se sellaron con parafilm y se incubaron a temperatura ambiente (24 ± 2 °C) durante siete días. Una vez que el crecimiento del hongo cubrió la caja Petri y produjo esporas, se realizaron preparaciones temporales con lactofenol azul, posteriormente se observaron con un microscopio compuesto (Olympus CX31) para la identificación de los hongos *Colletotrichum* y *Botrytis* utilizando las claves de Barnett y Hunter (1998). La identificación de la especie de *Colletotrichum* se basó en las referencias de Sutton (1992) y de *Botrytis* en las referencias de Ellis (2004).

Los cultivos monospóricos se obtuvieron de acuerdo con el método descrito por Casarrubias-Carrillo *et al.* (2002). A un cultivo puro y esporulado se le agregaron 10 mL de agua destilada estéril y una gota de Tween 20. La solución resultante con conidios (solución madre) se determinó la concentración de conidios por mililitro con un hematocitómetro (marca BOECO). Por dilución seriada de la solución madre se prepararon 10 tubos, de la solución madre se tomó 1 mL y se le adicionaron 9 mL de agua destilada estéril, se repitió el procedimiento hasta tener 10 diluciones. Una gota de las dos últimas diluciones se depositaron en cajas Petri con medio PDA, distribuyéndolas uniformemente por toda la superficie con un triángulo de vidrio esterilizado, las cajas se incubaron a temperatura ambiente (24 ± 2 °C) por 24 h. Transcurrido el tiempo se observaron los crecimientos originados (conidios germinados) de las diluciones sobre el medio de cultivo, y los crecimientos separados del hongo se sembraron nuevamente en el centro de cajas Petri con PDA. A partir de los cultivos monospóricos se

obtuvieron dos aislamientos de *C. gloeosporioides*: cepa gris (CG) y cepa rosa (CR), y un aislamiento de *B. cinerea*.

Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro*. Los bioensayos se realizaron de acuerdo con la metodología reportada por Chaurasia *et al.* (2005). En el centro de una caja Petri se colocó un disco con crecimiento micelial del hongo ($\varnothing = 7$ mm), posteriormente se colocaron cuatro discos de papel Whatman No. 1 ($\varnothing = 6$ mm) a una distancia de 1.5 cm del disco central, saturados cada uno con una de las concentraciones del extracto; el mismo procedimiento se repitió para las seis concentraciones evaluadas (50, 60, 70, 80, 90 y 100 %) por cada extracto (tratamiento), así como para el testigo negativo y control positivo. Como testigo negativo se utilizó el disolvente con el que se obtuvo cada extracto y como control positivo se aplicaron los fungicidas Azoxistrobin (Amistar® de Syngenta Agro, caducidad 2017) para *C. gloeosporioides* y Fenhexamid (Elevat® de Arysta LifeScience, caducidad 2017) para *B. cinerea*, ambos se prepararon a la concentración comercial de 500 ppm.

Un diseño experimental completamente al azar con doce repeticiones se utilizó por cada tratamiento. En cada caja Petri se colocaron cuatro discos de una misma concentración, teniendo al final tres cajas Petri para cada tratamiento. Las cajas Petri se incubaron a una temperatura de 24 ± 2 °C, y las observaciones se registraron a los cuatro días para *B. cinerea* y a los siete días para las cepas CG y CR de *C. gloeosporioides*. Las variables que se evaluaron fueron: la concentración inhibitoria media (CI₅₀) y el porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio (porcentaje de ICM), el cual incluyó el diámetro del disco de papel (Rodríguez *et al.*, 2000; Chaurasia *et al.*, 2005; Ibarra *et al.*, 2009).

La concentración inhibitoria media (CI_{50}) se estableció en porcentaje y se calculó mediante el Análisis Probit (Finney, 1971) y el porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio (porcentaje de ICM), mediante la fórmula: Porcentaje de ICM = $(R1-R2/R1) \times 100$ según Chaurasia *et al.* (2005); donde: R1 = crecimiento del micelio en el testigo y R2= crecimiento del micelio del tratamiento.

Análisis estadístico. Para los datos de porcentaje de ICM un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias (Tukey, $p \leq 0.05$) se efectuó mediante el programa Statistical Analysis System (SAS). Para realizar el análisis de varianza de los datos obtenidos en porcentajes, éstos se transformaron con el objetivo de manejarlos bajo una distribución normal. La transformación de Yates se realizó en Excel con la siguiente ecuación: $XT = \sqrt{\text{Arcoseno}(x/100)}$; en donde: XT= Transformación de la variable, X= Variable respuesta expresada en %.

RESULTADOS

Los resultados del análisis de varianza mostraron diferencias significativas en el efecto de inhibición causado por los tratamientos (de variaciones individuales y de interacción) en el porcentaje de ICM de las cepas CG y CR de *C. gloeosporioides* y en *B. cinerea* (Cuadro 2). Los coeficientes de variación fueron bajos (6 a 12).

Cuadro 2. Cuadrados medios del análisis de varianza de la inhibición de dos cepas del hongo *C. gloeosporioides* y *B. cinerea* por los extractos crudos metanólicos de *P. auritum*, *T. violacea* y *C. chinense* y del extracto crudo de diclorometano de *C. chinense*.

| F.V. | Cuadrados Medios | | | |
|------------------------|------------------|------------|------------|------------|
| | GL | CG | CR | BC |
| Extracto | 4 | 24295.54** | 23592.71** | 56001.07** |
| Concentración | 5 | 1221.85** | 425.21** | 8043.68** |
| Extracto*Concentración | 20 | 261.99** | 75.68** | 2848.89** |
| Error | 330 | 19.70 | 12.40 | 41.07 |
| Total | 359 | | | |
| C.V. | | 8.27 | 6.51 | 12.43 |

F.V.: Fuente de variación; GL: Grados de libertad; CG: Cepa gris/*Colletotrichum*; CR: Cepa rosa/*Colletotrichum*; BC: *Botrytis cinerea* CV: Coeficiente de Variación; ** significativo ($P \leq 0.05$); NS: No significativo.

Actividad antifúngica de los extractos contra *C. gloeosporioides*. En la cepa gris, la mayor ICM (77.2 %) se observó al aplicar el extracto metanólico crudo de *T. violacea*, superando estadísticamente al control positivo (Amistar) con una diferencia de 11.2 % entre ellos (Figura 1). En contraste, los menores porcentajes de ICM se presentaron con los extractos metanólicos crudos de *C. chinense* y *P. auritum* (38.6 % y 37.8 %, respectivamente) con respecto a Amistar (69.4 %); el extracto de diclorometano crudo de *C. chinense* presentó un porcentaje de ICM del 45.3 %, lo que representa el 34.7 % de menor actividad que el producto comercial.

Con respecto a la cepa rosa, se observó mayor sensibilidad con el extracto de *T. violacea* (78.7 %) en comparación en el control positivo (68.1 %); es decir, el extracto metanólico crudo de *T. violacea*, superó estadísticamente al producto comercial Amistar con una diferencia entre ellos de 15.5 %. Los extractos de diclorometano crudo de *C. chinense* y metanólicos crudos de *C. chinense* y *P. auritum*, presentaron menor efecto con respecto al control positivo (36.3 %, 39.7 % y 42.4 %, respectivamente).

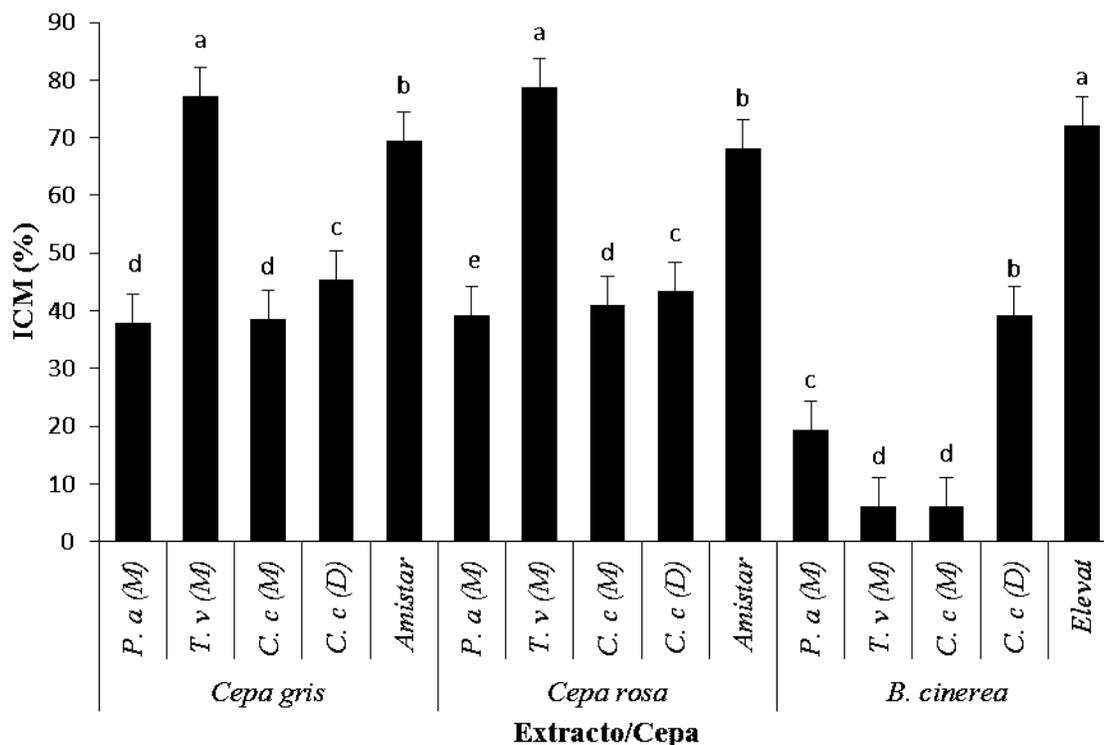


Figura 1. Efecto de tres extractos metanólicos crudos de *P. auritum* (*P.a (M)*), *T. violacea* (*T. v (M)*), *C. chinense* (*C. c (M)*) y un extracto de diclorometano crudo de *C. chinense* (*C. c (D)*), en el porcentaje de inhibición micelial de dos cepas de *C. gloeosporioides* (gris y rosa) y *B. cinerea*. Medias con la misma letra dentro de las cepas son estadísticamente iguales con base en la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

En cuanto al efecto de concentraciones contra *C. gloeosporioides* (Cuadro 3) se observó que todas las concentraciones del extracto metanólico crudo de *T. violacea* ocasionaron mayor inhibición del micelio de la cepa rosa (72.5 a 90 %) y las concentraciones de 50 a 100 % inhibieron significativamente ($P \leq 0.05$) el crecimiento micelial de la cepa gris (70.5 a 90 %) con respecto al fungicida Amistar. El mayor efecto de inhibición en ambas cepas (90 %) se observó a la concentración más alta (100 %) superando en 29.6 % (CG) y 32.1 % (CR), el efecto del producto comercial (Cuadro 3). El extracto metanólico crudo de *P.*

auritum en las diferentes concentraciones aplicadas a las cepas CG (24.4 a 46.8 %) y CR (37.3 a 44.4 %), no superaron el efecto inhibitorio del fungicida Amistar (69.4 y 68.1 %, respectivamente). El extracto en la concentración de 100 %, causó inhibición del crecimiento micelial del 46.8 y 44.4 % para la CG y CR, respectivamente (Cuadro 3). Comparando a los extractos metanólico y de diclorometano crudo de *C. chinense* de ambas cepas, no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) en el porcentaje de ICM, siempre menores (38.6 y 41 %, respectivamente) con respecto al control positivo (69.4 y 68.1 %, respectivamente) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de los extractos metanólicos crudos de *P. auritum*, *T. violacea* y *C. chinense* y del extracto de diclorometano crudo de *C. chinense* a seis concentraciones, en el porcentaje de inhibición en *C. gloeosporioides* y *B. cinerea*.

| Trat | Extractos | Conc | Inhibición (%) | | |
|----------------------|---------------------------------|------|----------------------|-----------|---------|
| | | | CG | CR | BC |
| 1 | <i>P. auritum</i> | 100 | 46.81 b ^t | 44.45 b | 60.20 b |
| 2 | <i>P. auritum</i> | 90 | 38.70 c | 38.15 c | 56.07 b |
| 3 | <i>P. auritum</i> | 80 | 39.39 c | 37.73 c | 0.0 c |
| 4 | <i>P. auritum</i> | 70 | 38.86 c | 38.51 c | 0.0 c |
| 5 | <i>P. auritum</i> | 60 | 38.99 c | 38.75 c | 0.0 c |
| 6 | <i>P. auritum</i> | 50 | 24.40 d | 37.37 c | 0.0 c |
| Control (+) | Amistar/Elevat | 0.05 | 69.41 a | 68.10 a | 72.17 a |
| CI ₅₀ (%) | | | - | - | 84.42 |
| DMSH | | | 7.28 | 5.17 | 4.93 |
| 7 | <i>T. violacea</i> | 100 | 90.00 a | 90.00 a | 26.45 b |
| 8 | <i>T. violacea</i> | 90 | 77.07 b | 78.52 b | 0.0 c |
| 9 | <i>T. violacea</i> | 80 | 76.45 b | 78.38 b | 9.85 c |
| 10 | <i>T. violacea</i> | 70 | 75.45 cb | 77.37 b | 0.0 c |
| 11 | <i>T. violacea</i> | 60 | 73.84 cbd | 75.59 cd | 0.0 c |
| 12 | <i>T. violacea</i> | 50 | 70.59 cd | 75.44 cb | 0.0 c |
| Control (+) | Amistar/Elevat | 0.05 | 69.41 d | 68.10 d | 72.17 a |
| CI ₅₀ (%) | | | 29.37 | 23.27 | - |
| DMSH | | | 5.24 | 4.77 | 12.48 |
| 13 | <i>C. chinense</i> (Metanol) | 100 | 44.92 b | 47.48 b | 36.48 b |
| 14 | <i>C. chinense</i> (Metanol) | 90 | 43.50 b | 43.68 cb | 0.0 c |
| 15 | <i>C. chinense</i> (Metanol) | 80 | 41.39 b | 41.40 cd | 0.0 c |
| 16 | <i>C. chinense</i> (Metanol) | 70 | 39.78 b | 39.30 cd | 0.0 c |
| 17 | <i>C. chinense</i> (Metanol) | 60 | 42.44 b | 37.37 d | 0.0 c |
| 18 | <i>C. chinense</i> (Metanol) | 50 | 19.62 c | 37.01 d | 0.0 c |
| Control (+) | Amistar/Elevat | 0.05 | 69.41 a | 68.10 a | 72.17 a |
| CI ₅₀ (%) | | | - | - | - |
| DMSH | | | 6.124 | 4.595 | 3.32 |
| 19 | <i>C. chinense</i> (Dicl) | 100 | 47.01 b | 45.18 b | 49.96 b |
| 20 | <i>C. chinense</i> (Dicl) | 90 | 45.96 cb | 44.06 cbd | 46.28 b |
| 21 | <i>C. chinense</i> (Dicl) | 80 | 46.32 cb | 44.44 cb | 45.20 b |
| 22 | <i>C. chinense</i> (Dicl) | 70 | 44.55 cb | 42.56 cbd | 45.10 b |
| 23 | <i>C. chinense</i> (Dicl) | 60 | 43.68 c | 41.62 d | 52.49 b |
| 24 | <i>C. chinense</i> (Dicl) | 50 | 44.38 c | 42.37 cd | 0.0 c |
| Control (+) | Amistar/Elevat | 0.05 | 69.41 a | 68.10 a | 72.17 a |
| CI ₅₀ (%) | | | - | - | 61.79 |
| DMSH | | | 2.67 | 2.74 | 8.62 |

^tMedias con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales con base en la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) CG: Ceba gris; CR: Ceba rosa; BC: *Botrytis cinerea*. DMSH: diferencia mínima significativa honesta.

En las Figuras 2 A y B se destaca la actividad antifúngica de extractos y concentraciones en las dos cepas de *C. gloeosporioides*. El extracto metanólico crudo de *T. violacea*, en ambas cepas de *C. gloeosporioides*, superó el efecto de inhibición del crecimiento micelial ocasionado por los demás extractos y sus concentraciones y por el control positivo.

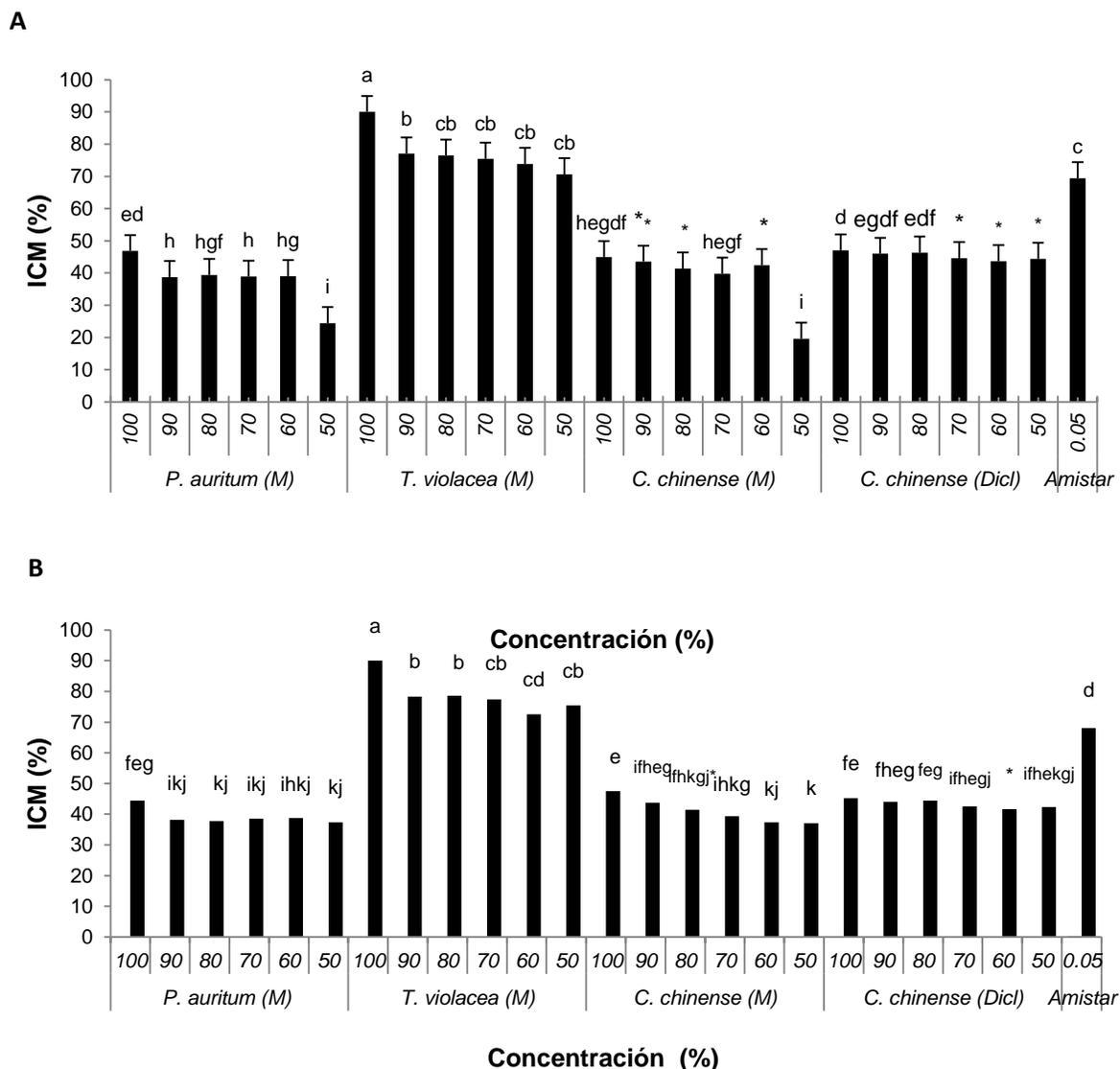


Figura 2. Efecto de los extractos metanólicos crudos de *P. auritum*, *T. violacea* y *C. chinense* y del extracto de diclorometano crudo de *C. chinense* a seis concentraciones, en el porcentaje de inhibición de A) *C. gloeosporioides* (Cepa Gris); B) *C. gloeosporioides* (Cepa Rosa). Medias con la misma letra son estadísticamente iguales con base en la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀). Los resultados sobre la concentración inhibitoria (CI₅₀) determinada mediante análisis Probit, indicaron que la CI₅₀ del extracto metanólico crudo de *T. violacea* para las CG y CR fueron: 29.3 y 23.2 %, respectivamente (Cuadro 3), datos que coinciden con el porcentaje de ICM (90 %, en ambas cepas), del extracto metanólico crudo de *T. violacea*; es decir, con este extracto se logró el mayor efecto para inhibir el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* que los extractos restantes en las concentraciones evaluadas.

Actividad antifúngica de los extractos contra *Botrytis cinerea*. Los extractos metanólicos crudos de *P. auritum*, *C. chinense* y *T. violacea* presentaron menores efectos de inhibición del crecimiento micelial en *B. cinerea* (19.3, 6.0 y 6.0 %, respectivamente) con respecto al control positivo Elevat (72.0 %) (Figura 1 y Cuadro 3). El extracto de diclorometano de *C. chinense* produjo más efecto de inhibición (39.1 %) que los extractos metanólicos (6, 6 y 19.3 % para *C. chinense*, *T. violacea* y *P. auritum*, respectivamente), pero no superó al control positivo Elevat; con este extracto de chile habanero hubo mayor efecto de inhibición del crecimiento micelial desde la concentración de 60 % (Cuadro 3).

En la Figura 3, se aprecia que con el extracto metanólico al 90 y 100 % de *P. auritum* se tuvo un efecto de inhibición de 56 y 60.2 %, respectivamente; con el extracto de diclorometano de *C. chinense* en concentraciones de 60, 70 y 90 % se presentó el mayor efecto de inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* (52.4, 45.1 y 49.2 %, respectivamente), en comparación con los extractos metanólicos crudos de *C. chinense* y *T. violacea*. En resumen, los tratamientos extracto metanólico de *P. auritum* (90 y 100 %) y extracto diclorometano (60 %)

de *C. chinense* influyeron más (52 al 60 %), en la inhibición del micelio de *B. cinerea*.

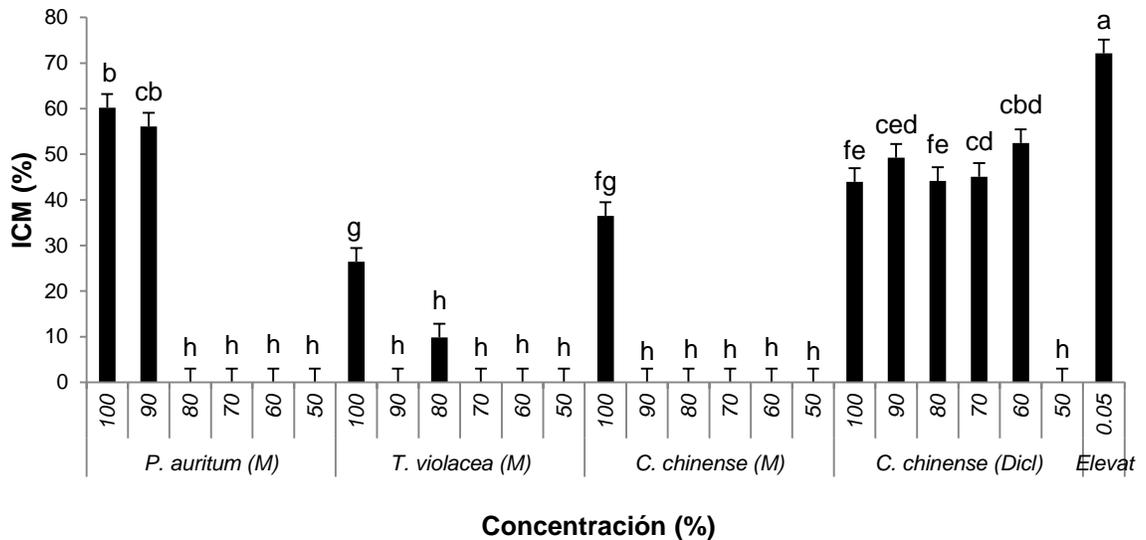


Figura 3. Efecto de los extractos metanólicos crudos de *P. auritum*, *T. violacea* y *C. chinense* y del extracto de diclorometano crudo de *C. chinense* a seis concentraciones, en el porcentaje de inhibición de *B. cinerea*. Medias con la misma letra dentro de las cepas son estadísticamente iguales con base en la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀). En relación con *B. cinerea*, la CI₅₀ del extracto de diclorometano crudo de *C. chinense* fue 61.7 %, mientras que la CI₅₀ del extracto metanólico crudo de *P. auritum* fue 84.4 % (Cuadro 3).

Análisis fitoquímico

Los rendimientos de los extractos metanólicos crudos de *P. auritum*, *T. violacea* y *C. chinense* fueron 18, 26, 12 100 g⁻¹ peso seco, respectivamente y de 10 g 100 g⁻¹ para extracto diclorometano de *C. chinense*. Por cromatografía en capa fina se identificaron alcaloides, flavonoides y terpenos en el extracto metanólico crudo de *P. auritum*; presencia de flavonoides en *T. violacea* y en los extractos metanólico y diclorometano de *C. chinense* se encontraron alcaloides (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis fitoquímico de los extractos metanólicos crudos de *P. auritum*, *T. violacea* y *C. chinense* y del extracto de diclorometano crudo de *C. chinense*.

| Especie | Familia | Tipo de metabolito | | | | Referencias |
|---------------------------------------|-----------------------|--------------------|-----|-----|------|--|
| | | Al | Fla | Ter | Gluc | |
| <i>P. auritum</i> | <i>Piperaceae</i> | + | + | + | - | Flavonoides, y alcaloides (Castañeda <i>et al.</i> , 2007; Olivero-Verbel <i>et al.</i> , 2009) Terpenoides (Delgado-Barreto <i>et al.</i> , 2012) |
| <i>T. violacea</i> | <i>Amaryllidaceae</i> | - | + | - | - | Flavonoides (Aremu <i>et al.</i> , 2014). Compuestos azufrados (Auger y Thibout, 2004; Jäger y Stafford, 2012) |
| <i>C. chinense</i> (Metanol) | <i>Solanaceae</i> | + | - | - | - | Alcaloides (Chinn <i>et al.</i> , 2011; Castillo-Sánchez <i>et al.</i> , 2012; García-Mateos <i>et al.</i> , 2013) |
| <i>C. chinense</i> (Diclorometano) | <i>Solanaceae</i> | + | - | - | - | |

(-) Ausencia; (+) Presencia; Al = Alcaloides; Fla = Flavonoides; Ter = Terpenoides; Gluc = Glucosinolatos

DISCUSIÓN

Los bioensayos con extractos de *T. violacea*, *P. auritum* y *C. chinense* en las concentraciones propuestas para evaluar el comportamiento *in vitro* de los hongos fitopatógenos *C. gloeosporioides* y *B. cinerea*, han evidenciado de acuerdo al análisis de varianza practicado que hubo actividad antifúngica y la confiabilidad de los datos reflejada en los bajos coeficientes de variación en el experimento, información valiosa que amplía el conocimiento sobre los efectos que ocasionan estos extractos. En forma particular, a continuación se discuten los aspectos más importantes de este fenómeno biológico.

El efecto superior del extracto metanólico crudo de *T. violacea* sobre el fungicida para inhibir el crecimiento del micelio de las dos cepas de *C. gloeosporioides* se podría deber a que las esporas de los hongos son más susceptibles a este grupo

de fungicidas (estrobirulinas), pero no así en la fase de micelio. La aplicación de fungicidas químicos como Amistar, son altamente eficientes en el control de la germinación de esporas y la penetración al hospedero (Hamdy, 2007), valdría probar las dos condiciones.

De manera general, la cepa rosa expresó mayor sensibilidad a los extractos en comparación con la cepa gris, comportamiento que concuerda con lo observado por Hernández-Albíter *et al.* (2007) quienes encuentran diferencias en el crecimiento micelial y la germinación de conidios en varios aislamientos de *C. gloeosporioides*, asociados con la gran variabilidad genética de éste hongo; al respecto, Gutiérrez-Alonso *et al.* (2001) señalan que el comportamiento diverso entre distintas cepas de *C. gloeosporioides* se atribuye a un grado de variabilidad genética elevado, asociado con una gran plasticidad genética de adaptación a diferentes condiciones.

Con respecto a la CI_{50} , el extracto metanólico de *T. violacea* presentó mayor (90 %) efecto antifúngico que los extractos restantes (19.6 a 47.4 % de ICM), lo cual significa que con menor concentración (23.2 y 29.3 % para CR y CG, respectivamente) se logró la inhibición del 50 % del desarrollo del micelio (Cuadro 3). Conviene mencionar que *C. gloeosporioides* es una especie de las más agresivas pertenecientes a este género, ya que es considerado uno de los hongos más exitosos en el ataque a vegetales (Waller, 2004).

La detección de flavonoides en el extracto metanólico crudo de *T. violacea*, compuesto que arrojó los mejores efectos en las cepas de *C. gloeosporioides* (superando al producto químico), concuerda con lo reportado por Aremu *et al.* (2014). Otros compuestos también están presentes en *T. violacea*, entre ellos,

compuestos azufrados del tipo organosulfurados (sulfóxido de S-etil-cisteína) (Auger y Thibout, 2004; Jäger y Stafford, 2012; Olorunnisola *et al.*, 2012) y saponinas (Ncube *et al.*, 2011); los cuales no se analizaron en el presente estudio. De Souza *et al.* (2009) señalan que la actividad antifúngica se puede atribuir a diversos metabolitos en el extracto, que pueden incrementar la actividad fungitóxica y disminuir los problemas de resistencia de los organismos objetivo (hongos fitopatógenos).

Considerando que en varios trabajos se reporta que extractos acuosos y metanólicos de *T. violacea* inhiben el crecimiento micelial de *Aspergillus flavus*, *Botryosphaeria dothidea*, *Fusarium oxysporum*, *Mycosphaerella pinodes*, *Puccinia triticina*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* (Lindsey y Van Staden, 2004; Nteso y Pretorius, 2006, Cawood *et al.*, 2010; Belewa *et al.*, 2011); ahora se suma a la lista los obtenidos para *C. gloeosporioides* con extracto de *T. violacea* destacando el efecto superior del extracto sobre un fungicida.

La respuesta diferencial entre las cepas de *C. gloeosporioides* y *B. cinerea* por aplicación del extracto de *T. violacea*, considerando que la primera especie tiene más sensibilidad que la segunda (Cuadro 3), se podría deber a diferentes factores: a) especie del hongo (Kumar *et al.*, 2007); b) patogenicidad del hongo (Kumar *et al.*, 2007); c) solvente utilizado (Suárez-Jiménez *et al.* 2007); d) mecanismos de resistencia (enzimáticos, estructurales, cambio de la permeabilidad de la membrana que le permitan aprovechar, evitar o detoxificar alguno de los compuestos presentes en los extractos vegetales) (Vivanco *et al.*, 2005).

El efecto del extracto de *P. auritum* en la concentración de 100 %, en la inhibición del crecimiento micelial de las dos cepas de *C. gloeosporioides* (44.4 y 46.8 % para CR y CG, respectivamente) (Cuadro 3); concuerda con lo reportado por Baños-Guevara *et al.* (2004) y Pineda *et al.* (2012) quienes registran reducción del crecimiento micelial 48.8 y 45.1 % con extractos etanólico y metanólico, respectivamente.

La presencia de alcaloides y flavonoides en el extracto de *P. auritum*, especie con importante efecto antifúngico en *B. cinerea* en concentraciones de 90 y 100 % (56 y 60.2 %, respectivamente) (Cuadro 3), previamente ya se había registrado en extracto metanólico (Castañeda *et al.*, 2007; Olivero-Verbel *et al.*, 2009; Delgado-Barreto *et al.*, 2012); así como la presencia de monoterpenos (Pineda *et al.*, 2012). Entre las actividades biológicas que se le atribuyen a especies del género *Piper* destacan: antibacteriana, antifúngica, antialimentarias, estimulantes, citotóxicas y con propiedades insecticidas (Oliveira *et al.*, 2004; Delgado y Cuca, 2007; Scott *et al.*, 2008); considerando estas referencias se sugiere que la efectividad del extracto se pudo haber debido a: a) interacciones sinérgicas entre los constituyentes del material bioactivo (Regnault-Roger *et al.*, 2004; De Souza *et al.*, 2009); b) la susceptibilidad del patógeno (Kumar *et al.*, 2007) y c) tipo de metabolito por la clase de disolvente empleado (Pineda *et al.*, 2012). En cuanto a este último aspecto, en el presente trabajo solamente se consideró el efecto que ocasiona el extracto metanólico en *C. gloeosporioides* y no se evaluó el extracto con diclorometano. Para reforzar el interés en ensayar posteriormente el extracto con diferentes disolventes entre ellos el de diclorometano en *P. auritum*, se cuenta con la referencia de Pineda *et al.* (2012)

quienes evaluando cuatro extractos (n-hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol) crudos de *P. auritum* y en la inhibición del crecimiento de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, encuentran que el extracto hexánico fue más efectivo que los otros, indicador de que los compuestos fungitóxicos se expresan en los extractos donde se utilizan disolventes de baja polaridad (Pineda *et al.*, 2012); Delgado-Barreto *et al.* (2012) señalan que no debe descartarse el estudio fitoquímico de las especies, ya que pueden extraerse otros principios activos con disolventes de polaridad específica.

Sobre el efecto antifúngico de los extractos del fruto de *C. chinense*, los cuales contenían alcaloides (Cuadro 4), destacó un efecto diferencial en la inhibición micelial de *B. cinerea* según el tipo de extracto crudo (metanólico y diclorometano) y una respuesta homogénea en la inhibición micelial de *C. gloeosporioides* a los mismos extractos. La primera tendencia biológica en la que el extracto de diclorometano supera el efecto inhibitorio del extracto metanólico posiblemente se deba al tipo de metabolito separado por el disolvente empleado (metanólico y diclorometano), ya que la polaridad de los disolventes afecta la eficiente extracción de los capsaicinoides (Peusch *et al.*, 1997). Chinn *et al.* (2011) reportan que al probar tres tipos de disolventes (etanol, acetonitrilo y acetona), solamente la acetona predispone un alto rendimiento de capsaicinoides. Paiva *et al.* (2010) señalan que extractos del mismo material vegetal obtenidos con diferentes disolventes presentan propiedades bioactivas distintas. Las especies del género *Capsicum* sintetizan capsaicinoides, de los cuales la capsaicina y la dihidrocapsaicina son responsables hasta del 90 % de la pungencia de los chiles (Cázares *et al.*, 2005). Estos alcaloides presentan

actividad antioxidante (Rosa *et al.*, 2002); anticancerígena (Macho *et al.*, 2003); fitotóxica (García-Mateos *et al.*, 2013); insecticida (Edelson *et al.*, 2002) y repelente (Castillo-Sánchez *et al.*, 2012).

En relación con los efectos inhibitorios registrados para *C. gloeosporioides* y *B. cinerea* con la aplicación de los extractos de *T. violacea* y *P. auritum*, los inducidos por el extracto de diclorometano de *C. chinense* se consideran de grado intermedio (ICM cercano a 50 %) y de acción fungistática que podría combinarse en mezclas con otros extractos, toda vez que se trata de un recurso vegetal de fácil disponibilidad y costo bajo.

En general para tener referencia del mecanismo de acción que podría estar involucrado en los efectos antifúngicos producidos por los extractos evaluados en el presente estudio, Cristani *et al.* (2007) señalan que el modo de acción de los terpenos y aceites esenciales no ha sido dilucidado totalmente, pero se postula que pueden causar rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofílicos y sobre los alcaloides se ha postulado que sus efectos inhibitorios del crecimiento de microorganismos patógenos están dados por su capacidad de intercalarse con el DNA, de detener la síntesis de proteínas, inducir la apoptosis e inhibir las enzimas del metabolismo de carbohidratos (Sepúlveda *et al.*, 2003). Con respecto a los flavonoides, su actividad es probablemente debida a su capacidad para formar complejos con proteínas extracelulares solubles y con paredes celulares de los hongos; además la naturaleza lipofílica de los flavonoides también puede romper membranas (Tasleem *et al.*, 2011). En relación con los compuestos azufrados, inhiben la actividad enzimática de diversas enzimas celulares (fosfatasa alcalina, invertasa, ureasa) que ligan a los

grupos tiol de las proteínas y polipéptidos, causando degradación de polímeros celulares de muchos hongos, desestabilizando canales de membrana, además de disgregar los ribosomas e intervenir en la síntesis de ADN, tanto mitocondrial como celular (Slusarenko *et al.*, 2008).

Una reflexión importante en este capítulo es el relacionado con la necesidad de establecer metodologías que permitan diferenciar la naturaleza fungicida o fungistática de cuando menos los mejores tratamientos, lo cual podría realizarse a través de un experimento de transferencia del hongo a un medio de PDA para evaluar su viabilidad.

CONCLUSIONES

La actividad antifúngica de los extractos vegetales de *T. violacea*, *P. auritum* y *C. chinense* en las cepas de *C. gloeosporioides* fue diferencial, destacando la mayor inhibición del crecimiento micelial con el extracto de *T. violacea* reflejada en un bajo valor de CI_{50} superando al fungicida.

El efecto biológico de los extractos vegetales ensayados contra *B. cinerea* no fue mejor que el ocasionado con la aplicación del fungicida, aunque el efecto antifúngico fue diferencial según la especie vegetal y concentraciones; en el caso de los extractos de *P. auritum* y *C. chinense* los alcaloides se asociaron con los extractos que tuvieron el máximo efecto antifúngico.

LITERATURA CITADA

- Ademe, A., A. Ayalew and K. Woldetsadik. 2013. Evaluation of antifungal activity of plant extracts against papaya anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). Journal Plant Pathology Microbiology 4: 26-32.
- Anand, T. and R. Bhaskaran. 2009. Exploitation of plant products and bioagents for ecofriendly management of chille fruit rot disease. Journal Plant Protection Research 19: 195-203.
- Alves da Silva, F. H., J. Santos do Nascimento, S. Rogéria de Carvalho Nascimento and M. Queiroz Ambrósio M. 2014. Aqueous extracts of plants in *Colletotrichum gloeosporioides* inhibition *in vitro* and in postharvest guava. Revista Caatinga 27: 93 – 99.
- Antonious, G. F., J. Meyer E. and J. Snyder C. 2006. Toxicity and repellency of hot pepper extracts to spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. Journal of Environmental Science and Health. 41: 1383-1391.
- Aremu, A. O., N. Masondo A. and J. Van Staden. 2014. Smoke-water stimulates secondary metabolites during *in vitro* seedling development in *Tulbaghia* species. South African Journal of Botany 91: 49-52.
- Auger, J. y E. Thibout. 2004. Sustancias azufradas de los *Allium* y de las crucíferas: potencial fitosanitario. *In: Biopesticidas de Origen Vegetal*. Regnault-Roger, C., B. J. Philogene R. y C. Vincent (eds.). Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 77-92.

- Bajpai, V. K. and S. Kang C. 2012. *In vitro* and *in vivo* inhibition of plant pathogenic fungi by essential oil and extracts of *Magnolia liliflora* Desr. Journal of Agricultural Science and Technology 14: 845-856.
- Baños-Guevara, P. E., E. Zavaleta-Mejía, M. T. Colinas-Leon, I. Luna-Romero. y J. G. Gutierrez-Alonso. 2004. Control biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* ((Penz.) Penz. y Sacc.) en papaya Maradol roja (*Carica papaya* L.) y fisiología poscosecha de frutos infectados. Revista Mexicana de Fitopatología 22: 198-205.
- Barnett, H. L. y B. Hunter B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. The American Phytopathological Society. USA 218 p.
- Barrera-Necha, L. L., S. Bautista-Baños, H. E. Flores-Moctezuma and A. Rojas-Estudillo. 2008. Efficacy of essential oils on the conidial germination, growth of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc and control of postharvest diseases in papaya (*Carica papaya* L.). Plant Pathology Journal 7: 174-178.
- Belewa, V., Baijnath, H. and B. Somai M. 2011. Aqueous extracts from the bulbs of *Tulbaghia violacea* are antifungal against *Aspergillus flavus*. Journal of Food Safety 31: 176–184.
- Briemann, H. L., W. Setzer N., P. Kaufman B., A. Kirakosyan and L. Cseke J. 2006. Phytochemicals: The chemical components of plants. *In: Natural Products from Plants*. Cseke, L. J., A. Kirakosyan, P. Kaufman B., S. Warber L., J. Duke A. and H. L. Briemann (eds.). CRC-Press. Boca Raton, FL. EEUU. pp. 1-49.

- Bussaman, P., P. Namsena, P. Rattanasena and A. Chandrapatya, A. 2012. Effect of crude leaf extracts on *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. *Psyche* 2012: 1-6.
- Casarrubias-Carrillo, U., E. Cárdenas-Soriano, D. Nieto-Ángel y J. C. Gutiérrez-Alonso. 2002. Histopatología de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) infectados por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20: 88-93.
- Castañeda, M. L., A. Muñoz, J. Martínez R. y E. Stanshenko E. 2007. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Scientia et Technica* 33: 165-166.
- Castillo-Sánchez, L. E., J. J. Jiménez-Osornio y M. A. Delgado-Herrera. 2012. Actividad biológica *in vitro* del extracto de *Capsicum chinense* Jacq contra *Bemisia tabaci* Genn. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 18: 345-356.
- Cawood, M. E., J. Pretorius C., A. J. Van Der Westhuizen and Z. Pretorius A. 2010. Disease development and PR-protein activity in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings treated with plant extracts prior to leaf rust (*Puccinia triticina*) infection. *Crop Protection* 29: 1311-1319.
- Cázares, S., P. Ramírez, F. Castillo, R. Soto, M. Rodríguez y J. Chávez. 2005. Capsaicinoides y preferencia de uso en diferentes morfotipos de chile (*Capsicum annum* L.) del centro-oriente de Yucatán. *Agrociencia* 39: 627-638.
- Chaurasia, B., Pandey, A., Palni, L. M. S., Trivedi, P., Kumar, B. and Colvin, N. 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic

- Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. Microbiological Research 160: 75-81.
- Chinn, M. S., R. R. Sharma-Shivappa and J. Cotter L. 2011. Solvent extraction and quantification of capsaicinoids from *Capsicum chinense*. Food and Bioproducts Processing 89: 340-345.
- Chirinos, J. 2009. Uso de extractos naturales como una alternativa ecológica para el control de enfermedades en plantas. Aspectos Fitosanitarios. INIA Divulga. Venezuela. pp. 40-42.
- Cooke, D. E. L., V. Young, P. R. Birch J., R. Toth, F. Gourlay, J. Day P., S. Carnegie F. and J. Duncan M. 2003. Phenotypic and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Scotland (1995-97). Plant Pathology 52: 181-192.
- Cristani, M., M. D'arrigo, G. Mandalari, F. Castelli, M. Sarpietro G., D. Micieli, V. Venuti, G. Bisignano, A. Saija and D. Trombetta. 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 6300-6308.
- Delgado-Barreto, E., M. R. García-Mateos, M. C. Ybarra-Moncada, C. Luna-Morales y M. T. Martínez-Damián. 2012. Propiedades entomotóxicas de los extractos vegetales de *Azardichtha indica*, *Piper auritum* y *Petiveria alliacea* para el control de *Spodoptera exigua* Hubner. Revista Chapingo. Serie Horticultura 18:55-69.
- Delgado, A. W. y S. L. Cuca E. 2007. Composición química del aceite esencial de *Piper hispidum*. Revista Productos Naturales 1: 5-8.

- De Souza-Tavares, W., I. Cruz, F. Petacci, F. Souza S., Z. Cola J. y J. Serrao E. 2009. Potencial use of *Astereaceae* extracts to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and selectivity to their parasitoids *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scellionidae). *Indian Crop Production* 30: 384-389.
- Edelson, J., J. Dutie and W. Roberts. 2002. Toxicity of biorational insecticides activity against the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pest Management Science* 58: 255-260.
- Ellis, M. 2004. Botrytis Fruit rot «Gray Mold» of strawberry, raspberry and blackberry. Extension factsheet. HYG – 3017-94. Ohio State Univ. 2 p.
- Finney, D. J. 1971. Probit Analysis. 3rd. ed. Cambridge University Press. London. 318 p.
- Fokialakis, N., C. Cantrell L., S. Duke O., A. Skaltsounis L. and D. Wedge E. 2006. Antifungal activity of thiophenes from *Echinops ritro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 1651-1655.
- García-Mateos, M. R., Elizalde-Sánchez, E., Espinosa-Robles, P. and Álvarez-Sánchez, E. 2007. Toxicity of *Petiveria alliacea* L. on white fly (*Trialeurodes vaporariorum* West.) in laboratory and greenhouse. *Interciencia* 32: 121-125.
- García-Mateos, M. R., C. Sánchez-Navarro, J. Martínez-Solís y M. Pérez-Grajales. 2013. Actividad fitotóxica de los extractos de chile *manzano* (*Capsicum pubescens* R & P). *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 19: 23-33.

- Gutiérrez-Alonso, J. G., D. Nieto-Ángel, D. Téliz-Ortiz, E. Zavaleta-Mejía, H. Vaquera-Huerta, T. Martínez-Damián y F. Delgadillo-Sánchez. 2001. Características de crecimiento, germinación, esporulación y patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. obtenidos de frutos de mango (*Mangifera indica* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 19: 90- 93.
- Hamdy, B. 2007. Review of strobilurin fungicide chemicals. Journal of Environmental Science and Health 42: 441-451.
- Hernández-Albíter, R. C., L.L. Barrera-Necha, S. Bautista-Baños and L. Bravo-Luna. 2007. Antifungal potential of crude plant extracts on conidial germination of two isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz and Sacc. Revista Mexicana de Fitopatología 25: 180-185.
- Hernández-Lauzardo, N., S. Bautista-Baños y M. G. Velázquez del Valle. 2007. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. Revista Fitotecnia Mexicana 30:119-123.
- Hernández, M., M. Murace, J. Ringuet, I. Petri, G. Gallo and A. Arambarri. 2013. Effect of aqueous and alcohol extracts of *Phytolacca tetramera* (*Phytolaccaceae*) leaves on *Colletotrichum gloeosporioides* (Ascomycota). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 48: 201-209.
- Ibarra, E. E., M. Téllez R., M. Soto-Hernández, V. Martínez M., R. García-Mateos, y R. San Miguel-Chávez. 2009. Actividad antimicótica *in vitro* de *Erisovina*. Revista Fitotecnia Mexicana 32: 327-330.

- Ikeura, H., N. Somsak, F. Kobayashi, S. Kanlayanarat and Y. Hayata. 2011. Application of selected plant extracts to inhibit growth of *Penicillium expansum* on apple fruits. *Plant Pathology Journal* 10: 79-84.
- Jäger, A. K. and G. Stafford I. 2012. Quality assessment of *Tulbaghia* rhizomes. *South African Journal of Botany* 82: 92-98.
- Juárez-Becerra, G. P., M. E. Sosa-Morales y A. López-Malo. 2010. Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 4: 14-23.
- Kumar, R., A. Kumar M., N. Dubey K. and Y. Tripathi B. 2007. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxicogenic y antioxidant activity. *International Journal of Food Microbiology* 115: 159-164.
- Macho, A., C. Lucena, R. Sancho, N. Daddario, A. Minassi, E. Muñoz and G. Appendino. 2003. Non-pungent capsaicinoids from sweet pepper: synthesis and evaluation of the chemopreventive and anticancer potential. *European Journal of Nutrition* 42: 2-9.
- Mazid, M., T. Khan and F. Mohammad. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Journal Biology and Medicine* 3: 232-249.
- Meepagala, K. M., G. Sturtz and D. Wedge E. 2002. Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisia dracunculus* L. var. *dracunculus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6989-6992.
- Miclea, R. and C. Puia. 2010. *In vitro* Control of the Fungus *Botrytis cinerea* Pers. with Plant Extracts. *Bulletin UASVM Agriculture* 67: 181-186.

- Ncube, B., V. Ngunge N. P., J. Finnie F. and J. Van-Staden. 2011. A comparative study of the antimicrobial and phytochemical properties between outdoor grown and micropropagated *Tulbaghia violacea* Harv. plants. *Journal of Ethnopharmacology* 134: 775-780.
- Nteso, L. and J. Pretorius C. 2006. *Tulbaghia violacea* L. I: *In vitro* antimicrobial properties towards plant pathogens. *Australian Journal of Agricultural Research* 57: 511–516.
- Lindsey, K. and J. Standen V. 2004. Growth inhibition of plant pathogenic fungi by extracts of *Allium sativum* and *Tulbaghia violacea*. *South African Journal of Botany* 70: 671-673.
- Oliveira L., H. W., C. Ehringhausm H. and P. Yoshio K. 2004. Genetic diversity of *Pimenta longa* genotypes (*Piper* spp., *Piperaceae*) of the Embrapa Acre germplasm collection. *Genetics and Molecular Biology* 27: 74-82.
- Olivero-Verbel, J., J. Gýette-Fernandez and E. Stashenko. 2009. Acute toxicity against *Artemia franciscana* or essential oils isolated from plants of the genus *Lippia* and *Piper* collected in Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 5: 419-427.
- Olorunnisola, O. S., Bradley, G. and Afolayan, A. J. 2012. Protective effect of *Tulbaghia violacea* Harv. on aort pathology, tissue antioxidant enzymes and liver damage in diet-induced atherosclerotic rats. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 12747-12760.
- Paiva P., M. G., F. Gomes S., T. Napoleao H., R. Sá A., M. Correia T. S. and L. C. B. Coelho B. 2010. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. *In: Current Research, Technology and Education*

- Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Mendez-Vilas, A. (ed.). Formatex Research Center. España. pp. 396-406.
- Pandey, B., S. Khan and S. Singh. 2014. A study of antimicrobial activity of some spice. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 3: 643-650.
- Peusch, M., E. Seitz M., M. Petz, A. Müller and E. Anklam. 1997. Extraction of capsaicinoids from chillies (*Capsicum frutescens* L.) and paprika (*Capsicum annuum* L.) using supercritical fluids and organic solvents. Z. Lebensm. Unters, Forsch. European Food Research and Technology 204: 351-355.
- Pineda, M. R., P. Vizcaíno S., P. C. García M., G. J. Gil, H. and R. D. Durango L. 2012. Chemical composition and antifungal activity of *Piper auritum* Kunth and *Piper holtonii* C. DC. against phytopathogenic fungi. Chilean Journal of Agricultural Research 72: 507-5015.
- Rahman, M., S. Hajar Ahmad, M. T. Mohamed M. and M. Z. Rahman A. 2011. Extraction of *Jatropha curcas* fruits for antifungal activity against anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) of papaya. African Journal of Biotechnology 10: 9796-9799.
- Regnault-Roger, C. 2004. ¿Nuevos fitoinsecticidas para el tercer milenio? In: Biopesticidas de Origen Vegetal. Regnault-Roger, C., B. J. Philogene R., C. Vincent (eds.). Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 19-40.
- Rodríguez, A. T., D. Morales y M. Ramírez A. 2000. Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento *in vitro* de hongos fitopatógenos. Cultivos Tropicales 21: 79-82.

- Rosa, A., M. Deiana, V. Casu, S. Paccagnini, G. Appendino, M. Ballero and M. Dessi A. 2002. Antioxidant activity of capsinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7396-7401.
- Saha, D., R. Kumar, S. Ghosh, M. Kumari and A. Saha. 2012. Control of foliar diseases of tea with *Xanthium strumarium* leaf extract. *Industrial Crops and Products* 37: 376-382.
- Sánchez, Y., O. Pino, T. Correa M., E. Naranjo y A. Iglesia. 2009. Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* Kunt (Caisimón de Anís). *Revista de Protección Vegetal* 24: 39-46.
- Sateesh, K., T. Marimuthu, B. Thayumanavan, R. Nandakumar and R. Samiyappan. 2004. Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65: 91-100.
- Scott I., A., H. Jensen R., B. J. Philogene R. and J. Arnason T. 2008. A review of *Piper* spp. (*Piperaceae*) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochemistry Reviews* 7: 65-75.
- Sepúlveda, J. G, D. Porta H. y S. Rocha M. 2003. Participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 355-363.
- Sharifi Rad, J., H. Alfatemi, M. Sharifi Rad and D. Jyoti Sen. 2013. Phytochemical and antimicrobial evaluation of the essential oils and antioxidant activity of aqueous extracts from flower and stem of *Sinapis arvensis* L. *American Journal of Advanced Drug Delivery* 1: 1-10.

- Slusarenko, A. J., A. Patel and D. Ports. 2008. Control of plant disease by natural products: Allicin from garlic as a case study. *European Journal of Plant Pathology* 121: 313-322.
- Suárez-Jiménez, G. M., M. O. Cortez-Rocha, E. C. Rosas-Burgos, A. Burgos-Hernández, M. Plascencia-Jatomea and F. J. Cinco-Moroyoqui. 2007. Antifungal activity of plant methanolic extracts against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. and Fumonisin B1 Production. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25: 134-142.
- Sutton, B. C. 1992. *The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stroma*. Commonwealth Mycological Institute. New York, USA. 696 p.
- Talhinhas, P., S. Sreenivasaprasad, J. Neves and H. Oliveira. 2005. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 2987-2998.
- Tasleem, A., T. Mandal K. and D. Rajesh. 2011. Natural products: anti-fungal agents derived from plants. *In: Opportunity, Challenger and Scope of natural Products in Medicinal Chemistry*. Tiwari, V. K. and B. Mishra B. (eds.). Research Signpost. Kerala, India. pp. 283-311.
- Tripathi, P. and A. Shukla K. 2010. Exploitation of botanicals in the management of phytopathogenic and storage fungi. *In: Management of Fungal Plant Pathogens*. Arya, A. and A. Perello E. (eds). CAB International. USA pp. 36-50.
- Vivanco, J. M., E. Cosio, V. M. Loyola-Vargas and H. Flores E. 2005. Mecanismos químicos de defensa de las plantas. *Investigación y Ciencia* 2: 68-75.

Wagner, H. and S. Bladt. 1996. Plant Drug Analysis: A thin Layer Chromatography Atlas. Springer. Berlin, Alemania. 383 p.

Waller, J. M. 2004. *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. *In: Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Bailey, J. A. and M. Jeger J. (eds.). CAB International, Oxon, UK. pp. 167-185.

CAPÍTULO III

FITOTOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS DE LAS ESPECIES *Dieffenbachia amoena*, *Nerium oleander*, *Raphanus sativus* Y *Brassica napobrassica*

RESUMEN

El potencial fitotóxico y alelopático que ofrecen las plantas como fuente de principios bioactivos es una línea de investigación promisoría en el siglo XXI para el desarrollo de herbicidas botánicos. El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad fitotóxica de los extractos metanólicos de *Dieffenbachia amoena*, *Nerium oleander*, *Raphanus sativus* y *Brassica napobrassica* en la germinación y vigor de las plántulas de *Chenopodium album*, *Echinochloa crus-galli*, *Lactuca sativa*, *Solanum lycopersicum* y *Oryza sativa*. Las variables evaluadas fueron: porcentaje de germinación y vigor de la plántula (longitud de radícula, LR y longitud de la parte aérea, LPA), se procesaron mediante análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$). El extracto de *B. napobrassica* presentó el mayor efecto fitotóxico en comparación con los extractos de las especies restantes, al afectar la germinación de la mayoría de las semillas (0.7 % *E. crus-galli*, 0.4 % *L. sativa*, 25.4 % *S. lycopersicum* y 28.5 % *O. sativa* de porcentaje de germinación). Los extractos de *B. napobrassica* y *R. sativus* inhibieron el crecimiento de la LR de *C. album* (83.3 % con ambos extractos), *E. crus-galli* (84.6 y 80.8 %, respectivamente), *L. sativa* (99.8 y 95 %, respectivamente) y *O. sativa* (97 y 74.1 %, respectivamente), la excepción fue *S. lycopersicum* que presentó estimulación en la LR con todos los extractos. El análisis fitoquímico mostró la presencia de glucosinolatos en los extractos con mayor fitotoxicidad (*Brassicaceae*).

Palabras clave: estimulación, germinación, inhibición, raíz, vigor.

PHYTOTOXICITY OF EXTRACTS OF *Dieffenbachia amoena*, *Nerium oleander*, *Raphanus sativus* AND *Brassica napobrassica*

ABSTRACT

The phytotoxic and allelopathic potential of plants as a source of bioactive principles is a promising line of research in the XXI century for the development of botanical herbicides. The objective of this research was to determine the phytotoxic activity of methanol extracts of *Dieffenbachia amoena*, *Nerium oleander*, *Raphanus sativus* and *Brassica napobrassica* on germination and seedling vigor of *Chenopodium album*, *Echinochloa crus-galli*, *Lactuca sativa*, *Solanum lycopersicum* and *Oryza sativa*. The variables evaluated were germination percentage and seedling vigor (radicle length, RL and aerial part length, APL). An analysis of variance and Tukey's comparison of means test ($P \leq 0.05$) were performed. The methanol extract of *B. napobrassica* showed the highest phytotoxic effect in comparison with the extracts of the other species, by affecting the germination of most seeds (0.7 % *E. crus-galli*, 0.4 % *L. sativa*, 25.4 % *S. lycopersicum* and 28.5 % *O. sativa*, germination percentage). The methanol extracts of *B. napobrassica* and *R. sativus* inhibited the growth of RL of *C. album* (83.3 % with both extracts), *E. crus-galli* (84.6 and 80.8 %, respectively), *L. sativa* (99.8 and 95 %, respectively) and *O. sativa* (97 and 74.1 %, respectively); the only exception was *S. lycopersicum* presented RL stimulation in all extracts. Phytochemical analysis showed the presence of glucosinolates in extracts more phytotoxicity (Brassicaceae).

Keywords: stimulation, germination, inhibition, root, vigor

INTRODUCCIÓN

Los aleloquímicos son considerados una alternativa para el control de malezas en la agricultura al estimular o inhibir la germinación y el crecimiento de algunos vegetales (Anaya, 2003). Estos productos naturales son biodegradables, no contaminan el ambiente en comparación con los herbicidas sintéticos, son derivados biosintéticamente del metabolismo primario (Briemann *et al.*, 2006). Los aleloquímicos son metabolitos secundarios sintetizados principalmente por vegetales como parte del mecanismo de defensa y comunicación (Qasem *et al.*, 2002). Estos productos naturales son liberados mediante una diversidad de señales al medio ambiente por algunos vegetales (planta donadora), generando efectos fitotóxicos en las plantas receptoras de la misma o diferente especie o en los microorganismos del suelo (Benyas *et al.*, 2010).

No obstante la gran diversidad vegetal que existe en México, el potencial fitotóxico de algunas plantas ha sido poco explorado y aprovechado, situación reflejada en una pobre investigación sobre plantas con propiedades fitotóxicas (*in vitro*) y alelopáticas (en suelo), de ahí el reducido número de especies vegetales estudiadas. Aunque se han reportado efectos fitotóxicos de algunos metabolitos como alcaloides y glucosinolatos (García-Mateos *et al.*, 2011; Soltys *et al.*, 2013), la actividad fitotóxica y alelopática generalmente no está determinada por un tipo de metabolito, sino por la acción sinérgica de varios de ellos como se encuentran en los extractos (Anaya, 2003). La estructura química de algunos metabolitos puros, con actividad fitotóxica o alelopática, podría ser utilizada como modelo en la síntesis de nuevos herbicidas.

Con base en la información el extracto de *N. oleander* se ha evaluado el efecto fitotóxico sobre la germinación de *Echinochloa crus-galli*, *Parthenium hysterophorus* y *Cynodon dactylon* y efecto alelopático en *Lactuca sativa* (Khanh *et al.*, 2005; Anjum *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2011; Maharaj y Prabhakaran, 2014); pero no se ha estudiado la actividad fitotóxica en *Solanum lycopersicum*, *Chenopodium album* y *Oryza sativa*. La actividad biológica que se ha estudiado en el extracto de *Dieffenbachia amoena* es del tipo insecticida y el extracto de *B. napobrassica* ha presentado efectos alelopáticos en *Kochia arenaria* y *Sorghum halepense*; y el extracto de *R. sativus* mostró actividad alelopática en *L. sativa* y *S. halepense* (Moyer y Huang, 1997; Benedicto *et al.*, 1998; Uludag *et al.*, 2006); sin embargo, ninguno de los extractos antes mencionados se han evaluado en especies como *S. lycopersicum*, *C. album* y *O. sativa*. Desde esta perspectiva se planteó como objetivo de la investigación evaluar el efecto fitotóxico de los extractos metanólicos de *D. amoena*, *N. oleander*, *R. sativus* y *B. napobrassica* en la germinación y vigor de las plántulas (LR y LPA) de *C. album* (cenizo), *E. crus-galli* (pasto dentado), *L. sativa* (lechuga), *S. lycopersicum* (tomate) y *O. sativa* (arroz).

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección del material vegetal. Las muestras vegetales (hojas, tallos y raíces) de las especies *Dieffenbachia amoena* Bull., *Nerium oleander* L., *Raphanus sativus* L. y *Brassica napobrassica* (L.) Mill., se recolectaron aleatoriamente, tanto para su identificación taxonómica como para la preparación de extractos. En todos los casos el material biológico estuvo libre de plagas,

enfermedades y sin daños físicos. *Dieffenbachia amoena* (amoena) se recolectó de campo abierto, en etapa vegetativa, durante el mes de septiembre de 2014; *N. oleander* (adelfa) se recolectó en el campus de la UACH, en etapa de floración, en el mes de octubre de 2014; *R. sativus* (rábano blanco) se recolectó en una parcela a orilla de río, en el mes de agosto de 2014; finalmente *B. napobrassica* se recolectó en etapa de floración a orilla de carretera en el mes de octubre de 2014 (se desconoce el manejo técnico al que se sometieron). Las muestras se trasladaron en hielera al laboratorio de Fitoquímica de Preparatoria Agrícola para su secado, molienda y preparación de extractos. Para la certificación taxonómica de las muestras biológicas se prepararon dos ejemplares de herbario por especie, y se depositaron en el Herbario-Hortorio “Jorge Espinoza Salas” de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características geográficas de los sitios de colecta, tipo de tejido y número de registro de las cuatro especies de estudio.

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

* Herbario - Hortorio “Jorge Espinoza Salas” de Preparatoria Agrícola de la UACH.

Preparación del extracto crudo. El material vegetal de cada especie se secó en una estufa (Fanem LTDA) a temperatura constante ($50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 48 h. El extracto metanólico crudo de cada especie molida se obtuvo mediante un equipo Soxhlet durante 48 h. Posteriormente, el extracto se concentró a presión

reducida en un rotaevaporador (Büchi® R-210). Por dilución seriada se prepararon diferentes concentraciones (1, 5, 10, 15, 20 % v/v) para las pruebas de fitotoxicidad.

Bioensayo de fitotoxicidad. Las pruebas biológicas se llevaron a cabo en semillas de *O. sativa* y *S. lycopersicum*, proporcionadas por el Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH); mientras que las de las malezas *Ch. album* y *E. crus-galli* fueron donadas por el Laboratorio de Malezas del Departamento de Parasitología Agrícola de la UACH. Las semillas de *L. sativa* fueron adquiridas en una casa comercial.

A un círculo de papel filtro Wattman No. 1 ($\varnothing = 9$ cm) colocado dentro de una caja Petri estéril (unidad experimental) se añadieron 1.5 ml de cada concentración del extracto metanólico crudo. El disolvente se dejó evaporar a temperatura ambiente, se colocaron 50 semillas por especie, después se agregaron 2.5 mL de agua destilada a cada caja. Como testigo se usó agua destilada. Las cajas se colocaron en una cámara germinadora Seedburo® bajo condiciones de luz continua con intensidad luminosa de $15.39 \text{ mmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, humedad relativa de 80 % y temperatura de 25 ± 2 °C. El mismo procedimiento se repitió para realizar el bioensayo en las semillas de cada especie.

Un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones se utilizó para distribuir los tratamientos. Para las especies de *O. sativa*, *S. lycopersicum* y *C. album* la toma de datos se realizó a los 14 días después de la siembra (dds), mientras que para *E. crus-galli* se realizó a los 10 dds y a los siete dds para *L. sativa*, como lo establece el International Seed Testing Association (ISTA) (ISTA, 2014). Las variables que se evaluaron fueron: porcentaje de germinación

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

Análisis fitoquímico. Por cromatografía en capa fina (CCF) de gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck) se identificó cualitativamente la presencia de alcaloides, flavonoides, terpenoides y glucosinolatos en los extractos metanólicos crudos de cada especie (Wagner y Bladt, 1996).

Análisis estadístico. Mediante el programa Statistical Analysis System (SAS) se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias (Tukey, $P \leq 0.05$). Debido a que la variable (% G) se expresó en porcentaje, para proceder al análisis de varianza se llevó a cabo la transformación de los datos, con el principio de manejarlos bajo una distribución normal. La transformación de Yates se llevó a cabo en Excel con la siguiente propuesta: $XT = \sqrt{\text{Arcoseno}(x/100)}$, donde: XT= Transformación de la variable, X= Variable respuesta expresada en porcentaje.

RESULTADOS

Fitotoxicidad por especie

El extracto metanólico crudo de *B. napobrassica* fue el que presentó mayor efecto fitotóxico por la expresión de las variables porcentaje de G, LR y LPA en la mayoría de las especies blanco, en comparación con los extractos de otras especies (*R. sativus*, *D. amoena*, *N. oleander*). Con el extracto de *B. napobrassica* se obtuvieron los siguientes porcentajes de G: *E. crus-galli* (0.7 %), *L. sativa* (0.4 %), *S. lycopersicum* (25.4 %), *O. sativa* (28.5 %) y en *C. album* (17.8 %); asimismo, afectó el desarrollo de LR en *L. sativa* (99.8 %) y *O. sativa* (97 %) y la LPA en *L. sativa* (93.6 %) y *S. lycopersicum* (71 %). El extracto de *R. sativus* presentó menor toxicidad porque afectó solamente el crecimiento de LR de *L. sativa* (99.8 %), *S. lycopersicum* (97.1 %) y *O. sativa* (97 %) (Cuadro 2).

Fitotoxicidad en la germinación

El extracto de *B. napobrassica* afectó en mayor grado la germinación (porcentaje de G) de la mayoría de las especies objetivo (0.7 % *E. crus-galli*, 0.4 % *L. sativa*, 25.4 % *S. lycopersicum* y 28.5 % *O. sativa*) (Figura 4); además los extractos de *R. sativus* y *B. napobrassica* mostraron efectos de inhibición y de estimulación en el porcentaje de G en las semillas (Figura 3 y 4); es decir el efecto de estimulación se observó con el extracto metanólico de *B. napobrassica* en las semillas de *O. sativa* y *S. lycopersicum* a la concentración de 5 % (52 y 68 %, respectivamente) y un efecto inhibitorio en la concentración más baja (62 y 41 %, respectivamente) (Figura 4). El extracto crudo de *R. sativus* al 1 % mostró inhibición (70.5 %) pero al 5 % la estimuló (33.8 %) en *C. album* y en *S. lycopersicum* se observó estimulación (63.8 %) al 15 % (Figura 3).

Cuadro 2. Efecto de los extractos crudos en la germinación y el vigor por especie de semilla.

| <i>C. album</i> | | | | | |
|------------------------|---------|---------|--------------------|----------|---------------------|
| Extracto | % G | LR (cm) | LR % Inhibición | LPA (cm) | LPA % Inhibición |
| <i>D. amoena</i> | 6.6 cd | 0.33 b | 78.0 | 0.5 b | 75.0 |
| <i>N. oleander</i> | 3.8 d | 0.14 c | 90.7 | 0.49 b | 75.5 |
| <i>R. sativus</i> | 12.7 cb | 0.25 cb | 83.3 | 0.5 b | 75.0 |
| <i>B. napobrassica</i> | 17.8 b | 0.25 cb | 83.3 | 0.42 b | 79.0 |
| Testigo | 100 a | 1.5 a | - | 2.0 a | - |
| DMSH | 7.0 | 0.2 | | 0.3 | |
| <i>E. crus-galli</i> | | | | | |
| Extracto | % G | LR (cm) | LR % Inhibición | LPA (cm) | LPA % Inhibición |
| <i>D. amoena</i> | 4.4 b | 0.4 b | 84.6 | 1.0 cb | 68.8 |
| <i>N. oleander</i> | 3.8 b | 0.5 b | 80.8 | 1.2 b | 62.5 |
| <i>R. sativus</i> | 4.4 b | 0.5 b | 80.8 | 0.8 cb | 75.0 |
| <i>B. napobrassica</i> | 0.7 c | 0.4 b | 84.6 | 0.5 c | 84.4 |
| Testigo | 100 a | 2.6 a | - | 3.2 a | - |
| DMSH | 2.4 | 0.4 | | 0.5 | |
| <i>L. sativa</i> | | | | | |
| Extracto | % G | LR (cm) | LR % Inhibición | LPA (cm) | LPA % Inhibición |
| <i>D. amoena</i> | 29 c | 0.4 b | 75.0 | 1.6 b | 27.3 |
| <i>N. oleander</i> | 51 b | 0.5 b | 68.8 | 0.95 c | 56.8 |
| <i>R. sativus</i> | 14.6 d | 0.08 c | 95.0 | 0.11 d | 95.0 |
| <i>B. napobrassica</i> | 0.4 e | 0.03 c | 99.8 | 0.14 d | 93.6 |
| Testigo | 100 a | 1.6 a | - | 2.2 a | - |
| DMSH | 6.8 | 0.2 | | 0.3 | |
| <i>S. lycopersicum</i> | | | | | |
| Extracto | % G | LR (cm) | LR % Inhibición | LPA (cm) | LPA % Inhibición |
| <i>D. amoena</i> | 30.6 c | 0.9 c | 62.5 | 1.5 c | 51.6 |
| <i>N. oleander</i> | 63.2 b | 1.9 b | 20.8 | 2.2 b | 29.0 |
| <i>R. sativus</i> | 58.5 b | 0.7 d | 70.8 | 2.3 b | 25.8 |
| <i>B. napobrassica</i> | 25.4 c | 0.7 d | 97.1 | 0.9 d | 71.0 |
| Testigo | 100 a | 2.4 a | - | 3.1 a | - |
| DMSH | 11.32 | 0.2 | | 0.2 | |
| <i>O. sativa</i> | | | | | |
| Extracto | % G | LR (cm) | LR % Inhibición | LPA (cm) | LPA % Inhibición |
| <i>D. amoena</i> | 67.4 b | 1.8 b | 33.3 | 1.4 d | 58.8 |
| <i>N. oleander</i> | 52.3 c | 0.9 c | 66.7 | 2.2 b | 35.3 |
| <i>R. sativus</i> | 60.6 cb | 0.7 d | 74.1 | 1.8 cb | 47.1 |
| <i>B. napobrassica</i> | 28.5 d | 0.8 dc | 97.0 | 1.6 cd | 52.9 |
| Testigo | 100 a | 2.7 a | - | 3.4 a | - |
| DMSH | 13.7 | 0.2 | | 0.4 | |

G: porcentaje de germinación, LR: longitud de raíz, LPA: longitud de la parte aérea. DMSH: diferencia mínima significativa honesta. †Medias con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales con base en la prueba de Tukey

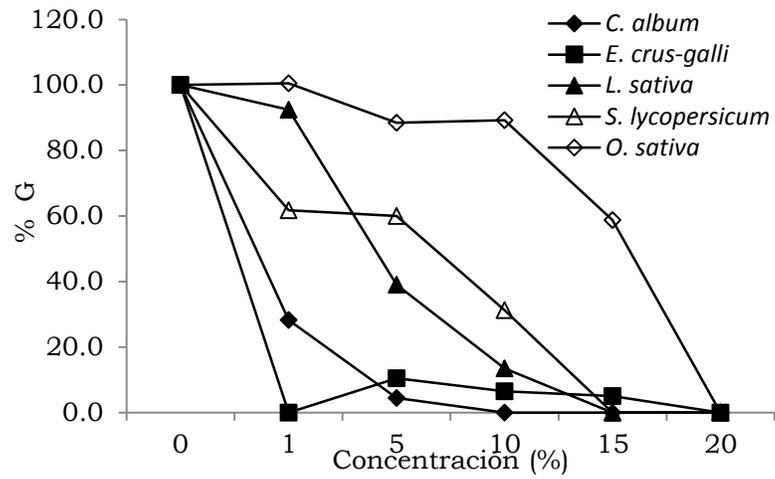


Figura 1. Efecto del extracto metanólico *D. amoena* sobre el porcentaje de germinación de cinco especies vegetales.

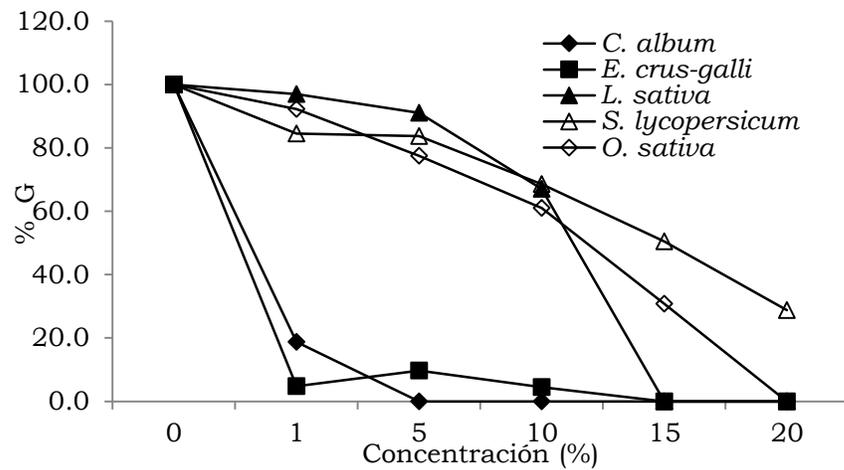


Figura 2. Efecto del extracto metanólico crudo de *N. oleander* sobre el porcentaje de germinación de cinco especies vegetales.

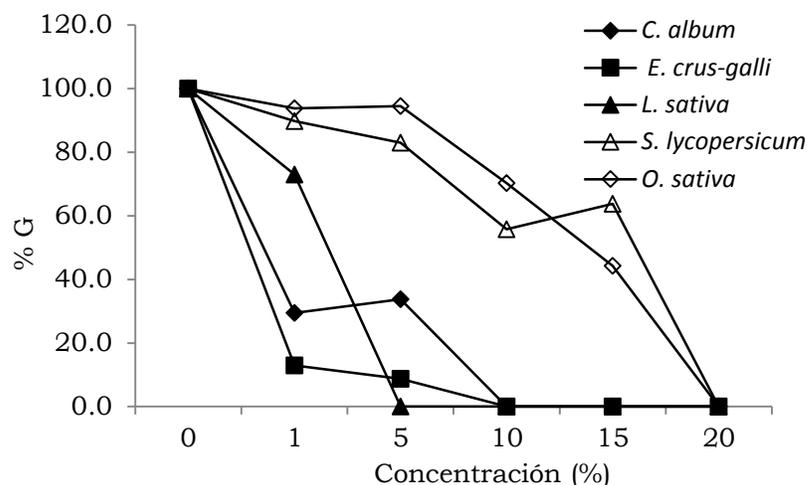


Figura 3. Efecto del extracto metanólico crudo de *R. sativus* sobre el porcentaje de germinación de cinco especies vegetales.

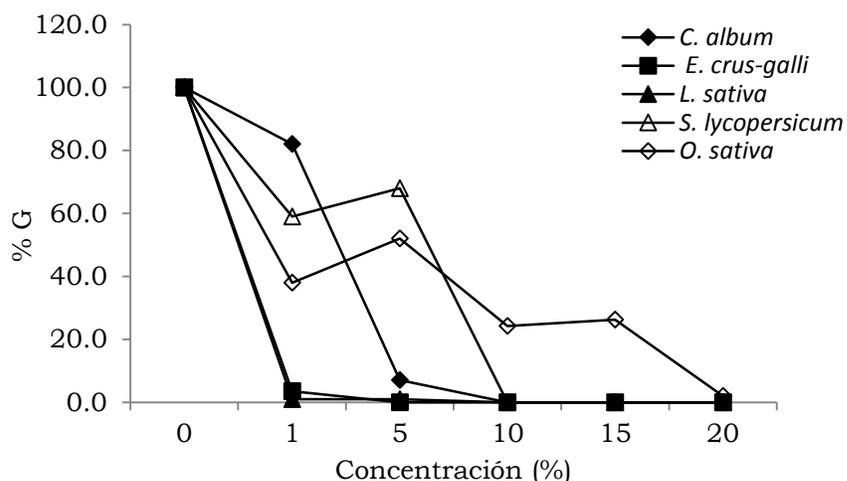


Figura 4. Efecto del extracto metanólico crudo de *B. napobrassica* sobre el porcentaje de germinación de cinco especies vegetales.

Fitotoxicidad en la LR y LPA

Los extractos de algunas especies solamente ocasionan inhibición de la LR y LPA, pero otros mostraron inhibición y estimulación en algunas especies, por ejemplo, los extractos metanólicos de *D. amoena*, *N. oleander* y *B. napobrassica* mostraron inhibición-estimulación del crecimiento de la radícula (LR) en diferentes concentraciones, en *O. sativa* con el extracto de *D. amoena* y en *S. lycopersicum* (*D. amoena*, *N. oleander* y *B. napobrassica*) (Figuras 5-8). El

extracto metanólico de *R. sativus* fue el que afectó en mayor grado el crecimiento de la LR de la mayoría de las plántulas desde las concentraciones menores. Finalmente, los extractos de *D. amoena*, *N. oleander* y *R. sativus* afectaron el crecimiento de la LPA de manera gradual hasta su inhibición total a la concentración más alta; sin embargo, el extracto metanólico de *B. napobrassica* fue el que mayor efecto negativo en el crecimiento de la LPA en la mayoría de las plántulas (Figuras 9 y 12).

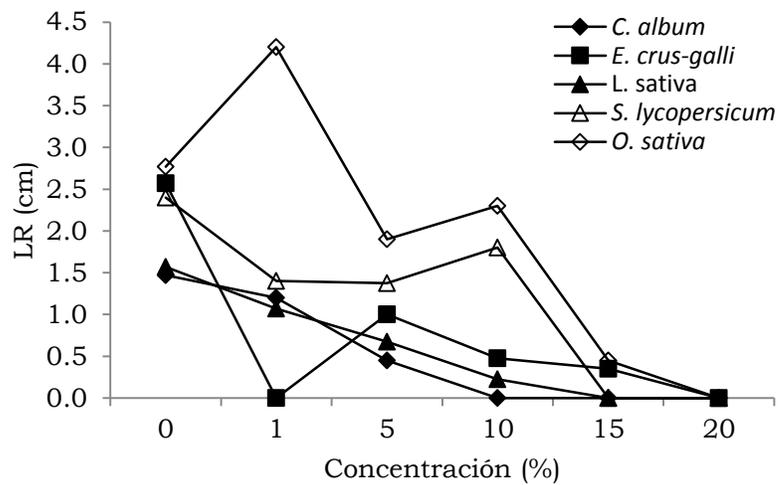


Figura 5. Efecto del extracto metanólico crudo de *D. amoena* en el crecimiento de la longitud de la raíz (LR) de cinco especies vegetales.

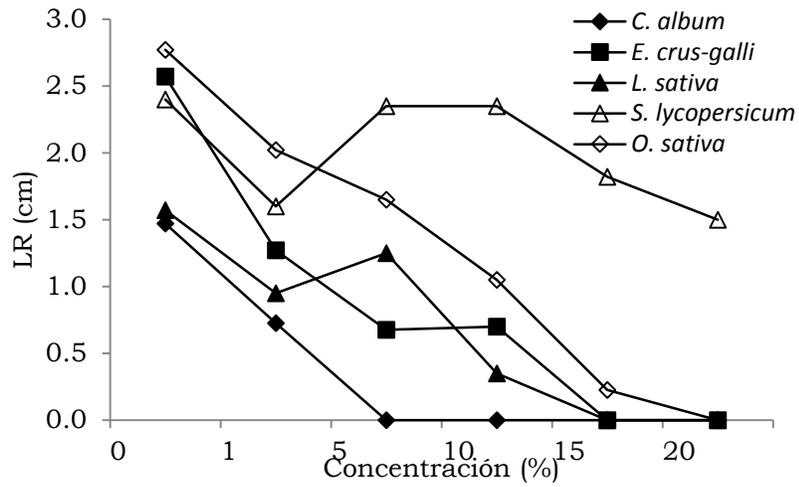


Figura 6. Efecto del extracto metanólico crudo de *N. oleander* en el crecimiento de la longitud de la raíz (LR) de cinco especies vegetales.

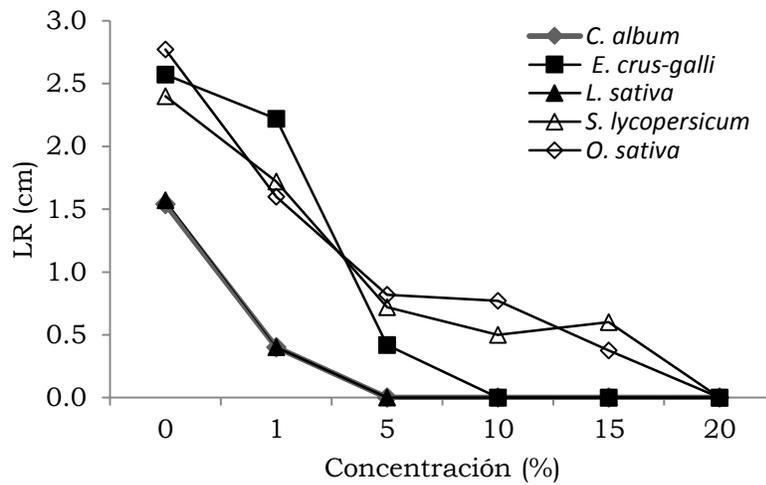


Figura 7. Efecto del extracto metanólico crudo de *R. sativus* en el crecimiento de la longitud de la raíz (LR) de cinco especies vegetales.

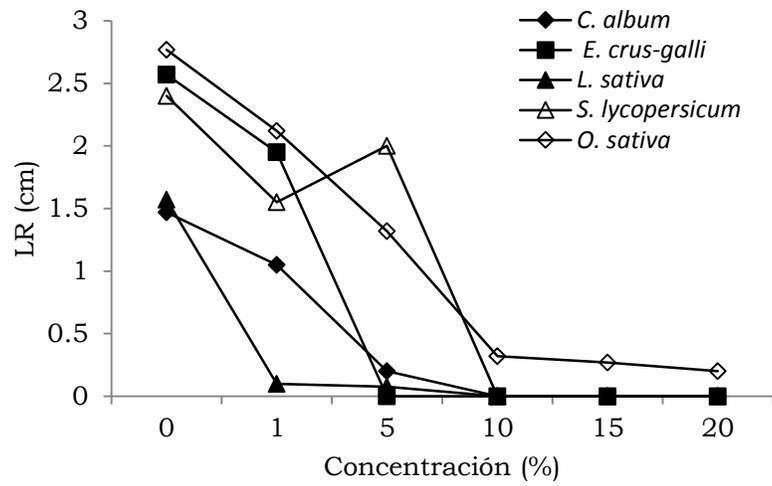


Figura 8. Efecto del extracto metanólico crudo de *B. napobrassica* en el crecimiento de la longitud de la raíz (LR) de cinco especies vegetales.

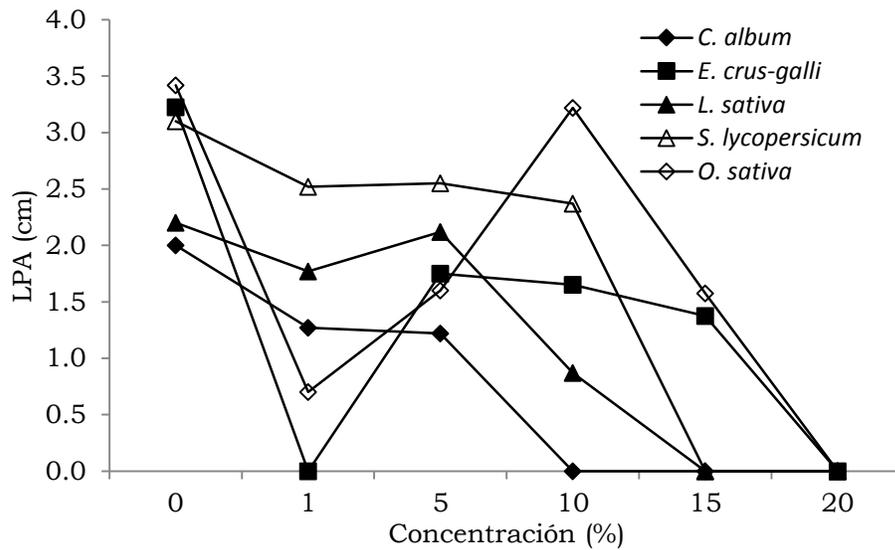


Figura 9. Efecto del extracto metanólico crudo de *D. amoena* en el crecimiento de la longitud de la parte aérea (LPA) de cinco especies vegetales.

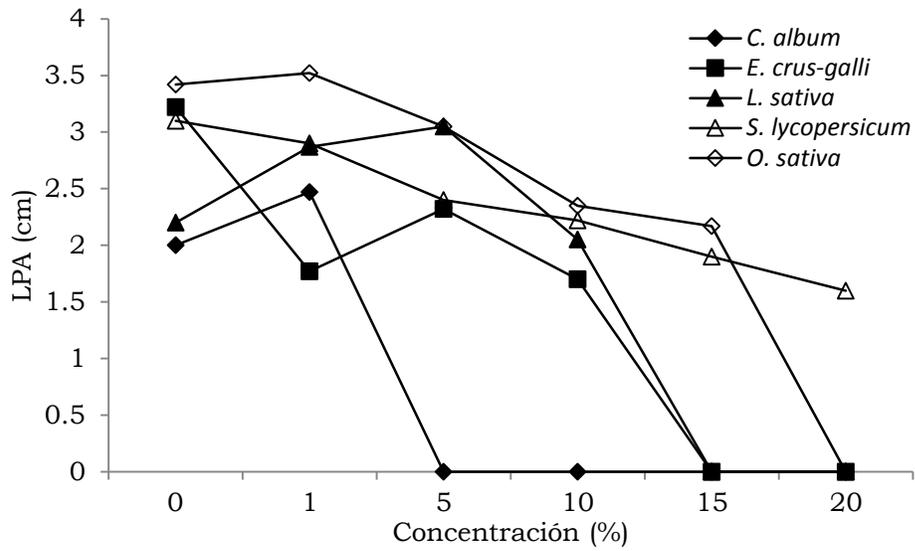


Figura 10. Efecto del extracto metanólico crudo de *N. oleander* en el crecimiento de la longitud de la parte aérea (LPA) de cinco especies vegetales.

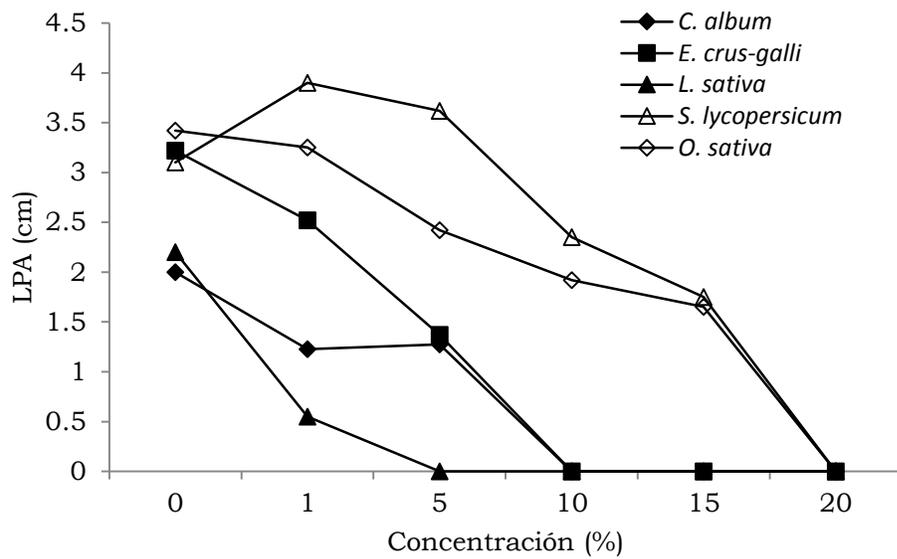


Figura 11. Efecto del extracto metanólico crudo de *R. sativus* en el crecimiento de la longitud de la parte aérea (LPA) de cinco especies vegetales.

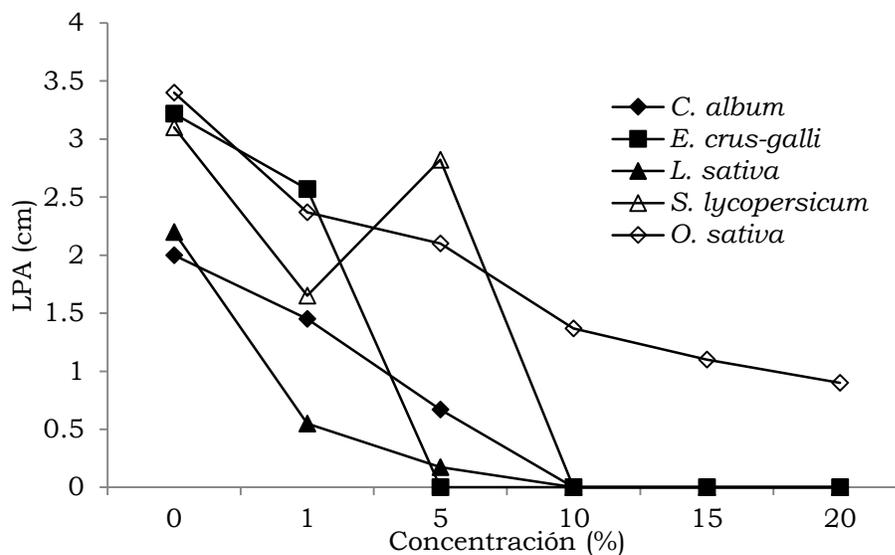


Figura 12. Efecto del extracto metanólico crudo de *B. napobrassica* en el crecimiento de la longitud de la parte aérea (LPA) de cinco especies vegetales.

Análisis fitoquímico. Por cromatografía en capa fina (CCF) se identificó la presencia de glucosinolatos en los extractos de *B. napobrassica* y de *R. sativus* (*Brassicaceae*), de terpenoides en el extracto de *D. amoena* y de alcaloides y terpenoides en el extracto metanólico crudo de hoja de *N. oleander* (Cuadro 3).

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

| Especie | Familia | Tipo de metabolito | | | | Referencias |
|------------------------|---------------------|--------------------|-----|-----|------|---|
| | | Al | Fla | Ter | Gluc | |
| <i>D. amoena</i> | <i>Araceae</i> | - | - | + | - | Glucoalcaloides y sapogeninas (Hunter y Becerra, 1974) |
| <i>N. oleander</i> | <i>Apocynaceae</i> | + | - | + | - | Triterpenos (Santhi <i>et al.</i> , 2011), Alcaloides (Santhi <i>et al.</i> , 2011) |
| <i>R. sativus</i> | <i>Brassicaceae</i> | - | - | - | + | Glucosinolatos (Uludag <i>et al.</i> , 2006) |
| <i>B. napobrassica</i> | <i>Brassicaceae</i> | - | - | - | + | Glucosinolatos (Sonderby <i>et al.</i> , 2010) |

(-) Ausencia; (+) Presencia; Al = Alcaloides; Fla = Flavonoides; Ter = Terpenoides; Gluc = Glucosinolatos

DISCUSIÓN

En el presente estudio se observó que el extracto de *N. oleander* aunque mostró baja toxicidad en comparación con los extractos restantes, afectó drásticamente la germinación de *C. album* y *E. crus-galli*, así como la LR principalmente de *E. crus-galli* (Figuras 2 y 6). Santhi *et al.* (2011) reportan que los extractos acuosos de *N. oleander* inhiben de la germinación de cinco especies de malezas. Asimismo, Uludag *et al.* (2006) encuentran el mismo efecto de los extractos acuosos de *N. oleander* a diferentes concentraciones en *L. sativa*, efectos que se podrían explicar por la mayor polaridad del disolvente de extracción, por lo tanto, diferente composición química del mismo.

Los extractos de *R. sativus* y *B. napobrassica* tuvieron efectos de estimulación e inhibición del porcentaje de G a diferentes concentraciones en algunas especies de semillas (*S. lycopersicum* y *O. sativa*). Uludag *et al.* (2006) reportan que extractos acuosos de *R. sativus* solamente causan inhibición en *Alopecurus myosuroides*, *Amaranthus retroflexus*, *Digitaria sanguinalis*, *Portulaca oleraceae*, *Prosopis stephaniana* y *Raphanus raphanistrum*. Al respecto, se ha reportado que extractos de algunas especies vegetales a bajas concentraciones presentan efectos de estimulación por la presencia de algunos tipos de metabolitos (alcaloides y terpenoides) (García-Mateos *et al.*, 2010; Qasem *et al.*, 2002), y a concentraciones mayores se observa el efecto opuesto. Algunos aleloquímicos presentes en extractos pueden estimular la germinación de algunas especies a concentraciones menores (Anaya, 2003), pero a concentraciones más elevadas pueden llegar a ser fitotóxicos con acción inhibidora o herbicida (Qasem *et al.*, 2002).

Hoffmann *et al.* (2007) refieren que los extractos de *Dieffenbachia picta* estimulan de la germinación en las semillas de *L. sativa* a la concentración más baja (0.0625 mg mL⁻¹) debido a la presencia de saponinas. Un efecto similar se encontró en *C. secundiflora* por García-Mateos *et al.* (2011) al estudiar el efecto de la fitotoxicidad de la especie en *Ipomoea purpurea*. Xuan *et al.* (2004) consignan que el extracto acuoso de *Azadirachta indica* a la concentración de 0.05 mg mL⁻¹ estimula la germinación de las semillas y el crecimiento de los brotes de *O. sativa*.

Los extractos metanólicos de *R. sativus* y *B. napobrassica* provocaron inhibición de la LR y LPA. Al respecto, Moyer y Huang (1997) señalan que el extracto acuoso de *B. napobrassica* es uno de los más efectivos en la inhibición del crecimiento de las raíces de *Kochia arenaria* a la concentración de 1 %; mientras que Uludag *et al.* (2006) indican que varias especies (*Brassica napobrassica*, *Brassica campestris* subsp. *rapa* y *Raphanus sativus*) de la familia *Brassicaceae* causan estimulación en *S. halepense*.

Los resultados mostraron que los extractos metanólicos crudos de *R. sativus* y *B. napobrassica* afectaron la raíz de la mayoría de las especies, lo cual permitió asumir que fue la parte más sensible en comparación con los hipocotilos y coleoptilos de las dicotiledóneas y monocotiledóneas, respectivamente. Estos daños se caracterizaron por raíces primarias raquílicas o ausentes, atrofiadas o ahiladas, hipocotilos o coleoptilos cortos, gruesos o deformados. Lo anterior concuerda con lo reportado por Gatti *et al.* (2008) quienes señalan que la presencia de anomalías en las raíces ocurre con mayor frecuencia debido a que estos órganos son más susceptibles a la acción de los aleloquímicos, que

las partes aéreas de la planta. García-Mateos *et al.* (2011) mencionan que plántulas anormales por daños en la LR y LPA no podrán sobrevivir en condiciones de campo abierto. Para los fines de este trabajo una planta anormal (ISTA, 2014) es aquella que no presenta capacidad para desarrollarse aunque crezca en condiciones favorables.

Hoffmann *et al.* (2007) señalan que algunos extractos acuosos disminuyen la velocidad de desplazamiento y translocación de los componentes nutritivos desde la radícula, así como en el hipocotilo de algunas especies de semillas (*L. sativa* y *Bidens pilosa*), afectando la movilización de las reservas de alimentos; en el presente estudio los extractos fueron de polaridad semejante a los acuosos, lo que podría explicar los daños observados en la radícula.

Las diferencias observadas en las variables porcentaje de G, LR y LPA en las todas las especies de semillas por los diferentes extractos metanólicos podría deberse a: a) diferente composición de los extractos de cada especie vegetal; b) presencia únicamente de metabolitos polares por el disolvente de extracción (metanol) (Prichoa *et al.*, 2013); c) a un efecto sinérgico de los diversos componentes del extracto (García-Mateos *et al.*, 2010; d) al mecanismo de acción de cada tipo de metabolito presente en el extracto (Prichoa *et al.*, 2013); y e) respuesta diferencial de cada especie de semilla (Qasem *et al.*, 2002).

En cuanto al análisis fitoquímico, en el presente trabajo el extracto metanólico crudo de *D. amoena* presentó terpenoides; al respecto, existen pocos estudios de la naturaleza de los fitoquímicos presentes en *D. amoena* que expliquen su toxicidad. Hunter y Becerra (1974) identificaron en extractos acuosos de *D. amoena* la presencia de glucoalcaloides esteroidales y sapogeninas esteroidales.

Por otra parte, Briemann *et al.* (2006) mencionan que algunos tipos de terpenoides inhiben el crecimiento de malezas en suelo (alelopatía), por lo que la presencia de estos compuestos podría explicar el efecto fitotóxico observados en el porcentaje de G, LR y LPA, principalmente en *E. crus-galli*.

En el extracto metanólico crudo de *N. oleander* se identificó la presencia de alcaloides y de terpenoides. Santhi *et al.* (2011) señalan la presencia de glicósidos cardiotónicos, alcaloides y triterpenoides. Hoffmann *et al.* (2007) afirman que la germinación se puede ver afectada negativamente por la presencia de saponinas en los extractos de *N. oleander* debido a que estos metabolitos parecen actuar como inhibidores de diversas reacciones enzimáticas en algunas especies de semilla. Así mismo, García-Mateos *et al.* (2010) mencionan que las concentraciones de algunos alcaloides en plantas pueden influir estimulando el crecimiento en ciertas especies de dicotiledóneas, como reguladores de crecimiento, lo que explica en parte el efecto de estimulación observado en la LR y LPA de algunas semillas por el extracto de *N. oleander* del presente estudio.

Los extractos metanólicos crudos de *B. napobrassica* y de *R. sativus* (*Brassicaceae*) mostraron la presencia de glucosinolatos, pero la primera presentó mayor fitotoxicidad al afectar el porcentaje de germinación, principalmente de *E. crus-galli*, *L. sativa*, *S. lycopersicum* y *O. sativa*, y ambos extractos afectaron el vigor de las plántulas (LR y LPA) de la mayoría de las especies de semillas (Cuadro 2). Auger y Thibout (2004) señalan la diversa actividad biológica de glucosinolatos y otros compuestos azufrados (insecticida, herbicida, fungicida y bactericida), lo cual podría explicar los efectos fitotóxicos

encontrados en el presente trabajo. Este tipo de metabolitos también presentan actividad alelopática (Sonderby *et al.*, 2010; Uludag *et al.*, 2006) porque afectan la germinación y el crecimiento de especies cultivadas (Soltys *et al.*, 2013) y de algunas malezas en su habitat. Aunque el efecto fitotóxico observado en *R. sativus* y *B. napobrassica* podría deberse también a la naturaleza de otros compuestos activos no identificados en los extractos. Auger y Thibout (2004) reportan que las plantas de la familia *Brassicaceae* presentan actividad herbicida por la presencia de sustancias azufradas (glucosinolatos).

CONCLUSIONES

La actividad biológica de fitotoxicidad de extractos metanólicos fue diferencial según la especie, aunque una de ellas de la familia *Brassicaceae* produjo la mayor fitotoxicidad a nivel de germinación y de plántula. Algunas especies objetivo respondieron a los extractos vegetales estimulando la germinación y el crecimiento de plántulas. Los glucosinolatos se asociaron en las especies cuyo extracto tuvieron el máximo efecto fitotóxico.

LITERATURA CITADA

- Anaya L., A. L. 2003. Alelopatía. *In*: Ecología Química. Anaya, A. L. (ed.). México, Plaza y Valdés. pp. 255-298.
- Auger, J. y E. Thibout. 2004. Sustancias azufradas de los *Allium* y de las crucíferas: potencial fitosanitario. *In*: Biopesticidas de Origen Vegetal. Regnault-Roger, C., B. J. Philogene R. y C. Vincent (eds.). Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 77-92.
- Benyas, E., M. Hassanpouraghdam B., S. Zehtabsalmasi and O. Khatamian-Oskooei S. 2010. Allelopathic effects of *Xanthium strumarium* L. shoot aqueous extract on germination, seedling growth and chlorophyll content of lentil (*Lens culinaris* Medic.). *Romain Biotechnological Letters* 15: 5223-5228.
- Briemann H., L., W. Setzer N., P. Kaufman B., A. Kirakosyan and L. Cseke J. 2006. Phytochemicals: The chemical components of plants. *In*: Cseke L., J., A. Kirakosyan, P. Kaufman B., S. Warber L., J. Duke A. and H. Briemann L. (eds.). *Natural Products from Plants*. CRC-Press. Boca Raton, FL. EEUU. pp. 1-49.
- García-Mateos, M. R., D. Pérez-Láinez, M. Soto-Hernández, J. E. Rodríguez-Pérez and G. Kite. 2010. Phytotoxic activity of *Calia secundiflora* (Ortega) Yakovlev. *Allelopathy Journal* 26: 23-34.
- García-Mateos, M. R., A. M. Castillo, J. M. Zárate-Hernández, y R. M. Barrón-Yáñez. 2011. Extractos de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev con potencial actividad fitotóxica. *Interciencia* 36: 779-784.

- Gatti, A. B., M. I. Lima S. and S. C. J. Pérez G. A. 2008. Allelopathic potential of *Ocotea odorífera* (Vell) Rohwer on the germination and growth of *Lactuca sativa* L. and *Raphanus sativus* L. *Allelopathy Journal* 21: 73-82.
- Hoffmann F., C. E., L. A. Salles das Neves, C. Freitas-Bastos e G. Luz-Wallau. 2007. Atividade alelopática de *Nerium oleander* L. e *Dieffenbachia picta* Schott em sementes de *Lactuca sativa* L. e *Bidens pilosa* L. *Revista de Ciências Agroveterinárias* 6: 11-21
- Hunter, Z. E. y C. Becerra V. 1976. Estudios químicos y aspectos farmalógicos de un anticonceptivo vegetal. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmaceuticas* 2: 5-35.
- ISTA. 2014. Certificates. International Rules for Seed Testing. The International Seed Testing Association. Bassesdorf, Switzerland. pp. 1-12.
- Moyer J., R. and H. Huang C. 1997. Effect of aqueous extracts of crop residues on germination and seedling growth of ten weed species. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 38: 131-139.
- Prichoa, F. C., G. Leyser, J. Vladimir-Oliveira, and R. Cansian L. 2013. Comparative allelopathic effects of *Cryptocarya moschata* and *Ocotea odorífera* aqueous extracts on *Lactuca sativa*. *Acta Scientiarum. Agronomy* 35: 197-202.
- Qasem, J. R. 2002. Plants as sources of natural herbicides against branched broomrape (*Orobanche ramosa* L.). *In: Allelopathy from Molecules to Ecosystems*. Reigosa, M. J. and N. Pedrol (eds.). Enfield (NH), EEUU. pp. 153-182.

- Santhi, R., G. Lakshami, A. Priyadarshini M. and L. Anandraj. 2011. Phytochemical screening of *Nerium oleander* leaves and *Momordica charantia* leaves. International Research Journal of Pharmacy 2: 131-135.
- Soltys, D., U. Krasusk, R. Bogatek and A. Gniazdowska. 2013. Allelochemicals as Bioherbicides – Present and Perspectives. *In: Herbicides - Current Research and Case Studies in Use*. Price, A. J. and J. Kelton A. (eds.). Wydawnictwo InTech, Chorwacja. pp. 517-542.
- Sonderby, I. E., F. Geu-Flores, and B. Halkier A. 2010. Biosynthesis of glucosinolates – genes discovery and beyond. Trends in Plant Science 15: 283-290.
- Uludag, A., I. Uremis, M. Arslan and D. Gozcu. 2006. Allelopathy studies in weed science in Turkey-a review. Journal of Plant Diseases and Protection 20: 419-426.
- Wagner, H. and S. Blatt. 1996. Plant Drug Analysis: A thin Layer Chromatography Atlas. Springer. Berlin, Alemania. 383 p.
- Xuan, T. D., T. Eiji, T. Hiroyuki, M. Mitsuhiro, T. Khanh D. and I. Chung M. 2004. Evaluation on phytotoxicity of neem (*Azadirachta indica*. A. Juss) to crops and weeds. Crop Protection 23: 335-345.

CAPÍTULO IV

EVALUACIÓN DE EXTRACTOS DE CUATRO ESPECIES VEGETALES CONTRA CENICILLA (*Sphaerotheca fuliginea*) EN PLÁNTULAS DE PEPINO BAJO INVERNADERO

RESUMEN

Este estudio se realizó bajo invernadero en el municipio de Texcoco, estado de México con el objetivo de evaluar la actividad biológica de los extractos de *Tulbaghia violacea*, *Raphanus sativus*, *Brassica napobrassica* y *Dieffenbachia amoena* contra *Sphaerotheca fuliginea* inoculadas en plántulas de pepino. Los extractos metanólicos crudos de estas especies vegetales se obtuvieron mediante equipo Soxhlet durante 48 h, y se concentró a presión reducida en un rotaevaporador; la identificación de los metabolitos se realizó mediante cromatografía en capa fina. Cinco diluciones (1, 2.5, 5.0, 7.5 y 10 %) de cada uno de los extractos se evaluaron semanalmente a las plantas aplicándolos por aspersión. Las variables evaluadas fueron severidad de daño por *S. fuliginea*, efectividad biológica del extracto contra el fitopatógeno y fitotoxicidad. Para el procesamiento de los datos se realizó análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$). El extracto de *T. violacea* (que contenía flavonoides) mostró la menor severidad de daño (61 %), la mayor efectividad biológica (32.8 %) y sin daños por fitotoxicidad. Comparativamente en los extractos de *R. sativus* (glucosinolatos), *D. amoena* (alcaloides) y *B. napobrassica* (glucosinolatos) los cuales ocasionaron mayor severidad de daño (66.5, 73.7 y 75.3 %, respectivamente), menor efectividad biológica (26.7, 19.5, 17.6 %, respectivamente) y solamente el extracto de *B. napobrassica* provocó síntomas de fitotoxicidad.

Palabras clave: efectividad biológica, fitotoxicidad, severidad

EVALUATION OF FOUR PLANT EXTRACTS AGAINST POWDERY MILDEW (*Sphaerotheca fuliginea*) IN CUCUMBER SEEDLINGS UNDER GREENHOUSE

ABSTRACT

This study was conducted under greenhouse conditions in Texcoco, Mexico State in order to evaluate the biological activity of extracts of *Tulbaghia violacea*, *Raphanus sativus*, *Brassica napobrassica* and *Dieffenbachia amoena* against *Sphaerotheca fuliginea* on cucumber seedlings inoculated. The crude methanolic extracts were obtained using a Soxhlet device for 48 h and concentrated under reduced pressure in a rotary evaporator; identification of the metabolites was performed by thin layer chromatography. Five dilutions (1, 2.5, 5.0, 7.5 and 10 %) of each of the extracts were evaluated and the plants were treated weekly with sprayings. The variables evaluated were severity of damage by *S. fuliginea*, biological effectiveness of the extract against the phytopathogen and phytotoxicity. Analysis of variance and Tukey's comparison of means test ($P \leq 0.05$) were performed. The extract of *T. violacea* (containing flavonoids) showed the least severity of damage (61 %) and the most biological effectiveness (32.8 %) and without damage by phytotoxicity. Comparatively in extracts of *R. sativus* (glucosinolates), *D. amoena* (alkaloids) and *B. napobrassica* (glucosinolates) had higher severity of damage (66.5, 73.7 and 75.3 %, respectively), less biological effectiveness (26.7, 19.5 and 17.6 %, respectively) and only extract of *B. napobrassica* caused phytotoxicity symptoms.

Keywords: biological effectiveness, phytotoxicity, severity.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades en los cultivos provocan pérdidas en el rendimiento de los mismos y cada vez son más importantes conforme aumenta la población humana (Savary *et al.*, 2012). Los hongos son la causa principal de enfermedades de las plantas, ya que son los parásitos más comunes y destructivos, los cuales conducen a cambios en las etapas de desarrollo y causan problemas en la calidad y el valor nutritivo de los productos (Agrios, 2004). Aquí se presenta el caso de las cenicillas que en cucurbitáceas, las más conocidas son: *Leveillula taurica*, *Erysiphe communis*, *Erysiphe polygoni*, *Erysiphe polyphaga*, *Erysiphe cichoracearum* y *Sphaerotheca fuliginea*; las dos últimas son causantes del mayor daño a cultivos de melón y pepino (Delgado y Lemus, 2004). Chávez-Solís *et al.* (2013) señalan que *E. cichoracearum* y *S. fuliginea* ocasionan cuantiosas pérdidas agrícolas alcanzando índices de 50 %.

Una vez iniciada la infección por *S. fuliginea*, el micelio se propaga sobre la hoja sin importar las condiciones de humedad atmosférica (Chávez-Solís *et al.*, 2013). La cenicilla ocasiona infección severa en el cultivo en solo una semana (Chew y Cano, 2005). No obstante que *S. fuliginea* es un importante patógeno de impacto económico negativo, no se tiene mucho conocimiento sobre su biología, epidemiología y manejo.

Considerando la seguridad alimentaria y la protección al ambiente, se han desarrollado nuevas estrategias de control de enfermedades (Adebayo *et al.*, 2013); las plantas son una fuente valiosa de productos naturales, algunos de estos metabolitos presentan propiedades antimicrobianas (Pandey *et al.*, 2014).

Esta alternativa se basa en el hecho de que las plantas elaboran metabolitos secundarios como defensa al ataque de patógenos (Guerrero *et al.*, 2007; Coetzee *et al.*, 2008).

Estudios sobre extractos de plantas y aceites vegetales se han realizado para el control de *S. fuliginea*, como neem (*Azadirachta indica*) (Tohamy *et al.*, 2002), extracto de *Reynoutria sachalinensis* (Steck y Schneider, 1993; Dik y Staay, 1994; Daayf *et al.*, 1997; Konstantinidou-Doltsinis *et al.*, 1998; Wurms *et al.*, 1999), genjibre (*Zingiber officinale*) (Singh *et al.*, 1991), ajo (*Allium sativum*) (Reimers *et al.*, 1993), cebolla (*Allium cepa*) (Hano *et al.*, 1993), aceite de clavo (*Syzygium aromaticum*) (Volf and Steinhauer, 1997), falsa acacia (*Robinia pseudoacacia*) (Zhanga *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010), quillay (*Quillaja saponaria*) (Apablaza *et al.*, 2002). En el presente trabajo se seleccionaron las especies *Tulbaghia violacea* (*Amaryllidaceae*), *Raphanus sativus* (*Brassicaceae*), *Brassica napobrassica* (*Brassicaceae*) y *Dieffenbachia amoena* (*Araceae*), que en estudios previos presentaron la mayor actividad antifúngica *in vitro* en *C. gloeosporioides* (fue el caso de *T. violacea*, Capítulo II) y actividad fitotóxica en la germinación de semillas de *C. album*, *E. crus-galli*, *L. sativa*, *S. lycopersicum* y *O. sativa* (fueron los casos de *R. sativus* y *B. napobrassica*, Capítulo III). La presencia de compuestos azufrados y flavonoides se reporta en *T. violacea* (Auger y Thibout, 2004; Jäger y Stafford, 2012; Aremu *et al.*, 2014) en *R. sativus* y *B. napobrassica*, glucosinolatos (Uludag *et al.*, 2006; Sonderby *et al.*, 2010); y en *D. amoena* glucoalcaloides y sapogeninas (Hunter y Becerra, 1974). Los antecedentes muestran que extractos de *T. violacea*, *B. napobrassica*, *R. sativus* y *D. amoena* no han sido evaluados en su efecto biológico contra *S. fuliginea*

inoculada en plántulas de pepino. Con base en lo anterior, el objetivo del trabajo fue evaluar la severidad del daño y la efectividad (% de control) de los extractos de *T. violacea*, *R. sativus*, *B. napobrassica* y *D. amoena* contra *S. fugilinea* en plántulas de pepino en condiciones de invernadero, así como su posible fitotoxicidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección del material vegetal. En forma aleatoria se recolectaron muestras de cuatro especies de plantas para su identificación taxonómica y preparación de los extractos de *Dieffenbachia amoena* Bull., *Tulbaghia violacea* Harv., *Raphanus sativus* L. y *Brassica napobrassica* (L.) Mill., libres de plagas, enfermedades y daños físicos. *Dieffenbachia amoena* (amoena) se recolectó de campo abierto, en etapa vegetativa, durante el mes de septiembre de 2014; *T. violacea* (ajillo) se obtuvo de campo abierto, en etapa de floración, en el mes de septiembre de 2014; *R. sativus* (rábano blanco) se consiguió en una parcela a orilla de río, en el mes de agosto de 2014; *B. napobrassica* se tomó en etapa de floración a orilla de carretera en el mes de octubre del mismo año. Las muestras se trasladaron en hielera al laboratorio de Fitoquímica de Preparatoria Agrícola para su secado, molienda y preparación de extractos. Para la certificación taxonómica se prepararon dos ejemplares de herbario por especie y se depositaron en el Herbario-Hortorio “Jorge Espinoza Salas” de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. El origen geográfico de las muestras, la parte de la planta recolectada y el número de registro (voucher) de las plantas en el herbario se indican en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Características geográficas de los sitios de colecta, tipo de tejido y número de registro de las cuatro especies de estudio.

| Especie | Familia | Lugar de recolecta | Ubicación | Tejido | Número de registro* |
|------------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|----------------|---------------------|
| <i>D. amoena</i> | <i>Araceae</i> | Hueyapan de Ocampo, Ver. | 18° 09' LN y 95° 09' LO | Tallo Hoja | 313013 |
| <i>T. violacea</i> | <i>Amaryllidaceae</i> | Cuautla, Mor. | 18°49' LN y 99° 01' LO | Toda la planta | 313012 |
| <i>R. sativus</i> | <i>Brassicaceae</i> | Mixquiahuala, Hgo. | 20°13' LN y 99° 12' LO | Raíz | 313017 |
| <i>B. napobrassica</i> | <i>Brassicaceae</i> | Tlatlauquitepec, Pue. | 19° 51' LN y 97° 29' LO | Toda la planta | 313011 |

* Herbario - Hortorio "Jorge Espinoza Salas" de Preparatoria Agrícola de la UACH.

Preparación del extracto crudo. El material vegetal de cada especie que correspondió al tejido recolectado (Cuadro 1), se secó en una estufa (Fanem LTDA) a temperatura constante ($50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 48 h. El extracto metanólico crudo de cada especie molida se obtuvo mediante un equipo Soxhlet durante 48 h. Posteriormente, el extracto se concentró a presión reducida en un rotaevaporador (Büchi® R-210). Por dilución seriada se prepararon diferentes concentraciones (1.0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10.0 % v/v) para las pruebas de efectividad biológica.

Análisis fitoquímico. Por cromatografía en capa fina de gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck) se identificó cualitativamente la presencia de alcaloides, flavonoides, terpenoides y glucosinolatos en los extractos metanólicos crudos de cada especie (Wagner y Bladt, 1996).

Obtención de plantulas de pepino. Semillas de pepino (*Cucumis sativus* L.), variedad Turbo 80 % + Conquistador 20 % de la marca Seminis®, se les germinó

en charolas de almacigo agrícola de poliestireno de 200 cavidades, con sustrato Peat - Moss®. Los riegos se aplicaron con agua sin fertilizante cada 24 h.

Los conidios de *S. fuliginea* se obtuvieron de plantas de un invernadero local; de las plantas enfermas se realizó un raspado y se colocaron los conidios en agua destilada, se procedió a su identificación (Boesewinkel, 1980) y con la ayuda de un hematocitómetro (marca BOECO) se ajustó la suspensión a 3×10^4 conidios ml^{-1} . Cuando germinó el 90 % de las semillas y las plántulas presentaron tres hojas, se asperjó la suspensión de manera uniforme con un atomizador manual.

Identificación del hongo. Para la identificación del hongo se procedió a fijar los conidios en un portaobjetos y se tiñeron con lactofenol. Para observar características conidiales se utilizó un microscopio compuesto (Olympus CX31) (Boesewinkel, 1980).

Tratamientos. En etapa de plántula (21 días después de la emergencia) infectadas en condiciones de invernadero se evaluó el efecto de las cinco concentraciones (1.0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10.0 %) de los cuatro extractos (*R. sativus*, *B. napobrassica*, *T. violacea* y *D. amoena*) y un testigo sin producto (agua destilada). Cada tratamiento comprendió un extracto por planta con 10 repeticiones. El diseño fue establecido al azar. Todos los tratamientos, se diluyeron con agua destilada, añadiéndose 0.05 % de Tween 80 como agente dispersante (Pérez-Ángel *et al.*, 2010).

Aplicación de los extractos. Los extractos se aplicaron al mismo tiempo que aparecieron los primeros síntomas, se utilizó un atomizador manual, agitando vigorosamente la mezcla antes de aplicarse y rociando la superficie superior de

las hojas hasta cubrirlas totalmente con el producto. Tres aplicaciones de aspersión se ejecutaron a intervalos de una semana entre ellas (Pérez-Ángel *et al.*, 2010). La temperatura promedio en el invernadero fue 25 °C, con una humedad relativa de 72 %.

Evaluación de la enfermedad. El índice de daño en plántulas se evaluó cuando éstas presentaron seis hojas. Los tratamientos se asignaron al azar. Para la evaluación del índice de daño por el hongo se utilizó una escala de referencia propuesta por Fujiwara y Fujii (2002) con valores de 0 - 4, donde 0 = no daño, 1 = menos de 5 %, 2 = 5 – 25 %, 3 = 26 – 50 % y 4 ≥ 50 % de la superficie dañada de la hoja. Los índices de daño de cada hoja se convirtieron a severidad por planta de acuerdo con la fórmula siguiente: $S = 100 (0 n_0 + 1 n_1 + 2 n_2 + 3 n_3 + 4 n_4) / 4 N$; donde S es la severidad de daño por planta, 0 - 4 son las escalas de daño (Fujiwara y Fujii, 2002), n_0 a n_4 son el número de hojas con el correspondiente valor 0 - 4, N es el número de hojas total evaluadas por planta. La severidad se evaluó durante tres semanas, inmediatamente antes de cada aplicación. Los resultados se transformaron en porcentaje de control o efectividad biológica, lo cual se calculó de acuerdo con la fórmula propuesta por Fujiwara y Fujii, 2002: $E = 100 (Stes - Strat) / Stes$; donde E, es el porcentaje de control o efectividad biológica, Stes, es el valor promedio de severidad de daño del testigo y Strat, es el valor promedio de severidad de daño del tratamiento correspondiente.

Fitotoxicidad del cultivo. El tipo de daño en el pepino se evaluó mediante una escala de puntuación subjetiva propuesta por EPPO (1987), donde 1 = sin daño; 2 = síntomas muy ligeros; 3 = síntomas ligeros; 4 = síntomas que no se reflejaron

en rendimiento; 5 = daño medio; 6= daños elevados; 7= daños muy elevados; 8 = daños severos; 9= muerte completa. El porcentaje de plantas con clorosis, necrosis, disminución de crecimiento y malformaciones se determinó a los siete días después de la tercera aplicación.

Análisis Estadístico. Los resultados de severidad de daño y efectividad biológica por cenicilla para cada planta se sometieron a un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) mediante el programa Statistical Analysis System (SAS). Para el análisis de varianza se llevó a cabo la transformación de los datos, con el principio de manejarlos bajo una distribución normal. La transformación de Yates se llevó a cabo en Excel con la siguiente propuesta: $XT = \sqrt{\text{Arcoseno}(x/100)}$, donde: XT= Transformación de la variable, X= Variable respuesta expresada en porcentaje.

RESULTADOS

Los resultados del análisis de varianza mostraron diferencias significativas en el efecto de inhibición causado por los tratamientos (de variaciones individuales y de interacción) en la Severidad y Efectividad biológica (Cuadro 2).

Cuadro 2. Cuadrados medios del análisis de varianza de la Severidad y Efectividad biológica de los extractos crudos metanólicos de *T. violacea*, *R. sativus*, *B. napobrassica* y *D. amoena* contra *S. fuliginea*.

| F.V. | GL | Cuadrados Medios | |
|------------------------|-----|------------------|-----------|
| | | SEV | EB |
| Extracto | 4 | 18308.90** | 2167.33** |
| Concentración | 4 | 389.36** | 345.19** |
| Extracto*Concentración | 16 | 1703.85** | 2026.9** |
| Error | 725 | 12.87 | 19.00 |
| Total | 749 | | |
| C.V. | | 15.67 | 52.78 |

F.V.: Fuente de variación; GL: Grados de libertad; SEV: Severidad; EB: Efectividad Biológica; CV: Coeficiente de Variación; ** significativo ($P \leq 0.05$); NS: No significativo.

En la Figura 1 se muestra que el extracto de *T. violacea* mostró la mayor efectividad biológica (32.8 %) para controlar *S. fuliginea*, con respecto al testigo (90.3 %). En contraste, los extractos de *R. sativus*, *D. amoena* y *B. napobrassica* presentaron los menores porcentajes de efectividad biológica (26.7, 19.5 y 17.6 %, respectivamente). Con comitadamente al aumento de la efectividad biológica de los extractos, la severidad tuvo menor valor.

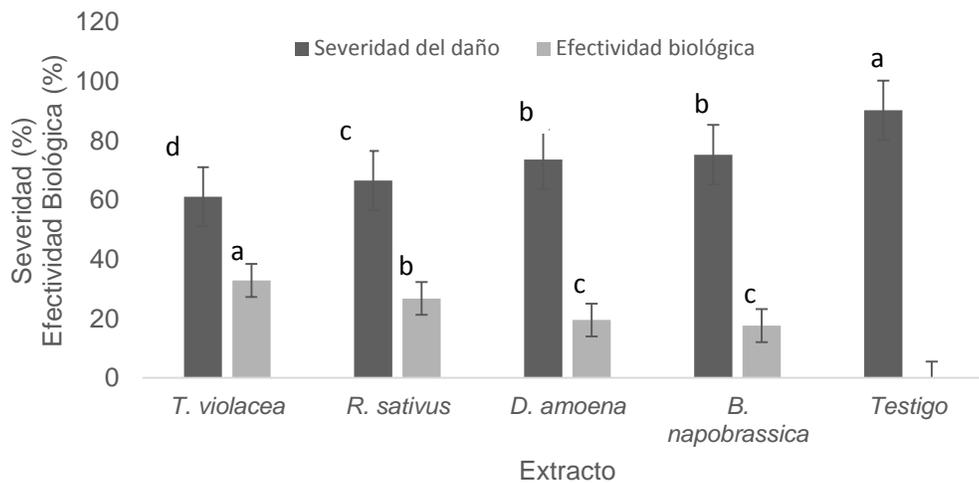


Figura 1. Efecto de los cuatro extractos en la severidad del daño y efectividad biológica en *S. fuliginea*. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales con base en la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

A partir de la concentración de 2.5 % del extracto metanólico crudo de *T. violacea* los niveles de severidad de daño y la efectividad biológica fueron las mismas (Cuadro 3).

Con respecto a la fitotoxicidad observada en las hojas de las plántulas (Cuadro 3), la mayoría de los extractos presentaron niveles inferiores (< 3) de acuerdo con la escala propuesta por EPPO (1987), excepto el extracto de *B. napobrassica*

que su concentración de 10 % alcanzó el nivel 5 de la escala y hubo fitotoxicidad por clorosis en las hojas, identificado como un daño medio.

Con relación a la tendencia de efecto de concentración según el extracto, *R. sativus* mostró a la menor concentración (1 %) mayor efectividad biológica y menor severidad; *B. napobrassica* mostró la mayor efectividad biológica y menor severidad a la concentración más alta (10 %); *D. amoena* no presentó diferencias estadísticas significativas en las concentraciones evaluadas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Severidad de daño (S), Efectividad biológica (E) y Fitotoxicidad como efecto de las concentraciones de los extractos aplicados contra cenicilla en hojas de pepino.

| Trat | Extractos | Conc (%) | S (%) | E (%) | Fitotoxicidad |
|------------------------|------------------------|------------------------|----------------------|----------|---------------|
| DMSH | <i>R. sativus</i> | 1 | 68.78 c ^t | 14.46 a | 1.31 d |
| | <i>R. sativus</i> | 2.5 | 76.28 b | 11.30 b | 1.61 c |
| | <i>R. sativus</i> | 5 | 77.67 b | 10.80 b | 1.91 b |
| | <i>R. sativus</i> | 7.5 | 84.75 c | 7.00 c | 1.85 cb |
| | <i>R. sativus</i> | 10 | 84.75 c | 6.91 c | 2.20 a |
| | Testigo | | 90.75 d | 00 d | 1.00 d |
| | | | 5.86 | 3.7 | 2.2 |
| | <i>B. napobrassica</i> | 1 | 81.97 ab | 9.96 b | 1.48 d |
| | <i>B. napobrassica</i> | 2.5 | 85.31 a | 6.68 b | 1.78 dc |
| | <i>B. napobrassica</i> | 5 | 84.34 a | 7.71 b | 2.11 c |
| | DMSH | <i>B. napobrassica</i> | 7.5 | 84.20 ab | 8.28 b |
| <i>B. napobrassica</i> | | 10 | 78.36 b | 13.91 a | 5.00 a |
| Testigo | | | 90.75 c | 00 c | 1.00 e |
| | | | 5.95 | 3.6 | 2.7 |
| <i>T. violacea</i> | | 1 | 79.54 a | 12.95 b | 1.25 a |
| <i>T. violacea</i> | | 2.5 | 76.28 a | 16.30 a | 1.85 a |
| <i>T. violacea</i> | | 5 | 75.03 a | 17.68 a | 1.36 a |
| <i>T. violacea</i> | | 7.5 | 74.06 a | 18.75 a | 1.76 a |
| <i>T. violacea</i> | | 10 | 73.78 a | 19.01 a | 1.80 a |
| Testigo | | | 90.75 b | 00 c | 1.00 a |
| | | | 6.45 | 2.4 | 1.9 |
| DMSH | <i>D. amoena</i> | 1 | 83.92 a | 8.15 a | 1.13 d |
| | <i>D. amoena</i> | 2.5 | 80.03 a | 12.16 a | 1.45 c |
| | <i>D. amoena</i> | 5 | 82.81 a | 9.05 a | 2.01 b |
| | <i>D. amoena</i> | 7.5 | 82.25 a | 11.01 a | 1.98 b |
| | <i>D. amoena</i> | 10 | 81.14 a | 10.91 a | 2.40 a |
| | Testigo | | 90.75 b | 00 b | 1.00 |
| DMSH | | | 6.29 | 4.1 | 2.5 |

^tMedias con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales con base en la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$); DMSH: diferencia mínima significativa honesta.

El análisis fitoquímico por cromatografía en capa fina permitió identificar la presencia de glucosinolatos en los extractos de *B. napobrassica* (*Brassicaceae*) y de *R. sativus* (*Brassicaceae*), y presencia de flavonoides y terpenoides en los extractos de *T. violacea* y *D. amoena*, respectivamente (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis fitoquímico de los extractos de las cuatro especies vegetales.

| Especie | Familia | Tipo de metabolito | | | | Referencias |
|------------------------|-----------------------|--------------------|-----|-----|------|---|
| | | Al | Fla | Ter | Gluc | |
| <i>R. sativus</i> | <i>Brassicaceae</i> | - | - | - | + | Glucosinolatos (Uludag <i>et al.</i> , 2006). |
| <i>B. napobrassica</i> | <i>Bassicaceae</i> | - | - | - | + | Glucosinolatos (Sonderby <i>et al.</i> , 2010) |
| <i>T. violacea</i> | <i>Amaryllidaceae</i> | - | + | - | - | Flavonoides (Aremu <i>et al.</i> , 2014). Compuestos azufrados (Auger y Thibout, 2004; Jäger y Stafford, 2012) |
| <i>D. amoena</i> | <i>Araceae</i> | - | - | + | - | Glucoalcaloides y saponinas (Hunter y Becerra, 1974) |

(-) Ausencia; (+) Presencia; Al: Alcaloides; Fla: Flavonoides; Ter: Terpenoides; Gluc: Glucosinolatos.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos con los extractos probados (efectividad biológica de 17 a 33 %) no superaron el 70 % de inhibición de cenicilla en manzano reportado por Dooley (1978), es decir no se alcanzó el rango aceptable en pruebas de efectividad biológica para cualquier fungicida (Pérez-Ángel *et al.*, 2010). Por lo tanto, se podría considerar que los extractos evaluados no presentaron efectos importantes para el control de este hongo.

El análisis fitoquímico del extracto de *T. violacea* reveló la presencia de flavonoides, lo cual concuerda con Aremu *et al.* (2014); algunos autores señalan también la presencia de compuestos organosulfurados (sulfóxido de S-etil-cisteína) (Olorunnisola *et al.*, 2012) y saponinas (Ncube *et al.* 2011). En el

presente trabajo ambos tipos de compuestos no se analizaron, se realizaron pruebas para glucosinolatos compuestos que no se detectaron (negativo). La efectividad biológica del extracto de *T. violacea* (*Amaryllidaceae*) podría deberse a la presencia de organosulfurados, o bien, a un efecto sinérgico de los metabolitos secundarios presentes en el extracto (Van Loon *et al.*, 2002). *Allium sativum*, que contiene organosulfurados, es otra especie que pertenece a la misma familia (*Amaryllidaceae*) que *T. violacea*; varios autores han reportado que el extracto de *A. sativum* muestra efectividad biológica contra diferentes especies de cenicilla (Reimers *et al.* 1993; Ahmed, 1995; Singh *et al.*, 1995; Prithviraj *et al.*, 1998; Vidyasagar *et al.*, 2001); lo que concuerda con el presente trabajo en donde *T. violacea* mostró la mejor efectividad contra *S. fuliginea*.

Al Surhane (2013) indica que los extractos como *Pimpinella anisum*, *Eucalyptus globules*, *Matricaria chamomilla*, *Cuminum cyminum*, *Majorana hortensis*, *Thymus vulgais* pueden tener efecto en la fisiología del hongo o de la planta. Ahmed (1995) reporta que los extractos de *A. sativum*, entre otras especies, inhiben la germinación de las esporas de *S. fuliginea*; y como respuesta de la planta huésped, por lo que el efecto inhibitor de los extractos vegetales puede atribuirse a: a) la formación de barreras físicas por parte de ésta, que impiden la penetración de hongos (Liu *et al.*, 2010); b) a la formación de una membrana continua que permite la difusión de oxígeno y dióxido de carbono, pero inhibe el paso del agua, promoviendo un estado fisiológico saludable para la planta (Han, 2000); c) aumento de su actividad enzimática (peroxidasa, quitinasa y β -1,3-glucanasa); y d) incremento en la producción de etileno (Herger and Klingauf,

1990), factores que podrían explicar los efectos observados por *T. violacea* en el control del hongo.

Algunos extractos vegetales han mostrado actividad contra *S. fuliginea* en un cultivo de pepino en condiciones de invernadero. Daayf *et al.* (2000) reportan que el extracto vegetal de *Reynoutria* spp. (Milsana ®) indujo respuesta de defensa de las plantas de pepino infectado por el mismo hongo. Wurms *et al.* (1999) demuestran que la aplicación del extracto de *Reynoutria* spp. disminuyó significativamente la incidencia de *S. fuliginea* en pepino, por la inducción de resistencia localizada en la planta (aumento del contenido de compuestos fenólicos), observándose la afectación del micelio y haustorios del hongo en cuestión.

No obstante que se ha reportado la actividad herbicida e insecticida de los extractos de la familia *Brassicaceae*, por la presencia de glucosinolatos (Auger y Thibout, 2004; Hopkins *et al.*, 2009), no se encuentra documentada la actividad de los extractos de *R. sativus* y *B. napobrassica* contra *S. fuliginea*. La actividad biológica reportada para glucosinolatos comprende inhibición del crecimiento microbiano de algunas bacterias con el extracto de *B. napobrassica* o el de *R. sativus* en hongos como *Fusarium culmorum* (Manici *et al.*, 1997; Pérez-Gutierrez y Lule-Perez, 2004; Kowalska y Smolinska, 2008).

El síntoma de clorosis en hojas de pepino como efecto de fitotoxicidad del extracto de *B. napobrassica* en alta concentración (10 %) comparativamente con bajo nivel de clorosis provocado por el extracto de *R. sativus* a la misma concentración, y las diferencias en efectividad biológica (*R. sativus* 26.7 % y *B. napobrassica* 17.6), podría deberse a los diferentes metabolitos del grupo de los

glucosinolatos, aunque se extrajeron con el mismo tipo de disolvente. Henning y Yordaz (2013) señalan que éstos pueden derivar biosintéticamente de diferentes tipos de aminoácidos (alifáticos, aromáticos e indólicos) como precursores. Aunque, Auger y Thibout (2004) indican que en los extractos vegetales es prácticamente imposible, o al menos muy difícil, poder afirmar la naturaleza de los compuestos activos, porque para ello hay que aislar y purificar los metabolitos y después evaluarlos, pero no fue el objetivo del presente trabajo.

Existen escasos reportes de la actividad fungicida de los extractos de *Dieffenbachia* spp. (Galletti *et al.*, 2008), no obstante, se han señalado sus efectos contra insectos (Potenza *et al.*, 1999); ácaros (Potenza *et al.*, 2003; Veronez *et al.*, 2012) y su actividad alelopática (Hoffmann *et al.*, 2007).

Finalmente, la efectividad biológica de los extractos de plantas, podría depender de: a) modo de acción de los extractos (Slusarenko *et al.*, 2008; Tasleem *et al.*, 2011; El-Wakeil, 2013); b) composición química de los extractos (Pineda *et al.*, 2012); c) inducción de barreras de defensa en la planta (Daayf *et al.*, 2000); d) alteración en la fisiología de la planta por la disminución del contenido de azúcares y amino ácidos totales (Ahmed, 1995); e) la etapa de patogénesis de la enfermedad (Al Surhane, 2013); y f) la etapa de crecimiento y desarrollo de la planta huésped (Al Surhane, 2013).

CONCLUSIONES

Los extractos metanólicos crudos de las especies evaluadas tuvieron efecto diferencial en severidad del daño y en la efectividad biológica contra *S. fuliginea* y en la mayoría de los casos no generaron fitotoxicidad.

Con relación al efecto de concentración, la mayoría de los extractos mostraron mayor efectividad biológica a las concentraciones menores.

El extracto de *T. violacea* mostró menor severidad de daño en las plántula y la mayor efectividad biológica contra *S. fuliginea*.

Los extractos de *R. sativus* y *B. napobrassica* mostraron presencia de glucosinolatos, flavonoides y terpenoides para *T. violacea* y *D. amoena*, respectivamente.

LITERATURA CITADA

- Adebayo, O., T. Dang, A. Belanger and S. Khanizadeh. 2013. Antifungal studies of selected essential oils and a commercial formulation against *Botrytis cinerea*. Journal of Food Research 2: 217–226.
- Agrios, G. N. 2004. Losses caused by plant diseases. Plant pathology. Oxford, UK, Elsevier. 838 p.
- Ahmed, A.S.Y. 1995. Studies on the powdery mildew disease of cucurbits. M.S. thesis, Faculty of Agriculture, Al-Azhar University. Cairo, Egypt. 174 p.
- Al Surhane, A. M. 2013. Efficiency of the extracts of some plants on squash powdery mildew. Mediterranean Journal of Social Sciences 4: 39-49.
- Apablaza, G., M. Díaz J., R. San Martín y E. Moya. 2002. Control de oidio de las cucurbitáceas con saponinas presentes en extractos de quillay (*Quillaja saponaria*). Ciencia e Investigación Agraria 29: 83-90.
- Aremu, A. O., N. Masondo A. and J. Van Staden. 2014. Smoke-water stimulates secondary metabolites during *in vitro* seedling development in *Tulbaghia* species. South African Journal of Botany 91: 49-52.
- Auger, J. y E. Thibout. 2004. Sustancias azufradas de los *Allium* y de las crucíferas: potencial fitosanitario. In: Biopesticidas de Origen Vegetal. Regnault-Roger, C., B. J. Philogene R. y C. Vincent (eds.). Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 77-92.
- Boesewinkel, H. J. 1980. The morphology of the imperfect states of powdery mildews (*Erysiphaceae*). Botanical Review 46:167–224.

- Chávez-Solís, A. L., A. Pedroza-Sandoval, C. Nava-Díaz, P. Cano-Ríos y R. Castro-Franco. 2013. Control de la cenicilla del melón (*Podosphaera xanthii*) mediante el uso de extracto de *Larrea tridentata* (D.C.) Coville (L.). Revista Chapingo. Serie Zonas Áridas 13: 103-113.
- Chew M., Y. Li. y R. Cano P. 2005. Evaluación de híbridos de melón a la cenicilla *Podosphaera xanthii* (sin. *Sphaerotheca fuliginea*) en la región lagunera. In: Memorias de la XVII Semana Internacional de Agronomía FAZ-UJED. R. Cano P. (ed.). Gómez Palacio, Durango, México. pp. 687-690.
- Coetzee, G., I. Marx J., M. Pengilly, V. Bushula S., E. Joubert. and M. Bloom. 2008. Effect of rooibos and honeybush tea extracts against *Botrytis cinerea*. South African Journal of Enology and Viticulture 29: 33-39.
- Daayf, F., M. Ongena, R. Boulanger, I. El Hadrami and R. Belanger I. 2000. Induction of phenolic compounds in two cultivars of cucumber by treatment of healthy and powdery mildew-infected plants with extracts of *Reynoutria sachalinensis*. Journal of Chemical Ecology 26: 1579–1593.
- Daayf, F., A. Schmitt and R. Belanger R. 1997. Evidence of phytoalexins in cucumber leaves infected with powdery mildew following treatment with extracts of *Reynoutria sachalinesis*. Plant Physiology 113: 719-727.
- Delgado G. y Y. Lemus. 2004. Taxonomía de *Sphaerotheca fuliginea* (Erysiphales, Ascomycota) sobre melón en Cuba. Fitosanidad 8: 27-29.
- Dik, A. J. and M. Van der Staay 1994. The effect of Milsana on cucumber powdery mildew under dutch conditions. Biologische Wetenschappen Universitiet Gent 59: 1027-1034.

- Dooley, H. L. 1978. Greenhouse method for screening protective fungicides for apple powdery mildew. *In: Methods for Evaluating Plant Fungicides, Nematicides and Bactericides*. Zeher, E. I., G. Bird W., K. Fisher D., K. Hickey D., F. Lewis H., R. Line F. and S. Rictcard F. (eds.). The American Psychopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. pp. 32- 33.
- El-Wakeil, N. B. 2013. Botanical pesticides and their mode of action. *Gesunde Pflanzen* 65:125–149.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 1987. EPPO Guideline for the Efficacy Evaluation of Plant Protection Products. Phytotoxicity assessment. PP1/135(2) 1: 32–37.
- Hoffmann F., C. E., L. Salles das Neves A., C. Freitas-Bastos e G. Luz-Wallau. 2007. Atividade alelopática de *Nerium oleander* L. e *Dieffenbachia picta* Schott em sementes de *Lactuca sativa* L. e *Bidens pilosa* L. *Revista de Ciencias Agroveterinárias* 6: 11-21.
- Fujiwara, K. and T. Fujii. 2002. Effects of spraying ozonated water on the severity of powdery mildew infection on cucumber leaves. *Ozone Science and Engineering* 24: 463–469.
- Galletti, S., E. Sala, O. Leoni, S. Cinti and C. Cerato. 2008. *Aspergillus flavus* transformation of glucosinolates to nitriles by an arylsulfatase and a b-thioglucosidase. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 2170–2173.
- Han, J. S. 2000. Use of antitranspirant epidermal coatings for plant protection in China. *Plant Disease* 74: 263-266.
- Hano, G., B. Herezig, A. Horvath and C. Nagy Z. 1993. Study of effectively of plant extracts against different pests. *Noveny Vedelem* 29: 171–181.

- Herger, G. and F. Klingauf. 1990. Control of powdery mildew fungi with extracts of the giant knotweed, *Reynoutria sachalinensis* (*Polygonaceae*). Journal Mededelingen van de Faculteit Land bouwwetenschappen, Rijksuniversiteit, Gent. 55: 1007- 1014.
- Hopkins, R. J., N. Van Dam M. and J. J. Van Loon A. 2009. Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions. Annual Review of Entomology 54: 57–83.
- Hunter, Z. E. y C. Becerra V. 1976. Estudios químicos y aspectos farmalógicos de un anticonceptivo vegetal. Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmaceútics 2: 5-35.
- Jäger, A. K. and G. Stafford I. 2012. Quality assessment of *Tulbaghia* rhizomes. South African Journal of Botany 82: 92-98.
- Konstantinidou-Doltsinis, S. and Annegret Schmitt. 1998. Impact of treatment with plant extracts from *Reynoutria sachalinensis* (*E Schmidt*) Nakai on intensity of powdery mildew severity and yield in cucumber under high disease pressure. Crop Protection 11: 649-656.
- Kowalska, B. and U. Smolinska. 2008. The effect of selected plant materials and extracts on the development of bacterial diseases on onion. Vegetables Crops Research Bulletin 68: 33-45.
- Liu, F., Y. Zhuge Y., C. Yang Y., S. Jin X., J. Chen, H. Li and G. Dai H. 2010. Control effects of some plant extracts against cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) and their stability study. European Journal of Horticultural Science 75: 147–152.

- Manici, L. M., L. Lazzeri and S. Palmieri. 1997. *In vitro* fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 2768–2773.
- Ncube, B., V. N. Ngunge P., J. Finnie F. and J. Van-Staden. 2011. A comparative study of the antimicrobial and phytochemical properties between outdoor grown and micropropagated *Tulbaghia violacea* Harv. plants. *Journal of Ethnopharmacology* 134: 775-780.
- Olorunnisola, O. S., G. Bradley and A. Afolayan J. 2012. Protective effect of *Tulbaghia violacea* Harv. on aort pathology, tissue antioxidant enzymes and liver damage in diet-induced atherosclerotic rats. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 12747-12760.
- Pandey, B., S. Khan and S. Singh 2014. A Study of antimicrobial activity of some spices. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3: 643-650.
- Pérez-Ángel, R., R. S. García-Estrada, J. A. Carrillo-Fasio, M. A. Angulo-Escalante, J. B. Valdez-Torres, M. D. Muy-Rangel, A. M. García-López y M. Villarreal-Rome. 2010. Control de Cenicilla (*Sphaerotheca fuliginea* Schlechtend.: Fr, Pollaci) con aceites vegetales y sales minerales en pepino de invernadero en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28: 17-24.
- Pérez-Gutiérrez, R. M. and R. Lule-Perez. 2004. *Raphanus sativus* (Radish): Their chemistry and biology. *The Scientific World Journal* 4: 811-837.
- Pineda M., R., P. Vizcaíno S., P. C. García M., G. J. Gil H. and R. Durango D. L. 2012. Chemical composition and antifungal activity of *Piper auritum* Kunth

- and *Piper holtonii* C. DC. against phytopathogenic fungi. Chilean Journal of Agricultural Research 72: 507-5015.
- Potenza, M. R., R. Nishimori K., M. Sato E., M. Pasouza Filho F. and L. Benedicto H. 1999. Evaluation of plant extract in the control of *Ceratitis capitata* (Wied, 1824) (Diptera: Tephritidae) in laboratory conditions. Journal Arquivos do Instituto Biológico (Sao Paulo) 66: 123-131.
- Potenza, M. R., A. Takematsu P., T. Jocys, J. D. Felicio F., M. Rossi H. and M. Sakita N. 2003. Acaricide evaluation of extracts for the control of coffee red mite *Oligonychus ilicis* (McGregor) (Acari: Tetranychidae). Journal Arquivos do Instituto Biológico (Sao Paulo) 70: 004.
- Prithiviraj, B., U. Singh P., K. Singh P. and K. Plank-Schumacher. 1998. Field evaluation of ajoene, a constituent of garlic (*Allium sativum*) and neemazal, a product of neem (*Azadirachta indica*) for the control of powdery mildew (*Erysiphe pisi*) of pea (*Pisum sativum*). Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 105: 274-278.
- Reimers, F., S. Smolka E., S. Werres, S. Plank K. and G. Wagner. 1993. Effect of ajoene, a compound derived from *Allium sativum*, on phytopathogenic and epiphytic microorganisms. Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 100: 622- 633.
- Savary, S., A. Ficke, J. Aubertot N. and C. Hollier. 2012. Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. Food Security 4: 512-537.
- Singh, U. P., B. Srivastava P., K. Singh P. and G. Mishra D. 1991. Control of powdery mildew of pea by ginger extract. Indian Phytopathology 44: 55-59.

- Singh, U. P., B. Prithviraj K., G. Wagner and K. Plank-Schumacher. 1995. Effect of ajoene, a constituent of garlic (*Allium sativum*), on powdery mildew (*Erysiphe pisi*) of pea (*Pisum sativum*). *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 102: 399-406.
- Slusarenko, A. J., A. Patel and D. Portz. 2008. Control of plant diseases by natural products: Allicin from garlic as a case study. *European Journal of Plant Pathology* 12: 313-322.
- Sonderby, I. E., F. Geu-Flores and B. Halkier A. 2010. Biosynthesis of glucosinolates – genes discovery and beyond. *Trends in Plant Science* 15: 283-290.
- Steck, U. and H. Schneider. 1993. On the effect of so called (biotonics) in horticulture. *Gesunde Pflanzen* 45: 98-105.
- Tasleem, A., T. Mandal K. and D. Rajesh. 2011. Natural products: Anti-fungal agents derived from plants. *In: Opportunity, Challenger and Scope of natural Products in Medicinal Chemistry*. Tiwari, V. K., B. Mishra B. (eds.). Research Signpost. Kerala, India. pp. 283-311.
- Tohamy M., R A., A. Aly Z., T. Abd El-Moity H. and L. Abd-El-Moneim. 2002. Evaluation of some plant extracts in controlling damping-off and mildew diseases of cucumber. *Egyptian Journal of Phytopathology* 2: 71-80.
- Uludag, A., I. Uremis, M. Arslan and D. Gozcu. 2006. Allelopathy studies in weed science in Turkey-a review. *Journal of Plant Diseases and Protection* 20: 419-426.
- Van Loon, J. J. A., C. Wang, J. Nielsen K., R. Gols and Y. Qiu. 2002. Flavonoids from cabbage are feeding stimulants for diamond back moth larvae

- additional to glucosinolates: chemoreception and behaviour. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 104:27–34.
- Veronez, B., M. Sato E. and R. Nicastro L. 2012. Toxicity of synthetic and natural compounds on *Tetranychus urticae* and the predator *Phytoseiulus macropilis*. *Journal Pesquisa Agropecuária Brasileira* 47: 511-518.
- Vidyasagar, G. M. and A. Rajasab H. 2001. Effect of *neem* (*Azadirachta indica*), parthenium (*Parthenium hysterophorus*) and garlic (*Allium sativum*) extracts on the incidence of powdery mildew of mulberry caused by *Phyllactinia corylea*. *Indian Journal of Sericulture* 40: 81-85.
- Volf, O. and B. Steinhauer. 1997. Fungicidal activity of neem leaf extracts. *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent* 62: 1027-1033.
- Wagner, H. and S. Bladt. 1996. *Plant Drug Analysis: A thin Layer Chromatography Atlas*. Springer. Berlin, Alemania. 383 p.
- Wurms, K., C. Labbe, N. Benhamou and R. Belanger R. 1999. Effects of miltana and benzothiadiazole on the ultrastructure of powdery mildew haustoria on cucumber. *Phytopathology* 89: 728–736.
- Zhanga, Z. Y., G. Daia H., Y. Zhugea Y. and Y. Lib B. 2008. Protective effect of *Robinia pseudoacacia* Linn1 extracts against cucumber powdery mildew fungus, *Sphaerotheca fuliginea*. *Crop Protection* 27: 920–925.

4 CONCLUSIONES GENERALES

Los rendimientos de los extractos metanólicos crudos de *P. auritum*, *T. violacea*, *C. chinense*, *D. amoena*, *N. oleander*, *R. sativus* y *B. napobrassica* fueron 18, 26, 12, 27, 16, 20 y 21 g 100 g⁻¹ peso seco, respectivamente y el extracto de diclorometano de *C. chinense* fue 10 g 100 g⁻¹ peso seco.

Por cromatografía en capa fina, se identificaron flavonoides, terpenoides y alcaloides en el extracto metanólico crudo de *P. auritum*; flavonoides en *T. violacea*; alcaloides en *C. chinense*; terpenoides en *D. amoena*; alcaloides y terpenoides en *N. oleander* y glucosinolatos en los extractos de *R. sativus* y *B. napobrassica*.

El extracto metanólico crudo de *T. violacea* a una concentración de 100 % presentó el mayor (90 %) efecto de inhibición del crecimiento micelial en las cepas gris y rosa de *C. gloeosporioides*, con una CI₅₀ de 29.37 y 23.27 %, respectivamente; asimismo, el extracto superó la inhibición micelial desde la concentración más baja al producto comercial Amistar® en ambas cepas. El producto comercial Elevat® en comparación con los extractos vegetales fue el tratamiento de mayor efecto antifúngico contra *B. cinerea*, inhibiendo el crecimiento del micelio en 72.1 %; el extracto que mostró los mejores resultados fue el extracto de diclorometano de *C. chinense*, que contenía alcaloides, porque a la concentración de 60 % afectó el crecimiento micelial en 52.4 % y una CI₅₀ de 61.7 %. El extracto de *P. auritum*, cuyo análisis fitoquímico mostró la presencia de alcaloides, terpenos y flavonoides, a la concentración de 100 % inhibió el crecimiento micelial en 60.2 % y una CI₅₀ de 84.4 %.

El extracto metanólico de *B. napobrassica* presentó el mayor efecto fitotóxico al inhibir la germinación de la mayoría de las semillas y afectar el crecimiento de la LR y LPA en comparación con el extracto de *R. sativus*. El análisis fitoquímico mostró la presencia de glucosinolatos en ambos extractos.

El extracto de *T. violacea* fue el que mostró la mayor efectividad biológica (32.8 %) en *S. fuliginea* en plántulas de pepino en condiciones de invernadero en comparación con los demás extractos evaluados (*R. sativus*, *D. amoena* y *B. napobrassica*). *R. sativus* (*Brassicaceae*) presentó mayor efectividad (26.7 %) que *B. napobrassica* contra el hongo. Asimismo, las plantas tratadas con el extracto de *B. napobrassica* mostraron síntomas de fitotoxicidad en la superficie de las hojas (clorosis).