

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS
DE *Flourensia cernua* DC. CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA
SOBRE INSECTOS, HONGOS, ALGA Y BACTERIAS
FITOPATÓGENAS**

SUSANA SOLIS GAONA

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

Universidad Autónoma Agraria



Antonio Narro

PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila

Octubre de 2007

DEDICATORIA

A MIS PADRES MARIA INES Y SANTIAGO †, CUYA LUZ DE AMOR GUÍA MI VIDA HACIA DIOS, EXISTIRÁN EN MI POR SIEMPRE.

A MI ESPOSO OMAR, COMPAÑERO AMOROSO, INSPIRADOR Y COMPENSIVO EN LAS BUENAS Y EN LAS MALAS.

A MIS HERMANOS Y FAMILIA: ESME; FLAVIO, ANA, FELIX, FLAVIOLIN y MELY; ANIA, ARMANDO, ARTURITO y ARMANDITO; DULCE y DANIELA; SANTIAGO, ALINA, DANIEL y ESAU; GELA y ARMANDO; REY, LUZ, ZULY, KARY, YADI, YAIR y HANIA. NUESTRO AMOR Y UNIÓN ESPIRITUAL ES MI SOPORTE PARA SUPERAR LAS PRUEBAS DIFÍCILES DE LA VIDA. A MIS SUEGROS LUPITA Y SERVANDO, Y TODA LA FAMILIA CÁRDENAS POR COMPARTIRME SU CARÍÑO.

ESTA TESIS ES EN MEMORIA DEL DR. EUGENIO GUERRERO RODRÍGUEZ†, DIRECTOR DE TESIS, A QUIEN DIOS LLAMO A SU PRESENCIA ANTES DEL TÉRMINO DE LA MISMA

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT POR SU APOYO ECONÓMICO EN MI FORMACIÓN, POR PROMOVER EL DESARROLLO CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO DEL PAÍS.

AL PROGRAMA DE PARASITOLÓGÍA AGRÍCOLA DE LA U.A.A.N., POR DARMÉ LA ENSEÑANZA Y LOS RECURSOS NECESARIOS PARA PREPARARME COMO UN PROFESIONAL.

A MI COMITÉ DE ASESORES; DRA. DIANA, DR. ALBERTO, DR. DANIEL Y DRA. ROSALINDA POR SUS VALIOSAS MUESTRAS DE AMISTAD Y APOYO A LO LARGO DE ESTE TRABAJO.

A LA FAMILIA MEDINA PEREZ DE BIOAGROMEX, S.A DE C.V. POR ACOMPAÑARME Y APOYARME EN MOMENTOS TRASCENDENTALES DE MI VIDA.

COMPENDIO

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS DE *Flourensia cernua* DC. CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA SOBRE INSECTOS, HONGOS, ALGA Y BACTERIAS FITOPATÓGENAS

POR
Susana Solís Gaona

DOCTORADO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA;
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO;
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, OCTUBRE DEL 2007

Dr. Alberto Flores Olivas – Asesor Principal-

Palabras clave: hojásén, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Penicillium digitatum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Pectobacterium carotovora* subs. *atroseptica*, *Pseudomonas cichorii*, *Brevicoryne brassicae*, *Sitophilus oryzae*, *Phthorimaea operculella*, Bicyclo [1.6.0] 3 (ácido, 1,2-penten-ico) decano, Bicyclo [1.6.0] 3 (ácido, 2,3-penten-ico) decano.

En el presente trabajo de investigación, inicialmente se obtuvieron cuatro extractos de hojas de *Flourensia cernua* colectadas en áreas aledañas a la ciudad de Saltillo, Coahuila, México por la carretera 54 Saltillo a Zacatecas, en el mes de julio del 2005. La extracción fue en extracción secuenciada, con solventes de distinta polaridad, utilizando hexano, éter dietílico y etanol, además de una mezcla de metanol:cloroformo (1:1), este proceso se llevó a cabo en el

Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN).

Posteriormente, se realizaron bioensayos *in vitro* para determinar la actividad fungistática de los extractos, a concentraciones de 500, 1000, 2000 y 4000 $\mu\text{l l}^{-1}$ en cajas de Petri con PDA, la evaluación fue sobre los hongos de postcosecha; *Alternaria alternata* causante del moho negro, *Penicillium digitatum* que forma moho verde y *Colletotrichum gloesporioides* que ocasiona antracnosis en frutos, así como sobre los patógenos de suelo; *Fusarium oxysporum* causante de marchitez vascular, *Phytophthora capsici* causante de pudrición radicular y *Rhizoctonia solani* causante de costra negra. Todos los extractos presentaron actividad fungistática con valores superiores al 65 % de inhibición micelial de los cinco hongos y el alga bajo estudio, también afectaron formación de conidios, el mejor fue el extracto etanólico en un rango de 87 a 100 % de inhibición micelial.

La actividad insecticida de los extractos a: 2,500; 5,000; 10,000; 20,000 y 40,000 $\mu\text{l l}^{-1}$ se realizó sobre *Brevicoryne brassicae* (pulgón de la col), *Sitophilus oryzae* (gorgojo), y *Phthorimaea operculella* (palomilla de la papa). El bioensayo sobre pulgón y palomilla fue por inmersión en hojas de repollo y tubérculos, respectivamente, el mejor extracto sobre pulgón fue el hexánico con CL50 de 6,389 $\mu\text{l l}^{-1}$ y CL90 de 21,439 $\mu\text{l l}^{-1}$, ningún extracto provocó mortalidad de palomilla. Respecto al gorgojo, los bioensayos fueron por película residual en frascos y granos de maíz tratados, los gorgojos no manifestaron mortalidad por

efecto de los extractos. Por otro lado, se evaluó el efecto de repelencia o atracción de los extractos sobre gorgojos en costales de rafia y yute tratados, el extracto hexánico provocó repelencia tanto en costales de rafia como de yute, sin embargo, la mezcla de yute y extracto etanólico fue atrayente.

Se evaluó además la actividad de extractos sobre las bacterias fitopatógenas; *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*), *Pectobacterium carotovora* subs. *atroseptica* (*Pca*), *Pseudomonas cichori* (*Pc*), para lo que se difundieron en medio B de King en cajas de Petri a: 500; 1,000; 2,000 y 4,000 $\mu\text{l l}^{-1}$. La inhibición de crecimiento de las bacterias por los extractos con respecto al testigo fueron a 24 y 48 h, ningún extracto tuvo efecto sobre *Pca*, si bien, el extracto hexánico a 2000 y 4000 $\mu\text{l l}^{-1}$ inhibió *Xap* y *Pc*.

En otra fase de la investigación se realizó el fraccionamiento de los compuestos del extracto etanólico, dado que este extracto presentó la mayor actividad a las dosis más bajas, la cual fue de tipo fungistático, la separación fue por cromatografía de columna con sílica gel, el sistema de eluyentes fue hexano: acetato de etilo: metanol (10-0:0-10:5-5), se obtuvieron 29 fracciones con suficiente rendimiento para evaluar su actividad fungistática en bioensayo en placas de microdilución.

El bioensayo de las fracciones a 500, 1000 y 2000 $\mu\text{l l}^{-1}$ sobre *F. oxysporum* fue en placas de microdilución de 96 pocillos con medio líquido RPMI 1640 con MOPS, se consideró al incremento o disminución de

absorbancia (545-630 nm) a 24, 48 y 72 h como la tasa de crecimiento del hongo. La mayor inhibición se obtuvo con las fracciones 22 y 23 eluídas con hexano: acetato de etilo (3:7), con 7.5 y 7.3 veces menos absorbancia que el testigo.

Se realizaron los análisis de espectroscopía de Infrarrojo (FT-IR) de la muestra 22 presentando fuerte y mediana intensidad de bandas, relacionadas con los grupos funcionales ácido carboxílico y alcano.

Además se caracterizaron los compuestos presentes en la fracción 22 por cromatografía de gases adaptado a un espectrofotómetro de masas (CG-MS), el compuesto presente en la fracción más eficiente fue el Bicyclo [1.6.0] 3 ácido, 1,2-penten-ico) decano / Bicyclo [1.6.0] 3 ácido, 2,3-penten-ico) decano, cuya fórmula molecular es $C_{15}H_{24}O_2$ y tiene un peso molecular de 236, este compuesto no ha sido reportado científicamente en *F. cernua*.

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF COMPOUNDS OF *Flourensia cernua* D.C. WITH ACTIVITY ON INSECTS, FUNGI, ALGAE, AND PHYTOPATHOGENIC BACTERIA

BY
Susana Solís Gaona

DOCTORATE IN SCIENCES AGRICULTURAL PARASITOLOGY;
UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO;
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, OCTOBER 2007

Dr. Alberto Flores Olivas- Advisor-

Key words: tarbush, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Penicillium digitatum*, *Xanthomonas axonopodis* pv phaseoli, *Pectobacterium carotovora* subs. atroseptica, *Pseudomonas cichorii*, *Brevicoryne brassicae*, *Sitophilus oryzae*, *Phthorimaea operculella*, Bicycle [1.6.0] 3(1,2-penten-ic acid) decane, Bicycle [1.6.0] 3(2,3-penten-ic acid) decane.

In the present work, initially were obtained four extracts of leaves of *Flourensia cernua* collected from Saltillo, Coahuila, Mexico. A sequentially extraction was carried out with solvents with different polarity: hexane, ether diethyl and ethanol, also an extraction with a solvent mixture of methanol:chloroform (1:1) was done. These processes were carried out at the Phytochemical Laboratory of the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN).

Following bioassay *in vitro* were carried out for tested antifungal activity of the extracts, at different concentrations: 500; 1,000; 2,000 and 4,000 $\mu\text{l l}^{-1}$ on Petri dishes with PDA. The evaluation was on postharvest pathogens; *Alternaria alternata* that cause black mold, *Penicillium digitatum* that produce mold green and *Colletotrichum gloesporioides* that generate antracnose on fruits, also the extracts, were evaluated on soil pathogens; *Fusarium oxysporum* that cause wilt vascular, *Phytophthora capsici* that produce root rot and *Rhizoctonia solani* that generate black scurf. The extracts showed antifungal activity in more than 65 % of mycelial inhibition on five fungi and one algae, also decreased conidia formation, the best extract was ethanolic extract with a rate of 87 at 100 % mycelial inhibition.

Evaluation of extracts insecticide activity at 2,500; 5,000; 10,000; 20,000 and 40,000 $\mu\text{l l}^{-1}$ was carried out on *Brevicoryne brassicae* (aphid), *Sitophilus oryzae* (grain pest), and *Phthorimaea operculella* (potato moth). The bioassay on aphid and moth was by immersed of crucifer leaves and tubers, respectively. The best extract on aphid was the hexanic with CL50 6,389 $\mu\text{l l}^{-1}$ and CL90 21,439 $\mu\text{l l}^{-1}$, any extract produced mortality of moth. Respect to grain pest, assays was by residual film on gerber bottles, and corn treated. Grain pest do not had mortality. Another way, the extracts were evaluated on repellence and attractance of grain pest on yute and rafia sucks. The hexanic extract showed repellence and the ethanolic extract had synergism with yute sacks as attractance on *S. oryzae*.

Moreover *F. cernua* extracts, were evaluated for bactericide activity on phytopathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*), *Pectobacterium carotovora* subs. *atroseptica* (*Pca*), *Pseudomonas cichori* (*Pc*), on Petri dishes at: 500; 1,000; 2,000 and 4,000 $\mu\text{l l}^{-1}$. The inhibition of bacterial growth was measure at 24 and 48 h, any extract had effect inhibition on *Pca*, although, hexanic extract at 2,000 and 4,000 $\mu\text{l l}^{-1}$ inhibited *Xap* y *Pc*.

Another investigation phase was the fractionation of the ethanolic extract, due to this extract showed the higher activity at low doses, this activity was fungistatic. The fractionation was by column chromatography with gel of sílice. The eluted system was hexane: ethyl acetate: methanol (10-0:0-10:5-5). Twenty nine fractions were obtained. The fractions were evaluated on microdilution test for antifungal activity.

Bioassay of fractions at 500; 1,000 and 2,000 $\mu\text{l l}^{-1}$ on *F. oxysporum* were on 96-multiwell microdilution plates, with liquid media RPMI 1640 with MOPS, taking into account to increase or to decrease of the absorbance (545-630 nm) by 24, 48 and 72 h as *F. oxysporum* growth rate. The highest inhibition of growth rate was obtained with fractions 22 and 23 using as solvents hexane:ethyl acetate (3:7). The results showed 7.5 and 7.3 times more than the control.

The antifungal compounds of fraction 22 were characterized by Analysis of Infrared spectra (FT-IR), the fraction showed intensity high and medium of

bands in relation to functional groups carboxyl and alkane. Also was carried out GAS chromatography with Mass detector of fraction 22. Constituent of fraction was Bicycle [1.6.0] 3(1,2-penten-ic acid) decane / Bicycle [1.6.0] 3(2,3-penten-ic acid) decane. With a molecular formula as $C_{15} H_{24} O_2$ and a molecular weight of 236, this compound has not previous report for *F. cernua*.

INDICE GENERAL

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA	6
Género <i>Flourensia</i>	6
<i>Flourensia cernua</i>	6
Distribución geográfica.....	7
Características botánicas.....	7
Usos.....	8
Estudios previos de actividad biológica.....	8
Actividad insecticida	8
Actividad antifúngica	9
Actividad fitotóxica	10
Estudios de caracterización química	11
ARTÍCULOS	
ARTÍCULO 1 Actividad biológica In vitro de extractos de <i>Flourensia cernua</i> DC en patógenos de postcosecha: <i>Alternaria alternata</i> (Fr.:Fr.) Keissl., <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. y Sacc. y <i>Penicillium digitatum</i> (Pers.:Fr.) Sacc... 13	
ARTICULO 2 Antifungal activity in vitro of <i>Flourensia cernua</i> extracts against soil pathogenic fungi	35
ARTICULO 3 Actividad de extractos de <i>Flourensia cernua</i> D.C.en bacterias fitopatógenas <i>in vitro</i>	49
ARTICULO 4 Actividad bioinsecticida, repelencia y atracción de extractos de <i>Flourensia cernua</i> D.C.	66
ARTICULO 5 Fraccionamiento y caracterización de un compuesto de <i>Flourensia cernua</i> DC. con actividad antifungica.....	78
CONCLUSIONES	98
LITERATURA CITADA	100

INTRODUCCIÓN

Las especies vegetales presentan una gran diversidad de metabolitos secundarios, que aunque no participan en las funciones esenciales de las plantas, cumplen funciones de defensa contra predadores y patógenos. También actúan como agentes alelopáticos o para atraer a polinizadores y dispersores de semillas (Dorman y Deans, 2000; Domingo y López-Brea, 2003; Vivanco *et al*, 2005; Field *et al.*, 2006). Por lo que el estudio de las plantas y sus metabolitos secundarios constituyen un valioso campo de estudio para realizar investigación científica concerniente a la actividad biológica de dichos metabolitos que contribuya a lograr la explotación racional y preservación de especies vegetales (Field *et al.*, 2006).

La especie *Flourensia cernua* DC. se encuentra ampliamente distribuida en el Desierto Chihuahuense habitando en nueve estados de la República Mexicana y el Sureste de Estados Unidos (Korthuis, 1988).

Las primeras investigaciones sobre *F. cernua* iniciaron cuando se le encontró como maleza invasiva en áreas de pastizales destinadas a la ganadería (Cavazos, 1984; Díaz, 1985). Su uso como forraje no era factible porque se observó que los rumiantes hacían un uso limitado de las hojas de *F.*

cernua por su baja palatabilidad, y que el consumo prolongado de sus hojas provocaba mortalidad de ovejas (Fredrickson *et al.*, 1994; King *et al.*, 1996). Con el fin de conocer los componentes de hojásen relacionados con la toxicidad hacia el ganado y poder contrarrestar sus efectos, se observó que lavando las hojas con etanol, el consumo de estas se vió favorecido (Estell *et al.*, 1994). Se caracterizaron más de 60 aceites volátiles presentes en las hojas de hojásen (Tellez *et al.*, 1997) por CG-MS, los cuales se continuaron evaluando en forma individual para determinar su influencia en la alimentación de ovejas (Estell *et al.*, 1998; Estell *et al.*, 2002; Estell *et al.*, 2005).

Los compuestos de las hojas de *F. cernua* han mostrado actividad biológica diversa. Tellez *et al.* (2001) realizaron evaluaciones de extractos de esta especie obtenidos por agitación mecánica y extracción secuenciada con tres disolventes de polaridad variable sobre termitas y hongos del género *Colletotrichum*. Todos los extractos presentaron efecto inhibitorio, sin embargo no se analizó cual fue el más efectivo, también evaluaron aceites obtenidos por arrastre de vapor de los extractos, encontrando mayor inhibición. Gamboa *et al.* (2003) utilizaron el método de extracción por soxhlet para la obtención de extractos metanólicos que fueron evaluados sobre el patógeno de suelo *Rhizoctonia solani* y el alga fitopatógena *Phytophthora infestans*, las dosis requeridas para 86 % de inhibición de los patógenos fueron 20,000 $\mu\text{l l}^{-1}$. Jasso de R. *et al.* (2007) evaluaron el extracto etanólico de *F. cernua* obtenido por agitación mecánica sobre los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani*,

Fusarium oxysporum y *Alternaria* sp., reportando inhibición total a $1500 \mu\text{l l}^{-1}$. En base a su polaridad, el efecto fitotóxico se encontró en extractos de éter (Dayan y Tellez, 1999) y se logró caracterizar los siguientes compuestos: Flourensadiol, metil orselinato y ácido dehidroflourensico como los compuestos que le confieren la actividad fitotóxica (Mata *et al.*, 2003).

En una investigación de carácter general se debe seleccionar la mayor diversidad de organismos indicadores posibles, para determinar el efecto que los metabolitos secundarios de una especie vegetal puedan tener sobre ellos. Es importante identificar la presencia o ausencia de sustancias con algún tipo de actividad insecticida, alelopática o antimicrobiana, y caracterizar los compuestos que puedan tener potencial de aprovechamiento comercial de la especie vegetal estudiada (Duke *et al.*, 2000).

Basándose en los resultados de evaluaciones anteriores de *Flourensia cernua* DC., se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la actividad biológica de *Flourensia cernua*, al evaluar diferentes extractos sobre insectos, hongos, alga y bacterias fitopatógenos. Fraccionar y caracterizar los compuestos que le confieren dicha actividad.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Obtener extractos de hojas de *Flourensia cernua* DC con cuatro solventes de diferente polaridad para evaluar su posible actividad biológica sobre:
 - a. Insectos; *Brevycorine brassicae*, *Sitophilus oryzae*, y *Phthorimaea operculella*.
 - b. Bacterias fitopatógenas; *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Pectobacterium carotovora* pv. *atroseptica* y *Pseudomonas cichorii*.
 - c. Hongos de postcosecha; *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloesporioides* y *Penicillium digitatum* sobre patógenos de suelo: *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* AG5 y 1D y sobre el alga *Phytophthora capsici*.
2. Efectuar la fraccionación del extracto con mayor actividad biológica, utilizando cromatografía de columna.
3. Evaluar la actividad biológica de las fracciones sobre el organismo que presente mayor respuesta a los extractos.

4. Elucidar la estructura del compuesto presente en la fracción de mayor actividad por Espectroscopía de Infrarrojo (FT-IR) y por Cromatografía de gases acoplado a detector de MASAS.

REVISION DE LITERATURA

La especie bajo estudio es un miembro de la familia *Compositae*, *Asteraceae*, pertenece al género *Flourensia*.

GÉNERO *Flourensia*

Blake (1913), describe 23 especies del género *Flourensia*, nueve mexicanas y 14 sudamericanas; Correl y Johnston, (1970), indican que *Flourensia* es un género de 24 especies distribuidas en Norteamérica y Sudamérica; Dillon (1976), reporta dos nuevas especies de este género encontradas en el estado de Chihuahua (*Flourensia pulcherina* y *F. monticola*).

Flourensia cernua

La especie *Flourensia cernua* Dc. es comúnmente conocida con varios nombres. En México se le llama: hojasén, Hojas de Sen, arbusto de alquitrán y escobilla negra (Arredondo, 1981). Los nombres que se le da en los Estados Unidos de Norteamérica son: tarbush, american brush, black brush, barnish-brush y hojasen (Benson y Darrow, 1981; Correl y Johnston, 1970; Gay *et al*; 1970; Vines, 1960).

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Es un arbusto nativo perenne, ecológicamente dominante y ampliamente distribuido en las zonas semiáridas en el desierto chihuahuense. En México se encuentra en los estados de Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Durango, San Luís Potosí, Zacatecas, México, D. F. (Vines, 1960; Muller, 1940; Miranda y Hernández, 1963; Marroquín *et al.*, 1964; Rzedowski, 1978; Briones y Villarreal, 2001). En los Estados Unidos de Norteamérica se localiza en el Oeste de Texas y Sur de Nuevo México y Arizona (Vines, 1960).

Se encuentra en altitudes que van de los 1000 a 2000 msnm (Gay, *et al.*, 1970), sin embargo, Arredondo (1981); Silva (1980) mencionan que la altitud predominante son los 1900 msnm y pendientes del 1 al 6%.

Puede considerarse invasiva en pastizales del desierto (Cavazos, 1984; Díaz, 1985), particularmente durante la sequía.

CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

F. cernua es un arbusto muy ramificado de 1 a 2 m de altura que exuda una sustancia resinosa con olor a alquitrán (Correl y Johnston, 1970). La planta tiene ramas delgadas, resinosas, color café a gris (Vines, 1960) con hojas alternas, compuestas de dos folíolos, elípticas a oblongas de 17 a 25 mm de

largo y 6.5 a 11,5 mm de ancho, agudas a ambos lados, has verde oscuro y a veces resinoso, envés más pálido y pecíolo de 1-2,5mm (Correl y Johnston, 1970). Las flores son cabezuelas en corimbos o panículas y presentan de 12 a 20 flores por cabezuela (Vines, 1960). El fruto es un aquenio muy veloso de 6 mm de largo y 2 mm de ancho, lateralmente comprimido, de 2 a 4 aristas desiguales y ciliadas de 2-3 mm de largo, casi obscurecidas por los largos del aquenio, el sistema radical es pivotante de color café oscuro, de consistencia leñosa y poco flexible.

USOS

El hojásen es una planta del desierto que tiene diversos usos: para cercas vivas y protección de cultivos, para la construcción de techos y paredes. En la medicina tradicional se usa contra la indigestión y problemas gastrointestinales.

ESTUDIOS PREVIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Actividad insecticida

Reticulitermes es un género de insectos considerados como plaga urbana, que consume madera húmeda, pertenece al Orden Isoptera, familia Rhinotermitidae, comúnmente denominadas termitas. Tellez *et al.* (2001) evaluaron extractos de *F. cernua* obtenidos por extracción secuenciada con

solventes de distinta polaridad (hexano, éter y etanol) para determinar su efecto en la alimentación y mortalidad de termitas de este género, todos los extractos tuvieron efecto de mortalidad de termitas.

Actividad Antifúngica

Se realizó la extracción de compuestos de hojas de *F. cernua* por medio de agitación mecánica a 150 rpm con solvente de baja polaridad hexano, posteriormente las hojas se secaron y reutilizaron con éter y sucesivamente con etanol. Los extractos y sus aceites esenciales obtenidos por arrastre de vapor de cada uno de los extractos, se evaluaron sobre especies del género *Colletotrichum*, en placas de cromatografía de capa fina que contenían a los extractos, para lo cual las placas se asperjaron con conidios de las especies del hongo y se midió las zonas de inhibición. Los extractos y sus aceites inhibieron al hongo, en mayor medida los aceites del extracto etanólico que estaban conformados en más de 79.1 % por sesquiterpenoides (Tellez *et al.*, 2001).

Por otra parte, se evaluaron soluciones de extractos de hojas obtenidos con metanol contra *Rhizoctonia solani*, el extracto mostró propiedades antifúngicas a concentraciones altas, puesto que requirió de 20,000 $\mu\text{l l}^{-1}$ para inhibir en 86.2 y 84.7 % a *R. solani* a 48 y 96 h respectivamente, el rango de concentraciones requeridas pudo ser debido a que el método de extracción por Soxhlet involucra altas temperaturas y algunos

de los compuestos que poseen la mayor actividad antifúngica se perdieron en el proceso de extracción (Gamboa *et al.*, 2003).

Infusión de *F. cernua* evaluada a una concentración de 10 % sobre *F. oxysporum*, mostró solo 53.7 % de inhibición micelial (López-Benitez *et al.*, 2005), lo que muestra que los compuestos que tienen la actividad antifúngica no son tan polares como el agua.

Extracto etanólico de *F. cernua* procesado por agitación mecánica fue evaluado sobre *Alternaria* sp, *R. solani* y *Fusarium oxysporum*, la inhibición total de los microorganismos se dio a concentraciones de 1500 $\mu\text{l l}^{-1}$ (Jasso *et al.*, 2007).

Actividad fitotóxica

La planta de hojásén posee actividad fitotóxica, como se demostró en evaluaciones de extractos obtenidos secuencialmente con hexano, éter y etanol. Los extractos se evaluaron en placas de 24 pocillos a concentraciones de 0.03, 0.1, 0.3 y 1 mg ml^{-1} sobre el pasto *Agrostis stolonifera* cv. penncross y el cultivo *Lactuca sativa* cv. Iceberg, el extracto de éter presentó actividad fitotóxica desde 0.3 mg ml^{-1} , el extracto etanólico no mostró efecto fitotóxico. Para verificar que la actividad fitotóxica se mantenía aplicado a suelo, el extracto de éter se mezcló con suelo a razón de 0.1, 0.3 y 1 mg g^{-1} de suelo, para determinar la dosis-respuesta sobre las malezas; monocotiledonea

Cyperus esculentus L. y la dicotiledonea *Senna obtusifolia* (L.) Irwin & Barneby, el extracto de éter afectó largo de raíz de ambas malezas desde 0.3 mg g^{-1} de suelo (Dayan y Tellez, 1999).

Posteriormente, Mata *et al.* (2003) fraccionaron extracto de *F. cernua* obtenido por maceración con metanol y cloruro de metileno en proporción 1:1, evaluaron las fracciones obtenidas sobre las malezas *Amaranthus hypocondriacus* y *Echinochloa crusgalli*, las fracciones que mostraron la actividad fitotóxica fueron eluidas con hexano:acetato de etilo en proporciones (9:1, 7:3 y 6:4).

Estudios de caracterización química

Se realizó perfil de aceites esenciales presentes en las hojas de *F. cernua* por cromatografía de gases y espectro de masas, con el fin de caracterizar los compuestos responsables del bajo consumo de este arbusto por parte del ganado y su posible toxicidad, se caracterizaron cerca de 100 compuestos (Tellez *et al.*, 1997).

Se han realizado evaluaciones de los aceites de *F. cernua* caracterizados y encontrados en altas proporciones para determinar su rol en la ingesta de nutrientes en ovejas, el sesquiterpenoide oxido caryophyllene y el monoterpenoide camphene afectaron el consumo de alfalfa al ser tratada con estos compuestos, también se descartó que los monoterpenoides myrcene y

beta-pinene tuvieran alguna influencia en la ingesta de forraje (Estell *et al.*, 2002)

Tellez *et al.* (2001), realizaron análisis por cromatografía de gases y cromatógrafo de masas de aceites esenciales obtenidos por arrastre de vapor de extractos hexánicos, etéreos y etanólicos de *F. cernua*, para conocer los componentes químicos que poseen, con hexano se liberaron en mayor proporción monoterpenoides, con éter y etanol monoterpenoides y sesquiterpenoides, obteniendo con el etanol más de 79.1% de proporción del área total como sesquiterpenoides.

Mata *et al.* (2003), aislaron los compuestos: flourensadiol, ácido dehidroflourénsico y metil orsellinato como responsables de la actividad fitotóxica de extracto de *F. cernua* obtenido con mezcla de metanol y cloruro de metileno en proporción (1:1), fraccionado con gradiente de hexano: acetato de etilo: (9:1, 7:3 y 6:4).

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VITRO* DE EXTRACTOS DE *Flourensia cernua*
DC EN PATÓGENOS DE POSTCOSECHA: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.)
Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y *Penicillium*
digitatum (Pers.:Fr.) Sacc.**

Eugenio Guerrero-Rodríguez, Susana Solís-Gaona, Fco. Daniel Hernández-Castillo, Alberto Flores-Olivas, Víctor Sandoval-López, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), Departamento de Parasitología Agrícola, Apdo. Postal 342, Km 7.5 Carr. a Zacatecas, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México C.P. 25315; y **Diana Jasso-Cantú**, UAAAN, Departamento de Fitomejoramiento. Correspondencia: susysolgao@gmail.com

Resumen. Se evaluó el efecto de extractos de hojas frescas de *Flourensia cernua* sobre la inhibición micelial y la esporulación de los patógenos de postcosecha *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Penicillium digitatum*. Los extractos fueron obtenidos con metanol:cloroformo 1:1, y por extracción sucesiva con hexano, éter dietílico y etanol. Las concentraciones evaluadas fueron 500, 1000, 2000 y 4000 mg/L en medio de cultivo PDA. Los grupos funcionales en los extractos fueron identificados por espectroscopía por la técnica de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR). El rendimiento de resina más alta (19.1%) fue obtenido con metanol:cloroformo. La inhibición micelial en *A. alternata* fue mejor con las fracciones de hexano (91.9%) y metanol:cloroformo (88.4%) ambas a la concentración de 4000 mg/L. Mientras

que *C. gloesporioides* y *P. digitatum* fueron inhibidos en un 93.4% y 94%, respectivamente, a partir de la concentración de 500 mg/L de la fracción de etanol, en todos los casos el efecto fue fungistático. No se observó producción de conidios de *A. alternata* con los extractos de etanol a 4000 mg/L y metanol:cloroformo a 2000 y 4000 mg/L, respecto a *C. gloesporioides*, también el extracto etanólico desde la concentración de 2000 mg/L fue el que provocó menor producción de conidios; en cuanto a *P. digitatum*, los cuatro extractos provocaron disminución del número de conidios aunque no hubo diferencia estadística entre ellos. En general, el extracto etanólico fue el más eficiente para inhibir micelio y afectar producción de conidios de *C. gloesporioides* y *P. digitatum*. Los espectros de FTIR de los extractos mostraron que las fracciones tienen los mismos grupos funcionales pero en distinta proporción.

Palabras clave adicionales: Hojasén, extractos vegetales, antifúngico, antiesporulante.

Abstract. In this work fresh leaf extracts from *Flourensia cernua* were evaluated against mycelial inhibition and sporulation of postharvest pathogens *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, and *Penicillium digitatum*. The extracts were obtained with methanol:chloroform (1:1), and sequential extractions with hexane, diethyl ether, and ethanol. The evaluated concentrations were 500, 1000, 2000 and 4000 mg/L in culture media PDA. Functional groups of the extracts were identified by FTIR. The highest resin yield (19.1%) was obtained with methanol:chloroform. Mycelial inhibition of *A.*

alternata was best with the fractions of hexane (91.9%) and methanol:chloroform (88.4%) both at 4000 mg/L concentration, whereas *C. gloesporioides* and *P. digitatum* were inhibited 93.4% and 94%, respectively, from 500 mg/L concentration of ethanol fraction. All extracts showed fungistatic effect. *A. alternata* not sporulated by effect of ethanol extract at 4000 mg/L concentration and methanol:chloroform at 2000 and 4000 mg/L concentrations, respect to *C. gloesporioides*, too, ethanolic extract since 2000 mg/L concentration was lowest conidia production, all extracts decreased *P. digitatum* conidia number, but were not statistical different. In general, the ethanolic extract was the most efficient for mycelial inhibition and to affect conidial production of two of three pathogens tested. The extracts FTIR spectra showed that the fractions have the same functional groups but at different ratio.

Additional keywords: Tarbush, vegetal extracts, antifungal, ant sporulation.

El control de hongos fitopatógenos, actualmente requiere de aplicar técnicas alternativas, pues el manejo tradicional con agroquímicos sintéticos ha ocasionado diversos problemas como son: toxicidad a los usuarios (Whalen *et al.*, 2003), detención de exportaciones por residuos en producto de consumo y daños al medio ambiente (Ramírez-Legarreta y Jacobo-Cuellar, 2002) así como afectación de organismos benéficos (Anderson *et al.*, 2003). Otro aspecto importante es que los microorganismos fitopatógenos han generado resistencia al ingrediente activo de algunos fungicidas sintéticos (Cooke *et al.*, 2003; Leroux, 2003) como respuesta a la presión de selección por las altas dosis y

continuas aplicaciones de los agroquímicos, ocasionando grandes pérdidas económicas. Una alternativa económica y eficiente para el control de enfermedades, es el uso de los productos naturales derivados de las plantas (Montes, 2000; Montes y Figueroa, 1995; Wilson *et al.*, 1999), no afectan el medio ambiente ya que sus residuos son fáciles de degradar, son potenciales de utilizar en el control de patógenos de productos agrícolas en postcosecha y permiten la obtención de productos agrícolas con calidad de exportación (Wilson *et al.*, 1994). De los hongos que afectan en postcosecha, existen tres de gran importancia; *Alternaria alternata* que afecta frutos de tomate en campo y en postcosecha, puede comportarse como oportunista o infectar por si solo, sus lesiones iniciales aumentan cubriendo el fruto con un moho negro (Rotem, 1994); *Colletotrichum gloesporioides* es el principal género causante de antracnosis en la mayoría de los cultivos en el mundo, es uno de los principales problemas de tomates destinados a la industria de conservación, causa manchas hundidas recubiertas de pústulas de color rosa, anaranjado o negruzco en frutos de tomate (Messiaen *et al.*, 1995), en cítricos, el moho verde causado por *Penicillium digitatum* constituye el problema más grave, responsable de más del sesenta por ciento de pérdidas ocasionadas por hongos en frutos conservados en refrigeración (Tuset, 2000). Los extractos vegetales, se han se han empleado desde tiempos remotos, principalmente en el ámbito medicinal para el control de enfermedades y recientemente en el entorno agrícola contra insectos e incluso en el control de algunos microorganismos fitopatógenos, sin definir en algunos casos cual es su principio activo (Lagunes *et al.*, 1984). En México existe un gran número de especies

vegetales ampliamente distribuidas, que pueden ser evaluadas desde el punto de vista fitoquímico para determinar su actividad biológica sobre hongos fitopatógenos, como es el caso de *Flourensia cernua* DC (hojasén), la cual es muy abundante en las zonas áridas y semiáridas de México y de la que se han reportado efectos de inhibición sobre *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary con extractos metanólicos (Gamboa *et al.*, 2002), así como de *Colletotrichum* spp., con extractos hexánicos y contra termitas con extractos hexánicos, de éter dietílico y etanólicos (Tellez *et al.*, 2001). Los objetivos del presente estudio fueron: a) Probar el efecto inhibitorio de cuatro extractos de *F. cernua in vitro* en el desarrollo micelial y formación de conidios de tres hongos que afectan a frutos en postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc., y b) Identificar en forma preliminar, los grupos funcionales de compuestos presentes en los diferentes extractos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta del material vegetal. La colecta de las hojas de *F. cernua* (hojasén), se llevó a cabo en un sitio con gran abundancia de arbustos, en el ejido Guadalupe Victoria, Municipio de Saltillo, por la carretera 54 a Zacatecas, tomando plantas de una altura de 50 a 60 cm, con un diámetro de tallos de 5-6 cm, de las cuales se cortaron ramas de 10 a 12 cm con la mayor cantidad de hojas; el material cortado se depositó en bolsas de plástico para su traslado al laboratorio y fue colocado en un cuarto frío (4°C), las hojas se separaron de los

tallos, las cuales se guardaron en bolsas de polietileno en un congelador a -18°C hasta su extracción.

Obtención de extractos y rendimiento de resina. Este proceso se llevó a cabo utilizando 460 g de hojas con 2.5 L de disolvente en frascos de 4 L color ámbar, los que se agitaron mecánicamente a 150 rpm en un baño de agitación marca Brickman durante 22 h a temperatura ambiente ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$), para ello se realizó una extracción secuenciada con hexano, éter dietílico y etanol (Téllez *et al.*, 2001). Por otra parte, de otra cantidad igual de hojas (460 g), se realizó la extracción con la mezcla de metanol-cloroformo (1:1), bajo las mismas condiciones de agitación y temperatura. Al término de las extracciones, se filtró el extracto sobre papel Whatman No. 1 y se separó el disolvente de la resina en un rotavapor marca Buchii. El rendimiento de resina fue determinado gravimetricamente a 65°C .

Obtención de cepas de microorganismos. De frutos de tomate se aisló *A. alternata* y *C. gloeosporioides*, y de naranja se obtuvo *P. digitatum*, el crecimiento se realizó sembrando material vegetal infectado en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA Bioxon), posteriormente se aislaron por punta de hifa (Chairman *et al.*, 1978), se identificaron con apoyo de las claves de Rotem (1994), Messiaen *et al.* (1995) y se conservaron a temperatura de 27°C por un período de cuatro días, tiempo de crecimiento estándar para realizar la siembra del inóculo en medio envenenado para la evaluación antifúngica.

Bioensayo por medio envenenado. Se realizó agregando la cantidad requerida de extracto en el medio de cultivo PDA para obtener las concentraciones de 500, 1000, 2000 y 4000 mg/L de cada uno de los extractos,

y un testigo absoluto con solo medio de cultivo, el cual se vació en cajas Petri y se dejó por un período de 4 h en cámara de flujo laminar para permitir que el medio PDA gelificara sin contaminarse, después se inocularon las cajas Petri con el medio, colocando al centro una porción de la cepa de 0.45 cm de diámetro proveniente de cepas de cuatro días de desarrollo de los microorganismos bajo estudio.

Efecto en inhibición micelial y esporulación. Las lecturas de crecimiento micelial fueron diarias por un período de siete días. El por ciento de inhibición se determinó en base al crecimiento diametral de los hongos y al testigo absoluto, tomando dos lecturas en cruz por cada caja Petri; además, se tomaron datos del número de conidios a los siete días de la inoculación, tanto en los tratamientos como en el testigo, utilizando para ello una cámara de Neubauer (Hemacitómetro Hausser Scientific).

Efecto fungistático. Para definir el efecto fungistático, se tomó micelio de los tratamientos donde se presentó una inhibición del desarrollo del microorganismo por arriba del 50% a los cinco días de cada bioensayo, y se sembró por punta de hifa en medio no envenenado, para observar posible desarrollo.

Diseño experimental. Para cada microorganismo se evaluó el efecto de las resinas de *F. cernua* de los cuatro extractos, con cuatro concentraciones y un testigo absoluto (PDA), teniendo cuatro repeticiones para cada concentración, constando cada caja Petri como repetición. El análisis de los datos se realizó mediante un diseño de parcelas divididas AxB (Little and Hills, 1989); donde “A” fue el efecto de los extractos y “B” representó el efecto de las concentraciones,

la comparación de medias se realizó con DMS a 0.01 nivel de confianza usando el paquete estadístico SAS versión 6.12 (SAS Institute, Inc., 1996).

Espectroscopía de los extractos. Los espectros de infrarrojo de extractos fueron obtenidos por espectroscopía por transformadas de Fourier (FTIR). Los extractos fueron disueltos en cloroformo seco y un delgado film de la solución fue colocado en cristales de bromuro de potasio. Estos fueron analizados con un aparato FTIR Nicolet Magna 550, con una resolución de 4 cm^{-1} y 25 scans de barrido. Las bandas seleccionadas de los espectros fueron analizadas para evaluación preliminar de la composición.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de extractos. La mayor cantidad de resina se obtuvo con el extracto de metanol:cloroformo 1:1 (Cuadro 1), si bien, no se ha reportado extracción de *F. cernua* con esta mezcla, existen reportes de que metanol y cloroformo por separado, extraen mayor cantidad de resina de *Larrea tridentata* que con el etanol grado absoluto (Lira-Saldívar *et al.*, 2003). Por otra parte, los resultados de la extracción secuenciada en nuestro estudio, muestran mayores rendimientos que las resinas obtenidas por Téllez *et al.* (2001).

Inhibición micelial. *A. alternata*. Los valores de inhibición micelial promedio de los extractos de metanol:cloroformo (1:1), hexano y etanol fueron los más eficientes estadísticamente (LSD $P \leq 0.01$), con un promedio de 82.0, 81.6 y 80.3% respectivamente, siendo el de éter el menos eficiente con un promedio de 67.6% (Fig. 1A). Por otro lado, la mayor inhibición micelial observada fue de 91.9 y 88.4%, las que se presentaron con los extractos hexánico y el de

metanol:cloroformo ambos a 4000 mg/L, respectivamente. Estos resultados coinciden con los obtenidos con extractos de *Larrea tridentata*, los cuales fueron extraídos con cloroformo, etanol y metanol, en donde se evaluaron concentraciones similares a las de este trabajo, y a una dosis mayor de 8000 mg/L, la cual inhibió el crecimiento micelial de otra especie de *Alternaria* (*A. solani*) en un 100% (Saldívar *et al.*, 2003). *C. gloesporioides*. Las concentraciones de 500 mg/L de los extractos hexánico, metanol:cloroformico y etéreo, inhibieron en menos del 60% el crecimiento micelial de *C. gloesporioides* (Fig. 1B); sin embargo, el análisis estadístico reveló que el extracto etanólico presentó la mayor inhibición de 92.9% a 500 mg/L y fue el más eficiente con 85.8% de inhibición promedio, seguido por la concentración de 4000 mg/L del extracto metanol:cloroformico 1:1 expresó un 90.95% de inhibición micelial, el menor efecto se presentó con el éter, con 53.63% de inhibición promedio, estos resultados difieren de los obtenidos por Téllez *et al.* (2001) quienes evaluaron extractos de *F. cernua* sobre *C. gloesporioides*, y reportan que el extracto de éter presentó las mayores zonas de inhibición en bioensayos en placas de cromatografía de capa fina a dosis de 10 a 400 µg; el etanol por su parte inhibió únicamente a dosis de 400 µg, aunque a esta dosis la diferencia de inhibición fue poca, 10 mm para el extracto de éter y 9.7 mm para el de etanol, esta diferencia puede ser debida a que el método de los bioensayos fue distinto, pues en este estudio se utilizó un medio de cultivo propicio para el crecimiento del hongo, que permitió comparar el desarrollo del hongo sin tratar y el tratado. *P. digitatum*. El extracto más eficiente para inhibir el micelio de este moho verde, es el etanólico, con un promedio de inhibición de

95.8% (Fig. 1C), siendo el extracto de hexano el menos eficiente con 65.0%. La mayor inhibición se logró con el extracto etanólico desde 500 mg/L (94.2%) a 4000 mg/L (96.3%), variando esta de 94.21 a 96.34%, siendo los resultados estadísticamente iguales. Estos resultados concuerdan con evaluaciones de extractos etanólicos de semillas y hojas de huamúchil [*Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth.] que fueron eficientes contra *Penicillium* sp., sobre todo en los extractos de hojas y semillas de plantas bajo estrés. (Bautista-Baños *et al.*, 2003), por lo cual se puede señalar que la alta polaridad del etanol, permite extraer compuestos que inhiben el micelio de *Penicillium*.

Efecto fungistático. Las siembras por punta de hifa en medio de cultivo PDA, provenientes de cajas Petri con medios envenenados, que inhibieron en diferente grado a los tres hongos bajo estudio, se desarrollaron normalmente, al igual que el testigo, alcanzaron un crecimiento diametral de 7.3 cm a los seis días en el caso de *C. gloesporioides* y a los siete días en caso de *A. alternata* y *P. digitatum*, lo que confirma que el efecto de los cuatro extractos de *F. cernua* es fungistático.

Actividad antiesporulante. *A. alternata*. Los extractos que produjeron menor número de conidios de *A. alternata* respecto al testigo (Cuadro 2), fueron el etanol y metanol:cloroformo 1:1 ($P \leq 0.01$), sin embargo no se observó desarrollo de conidios con las concentraciones de 2000 y 4000 mg/L del extracto metanol:cloroformo 1:1, y a 4000 mg/L del extracto etanólico (Cuadro 3), esto pudo ser debido a que estos dos extractos presentaron la mayor inhibición micelial, por lo que es de esperarse que al haber menor cantidad de micelio, la producción de conidios también fuera menor; por otro lado, el extracto de éter

no afectó la esporulación, y un comportamiento inesperado se tuvo con el extracto hexánico, que había sido eficiente para inhibir el micelio de este hongo, al inducir mayor producción de conidias que el testigo a las concentraciones de 500, 1000 y 2000 mg/L (Cuadro 3), al respecto, se ha observado que algunas fuentes de carbono útiles para la esporulación de ciertos hongos, afectan la reproducción de otros y no necesariamente incrementan el crecimiento micelial (Greene y Barnett, 1951). *C. gloesporioides*. La producción de conidios de este hongo se vio más afectada por el extracto etanólico (Cuadro 3) a las concentraciones de 2000 y 4000 mg/L, y en el comportamiento promedio por extracto, los mejores fueron el extracto etanólico y el extracto de metanol:cloroformo a todas sus concentraciones (Cuadro 3), estos mismos extractos presentaron la mayor inhibición micelial del hongo, el extracto hexánico igual que para *A. alternata* aunque en menor proporción, estimuló mayor formación de conidios de *C. gloesporioides* a la concentración de 500 mg/L; por su parte, el extracto de éter también indujo al hongo a producir mayor número de conidios en comparación al testigo, Bautista-Baños *et al* (2002) reportan inhibición total de esporulación de *C. gloesporioides* con cinco extractos acuosos evaluados en proporción 10:4 v/v en PDA.

P. digitatum. Por lo que corresponde al efecto de los extractos de *F. cernua* en la producción de conidios de *P. digitatum*, los cuatro extractos afectaron la esporulación, aunque no hubo diferencia estadística entre ellos y entre sus concentraciones (Cuadro 2), al respecto el extracto etanólico de *Allium sativum* fue evaluado para inhibir desarrollo de *P. digitatum* sobre naranjas variedad Valencia; no fue muy efectivo cuando se utilizó solo, pero a la concentración de

1.0 % + 0.1 % de aceite comestible inhibió en un 100 % la germinación de conidios (Obagwu and Korsten, 2003). Por lo anterior, es conveniente considerar realizar mezclas de los extractos mas potenciales para evaluar un posible sinergismo en el control de estos patógenos. En forma general, la investigación del control de estos tres patógenos de postcosecha ha sido enfocada a evaluar el efecto de compuestos de origen natural tanto *in vitro* como en frutos inoculados, en este tópico, se han evaluado compuestos de origen natural como el quitosano (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2005), el cual resultó efectivo a 2.5% para inhibir esporulación, crecimiento vegetativo y germinación de esporas de *A. alternata* (Sánchez-Domínguez *et al.*, 2005), algunos agentes de control biológico inoculados a frutos han resultado muy efectivos, *Bacillus subtilis* disminuyó severidad de *C. gloesporioides* en frutos de mango (Carrillo-Fasio *et al.*, 2005). Por otra parte, los agentes de control biológico requieren condiciones óptimas de temperatura y humedad para su desarrollo y acción antagónica, lo que puede restarles efectividad, por lo que extractos de origen vegetal efectivos en el control de patógenos de postcosecha pueden ser integrados. Los resultados obtenidos en este estudio nos dan la pauta para continuar evaluando los extractos etanólico y de metanol:cloroformo en el control de estos patógenos en bioensayos *in vivo*.

Espectroscopía de infrarrojo. Los resultados de infrarrojo (Fig. 2) manifiestan que los cuatro extractos tienen el mismo tipo de grupos funcionales: hidroxilo, carbonilo, amina e hidrocarburos pero en diferente proporción. Esto sugiere que la composición y los compuestos específicos tienen más efecto en cada hongo. En general los seriales corresponden a hidroxilo, alquenos, aromáticos,

aminas y aldehídos, pero se requiere un análisis detallado para determinar los compuestos químicos determinados.

CONCLUSIONES

Los cuatro extractos de *F. cernua* presentaron efecto de inhibición micelial de *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Penicillium digitatum*, aunque no todos afectaron la esporulación de estos patógenos, los extractos mas eficientes para inhibir esporulación de *Alternaria alternata* y *Colletotrichum gloeosporioides* fueron el etanólico y el de metanol:cloroformo, este último extracto obtuvo el mayor rendimiento de resina. Los extractos presentaron mismos grupos químicos, pero en distinta proporción.

Agradecimientos. Los autores agradecen a la T. A. Maria Guadalupe Moreno Esquivel por su apoyo en la obtención de los extractos y al Ing. José Omar Cárdenas Palomo por su apoyo en la colecta de material vegetal, realización de bioensayos y toma de datos.

LITERATURA CITADA

- Anderson, B.S., Hunt, J.W., Phillips, B.M., Nicely, P.A., Vlaming, V. de, Connor, V., Richard N., and Tjeerdema, R.S. 2003. Integrated assessment of the impacts of agricultural drainwater in the Salinas River (California, USA). *Environmental Pollution* 124:523-532
- Bautista, B.S., García, D.E., Barrera, N.L., Reyes, Ch.R., and Wilson, C.L. 2003. Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and

extracts of huamuchil (*Pithecellobium dulce*): action against *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology* 29: 81-92

Bautista-Baños, S., Barrera-Necha, L. L., Bravo-Luna, L., and Bermúdez-Torres K. 2002. Antigonfal activity of leaf and stem extracts from various plant species on the incidence of *Colletotrichum gloeosporioides* of papaya and mango fruit after storage. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20: 8-12

Carrillo-Fasio, J.A., García-Estrada, R.S., Muy-Rangel, M.D., Sañudo-Barajas, A., Márquez-Zequera, I., Allende-Molar, R., De la Garza-Ruiz, Z., Patiño-Vera, M., y Galindo-Fentanes, E. 2005. Control biológico de antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] y su efecto en la calidad poscosecha del mango (*Mangifera indica* L.) en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:24-32.

Chairman, E.I.Z., Bird, G.W., Fisher, K.D., Hickey, K.D., Lewis, F.H., Line, R.F., and Rickard, S.F. 1978. Methods for evaluating plant fungicides, nematicides, and bactericides. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 141 p

Cooke, D.E.L., Young, V., Birch, P.R.J., Toth, R., Gourlay, F., Day, J.P., Carnegie, S.F., and Duncan, J.M. 2003. Phenotypic and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Scotland (1995-97). *Plant Pathology* 52:181-192

Gamboa, A.R, Hernández, F.D., Guerrero, E. y Sánchez, A. 2003. Inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Phytophthora infestans* Mont. (De Bary) con extractos vegetales metanólicos de hojasén

(*Flourensia cernua* D.C.), mejorana (*Origanum majorana* L.) y trompetilla (*Bouvardia ternifolia* (Ca.)Schlecht.) *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:13-18

Greene, L. V. and Barnett, H.L. 1951. *Physiology of the fungi*. McGraw-Hill Book Company, Inc. 1ª edición. New York. 464 p

Hernández-Lauzardo, A.N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M.G., Rodríguez-Ambriz, S.L., Corona-Rangel, M.L, Solano-Navarro, A., y Bosquez-Molina, E. 2005. Potencial del quitosano en el control de las enfermedades postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:198-205.

Lagunes, T. A., Arenas, S.C. y Rodríguez, H.C. 1984. Extractos acuosos y polvos vegetales con propiedades insecticidas. CONACYT-CP-UACH-DGSV. México, D.F. 203 p.

Leroux, P. 2003. Mode of action of agrochemicals towards plant pathogens. *Comptes Rendus Biologies* 326:9-21

Lira-Saldivar, R.H., Balvantín-García, G. F., Hernández-Castillo, F. D., Gamboa-Alvarado, R., Jasso-de-Rodríguez, D. and Jiménez-Díaz, F. 2003. Evaluation of resin content and the antifungal effect of *Larrea tridentata* (Sesse and Moc. Ex D.C.) coville extracts from two Mexican deserts against *Pythium* sp. Pringsh. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:97-101

Little, T.M. y Hills, F.J. 1989. *Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura*. Ed. Trillas. 2ª edición, 4ª Reimp. 2002. México. 270 p

Messiaen, C.M., Blancard D., Rouxel F. y Lafon R. 1995. *Enfermedades de las hortalizas*. Ed. Mundi-Prensa. 3ª edición. Madrid, España. 576 p.

- Montes, B.R. 2000. Evaluación de plantas antifúngicas y su potencial aplicación en la fitosanidad. Memorias XXXV Congreso Nacional de Entomología. Acapulco, Guerrero, México. 11-14 de junio. p. 835.
- Montes, B.R. y Figueroa, B.R. 1995. Biocontrol de hongos en granos almacenados. En: T.K. Bermúdez y A. Jiménez P. (eds.). Plantas: Biotecnología, Agronomía, Nutrición. COFAA-IPN. México. pp. 26-30.
- Obagwu, J. and Korsten, L. 2003. Control of citrus green and blue molds with garlic extracts. *European Journal of Plant Pathology*. 109:221-225
- Ramírez-Legarreta, M.R. y Jacobo-Cuéllar, J.L. 2002. Impacto ambiental del uso de plaguicidas en huertos de manzano del noroeste de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20:168-173
- Rotem J. 1994. The genus *Alternaria*; Biology, epidemiology and pathogenicity. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 326 p
- Saldívar, R.H., Sánchez, M.D., Gamboa, R., Jasso, D., and Rodríguez, R. 2003. Fungitoxic effect of *Larrea tridentata* resin extracts from the chihuahuan and sonoran mexican deserts on *Alternaria solani*. *Agroquímica* 47:54-60
- Sánchez-Domínguez, D., Gaspar-Martínez, J., Uribe-Figueroa, M., Bautista-Baños, S. 2005. Efecto del quitosano en el desarrollo *In vitro* de *Alternaria alternata*. Memorias XXXII Congreso Nacional de Fitopatología. Chihuahua, Chih., México. 26-29 de septiembre. L23
- SAS Institute, Inc. 1996. SAS/STAT Software: Changes and enhancements through release 6.12. SAS Inst., Cary, NC.

- Tellez, M., Estell, R., Fredrickson, E., Powell, J., Wedge, D., Schrader, K., and Kobaisy, M. 2001. Extracts of *Flourensia cernua* (L): volatile constituents and antifungal, antialgal, and antitermite bioactives. *Journal of chemical ecology* 27:2263-2285
- Tuset, J.J. 2000. Enfermedades durante la conservación. En: Duran-Vila, N. Y Moreno P. *Enfermedades de los cítricos*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. pp 99-102
- Whalen, M.M., Wilson, S., Gleghorn, C., and Loganathan, B.G. 2003. Brief exposure to triphenyltin produces irreversible inhibition of the cytotoxic function of human natural killer cells. *Environmental Research* 92:213-220.
- Wilson, C.L., Ghaouth, A.E., Chalutz E., Droby S., Stevens C., Lu J.Y., Khan V., and Arul J. 1994. Potencial of induced resistance to control postharvest diseases of fruit and vegetables. *Plant Disease* 78:837-844.
- Wilson, C.L., Ghaouth, A.E., and Wisniewski, M.E. 1999. Prospecting in nature's storehouse for biopesticides. *Revista Mexicana de Fitopatología* 17:49-53

Cuadro 1. Rendimiento de resinas extraídas de hojas de *Flourensia cernua* con cuatro solventes.

Solvente	Peso de Hojas en fresco (g)	Peso seco de resina (g)	Rendimiento (%)
MeOH:CHCl ₃ (1:1)	460	87.8	19.1
Hexano	460	26.6	5.8
Éter	460	44.2	9.6
Etanol	460	37.8	8.2

Cuadro 2. Comparación entre cuatro extractos de *Flourensia cernua* DC y entre cuatro concentraciones, sobre esporulación de tres patógenos de postcosecha.

Extractos	<i>Alternaria alternata</i>		<i>Colletotrichum gloesporioides</i>		<i>Penicillium digitatum</i>	
Solvente						
EtOH	0.93 ^x	b ^z	5.50 ^y	c	0.24 ^x	a
MeOH:CHCl ₃	0.26	b	5.76	c	0.18	a
Hexano	4.40	a	7.77	b	0.19	a
Éter	3.33	a	9.29	a	0.24	a
Concentración (ppm)						
0	3.13	a	8.07	a	0.61	a
500	2.78	ab	7.82	a	0.13	b
1000	2.66	ab	7.31	a	0.13	b
2000	1.63	ab	6.39	b	0.11	b
4000	0.94	b	5.80	b	0.08	b

^x Expresado en 1.0×10^5 conidios/ml

^y Expresado en 1.0×10^6 conidios/ml

^z Valores con la misma letra en la misma columna son estadísticamente iguales (LSD, $P \leq 0.01$)

Cuadro 3. Número de conidios/ml de tres patógenos de postcosecha por efecto de cuatro extractos de *Flourensia cernua* DC a cuatro concentraciones.

Solvente	Concentración	<i>Alternaria alternata</i>		<i>Colletotrichum gloesporioides</i>		<i>Penicillium digitatum</i>	
Testigo	0	3.13 ^x	a ^z	8.07 ^y	a	0.61 ^x	a
EtOH	500 ppm	0.06	b	7.44	ab	0.19	b
EtOH	1000 ppm	0.81	b	6.42	b	0.13	b
EtOH	2000 ppm	0.13	b	3.44	c	0.13	b
EtOH	4000 ppm	0.00	b	1.86	c	0.06	b
Testigo	0	3.13	a	8.07	a	0.61	a
MeOH:CHCl ₃	500 ppm	0.11	b	5.83	b	0.19	b
MeOH:CHCl ₃	1000 ppm	0.03	b	5.44	b	0.13	b
MeOH:CHCl ₃	2000 ppm	0.00	b	5.47	b	0.06	b
MeOH:CHCl ₃	4000 ppm	0.00	b	5.46	b	0.00	b
Testigo	0	3.13	abc	8.07	ab	0.61	a
Hexano	500 ppm	7.44	a	9.13	a	0.00	b
Hexano	1000 ppm	6.50	ab	7.81	abc	0.13	b
Hexano	2000 ppm	3.13	bc	7.01	bc	0.13	b
Hexano	4000 ppm	0.75	c	6.29	c	0.13	b
Testigo	0	3.13	a	8.07	b	0.61	a
Éter	500 ppm	3.50	a	8.89	a	0.13	b
Éter	1000 ppm	3.31	a	9.57	a	0.13	b
Éter	2000 ppm	3.25	a	9.62	a	0.13	b
Éter	4000 ppm	3.00	a	9.60	a	0.13	b

^x Expresado en 1.0×10^5 conidios/ml

^y Expresado en 1.0×10^6 conidios/ml

^z Valores con la misma letra en la misma columna son estadísticamente iguales (LSD, $P \leq 0.01$)

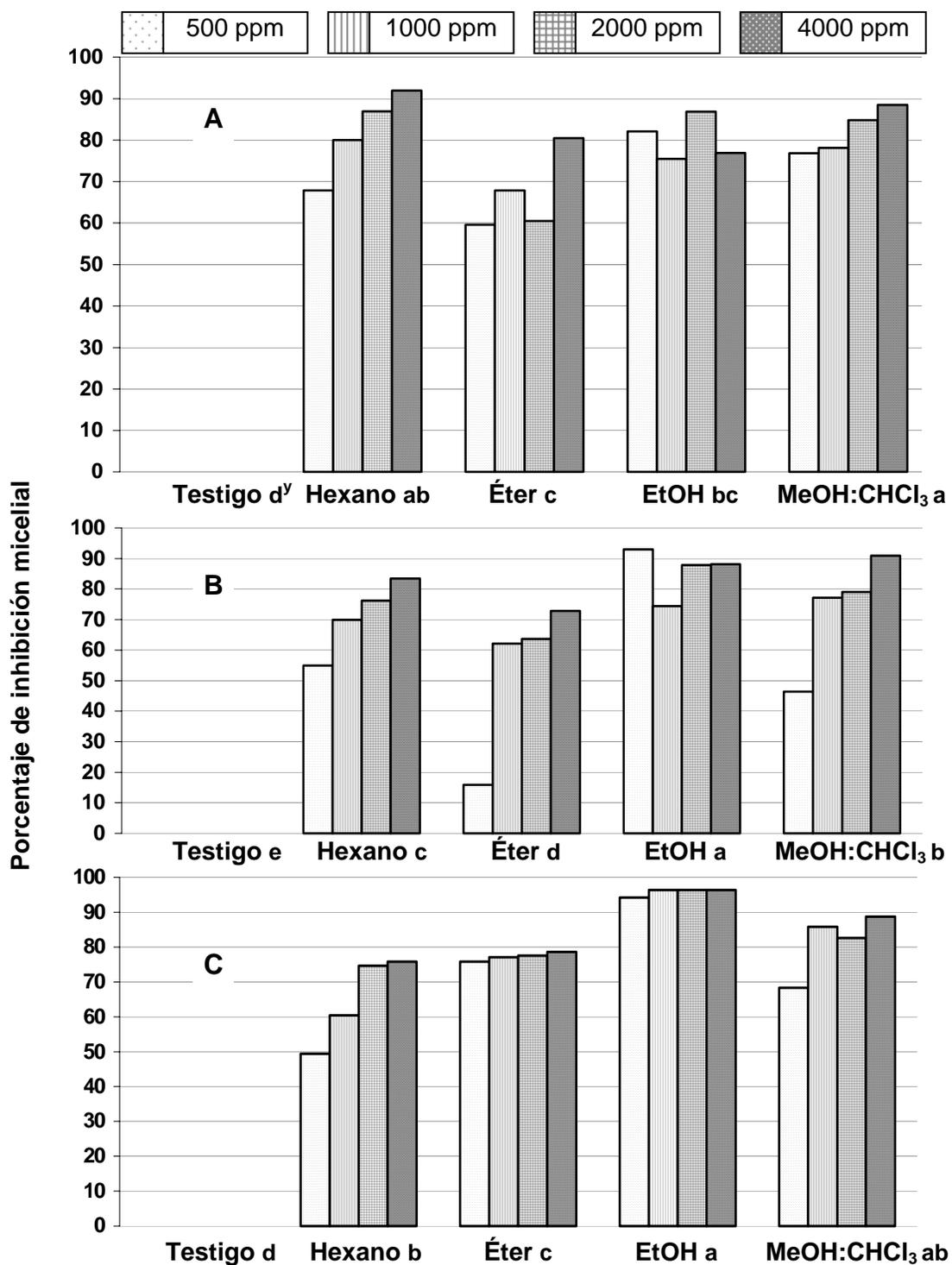


Fig. 1. Porcentaje de inhibición micelial de cuatro extractos de *Flourensia cernua* DC a cuatro concentraciones sobre tres patógenos de postcosecha. A) *Alternaria alternata*, B) *Colletotrichum gloesporioides* y C) *Penicillium digitatum*.^y $P \leq 0.01$ (LSD).

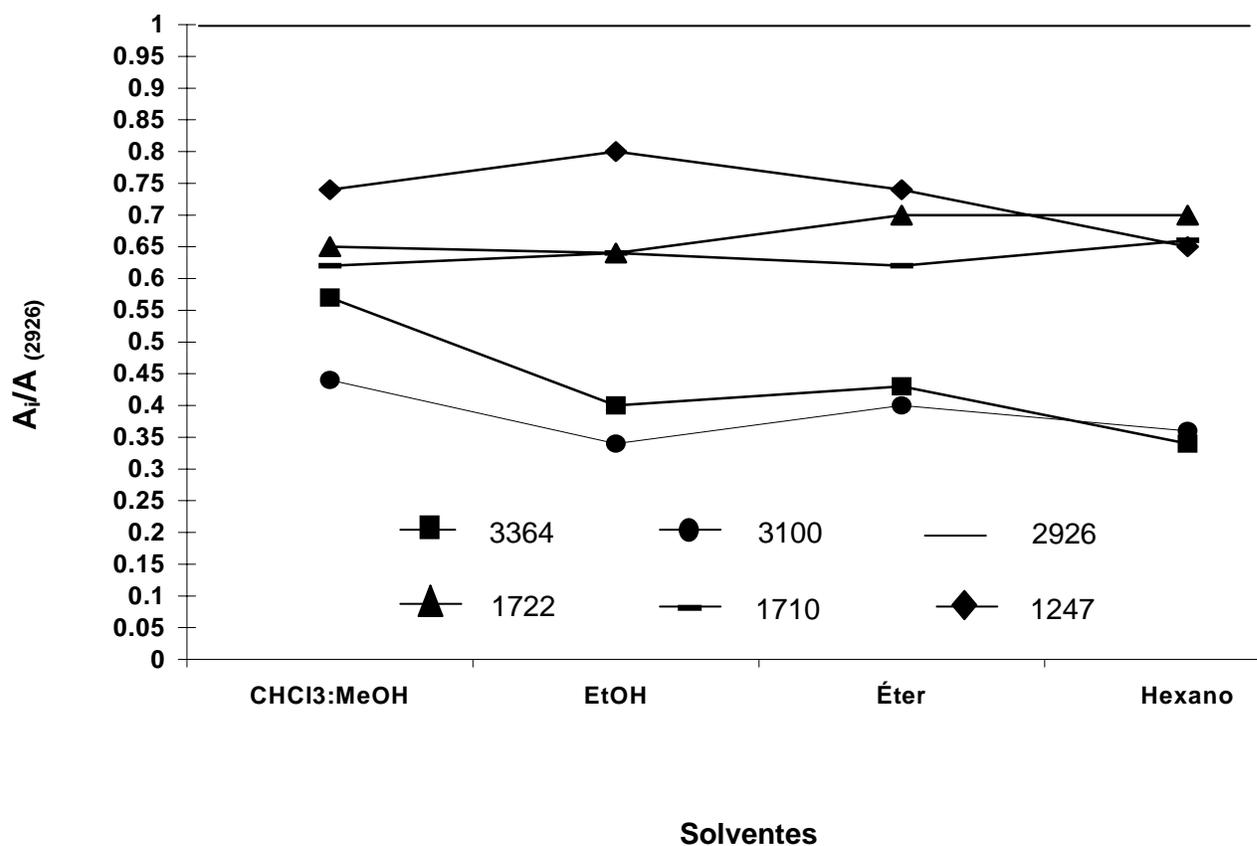
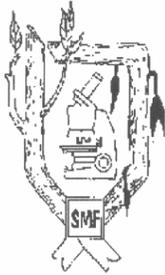


Figura 2. Resultados de espectrofotometría de infrarrojo por transformadas de Fourier de extractos de *Flourensia cernua* DC extraídos con cuatro solventes de polaridad variable.



SOCIEDAD MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA, A.C.

Mayo 09, 2007

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente, se hace constar que el artículo 0610-4 titulado, "Actividad Biológica *In Vitro* de Extractos de Flouencia Cernua DC en Patógenos de Postcosecha: *Alternaria Alternata* (Fr.: Fr.) Keissl., *Colletotichum gloeosporoides* (Penz.) Penz. Y Sacc. y *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc. ", autores: Eugenio Guerrero-Rodriguez, Susana Solis-Gaona, Daniel Hernández-Castillo, Victor Sandoval-López y Diana Jasso-Cantú fue aceptado para publicarse en la Revista Mexicana de Fitopatología Vol. 25 (2007).

Se expide la presente constancia para los fines que a los interesados convengan.

Atentamente,

Dr. Guillermo Fuentes Dávila
Editor en Jefe, Revista Mexicana de Fitopatología

INIFAP-CIRNO

Norman E. Borlaug, Km. 12 entre 800 y 900
Valle del Yaqui
Apdo. Postal 155
Cd. Obregón, Sonora, México CP 85000
Tel. 644-4141940, 4145799; Fax 644-4145898
e-mail: guillermofuentes_davila@hotmail.com

Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.
<http://members.tripod.com/~sociedad/Sociedad.htm>
Abreviada <http://www.Sociedad.cjb.net>

**ANTIFUNGAL ACTIVITY IN VITRO OF *Flourensia cernua* EXTRACTS
AGAINST SOIL PATHOGENIC FUNGI**

**Susana Solís-Gaona¹, Eugenio Guerrero-Rodríguez^{1*†}, Diana Jasso-Cantú²,
Daniel Hernández-Castillo¹, Adolfo Galván Cendejas¹.** ¹ Departamento de
Parasitología Agrícola. ² Departamento de Fitomejoramiento. Universidad
Autónoma Agraria Antonio Narro C.P. 25315. Saltillo, Coahuila, México. Tel:
8444110226. e-mail: susysolgao@gmail.com

ABSTRACT

Extracts from *Flourensia cernua* DC, were obtained with methanol:chloroform (1:1) and sequential extraction with hexane, diethyl ether, and ethanol to evaluate the inhibition effect on mycelial growth of soil pathogens *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*, also the effect of extracts on spore inhibition of *Fusarium oxysporum*. The evaluated concentrations were 500; 1,000; 2,000 and 4,000 $\mu\text{l l}^{-1}$ with a control of PDA as culture media. Functional groups in the extracts were identified by FTIR. The highest resin extraction (19.17 %) was obtained with methanol:chloroform mixture. Mycelial inhibition was best with the ethanol fraction on *Fusarium oxysporum* (94.53 % at 4,000 $\mu\text{l l}^{-1}$) and *Phytophthora capsici* 100 % from 1,000 to 4,000 $\mu\text{l l}^{-1}$. Whereas *Rhizoctonia solani* was inhibited 100 % with 2,000 $\mu\text{l l}^{-1}$

of methanol:chloroform extract. It must be mentioned that all extracts showed fungistatic effect. Related to spore formation inhibition on *Fusarium oxysporum*, the methanol:chloroform extract was the most effective at 2000 $\mu\text{l l}^{-1}$ (76.7 %) and 4,000 $\mu\text{l l}^{-1}$ (77.8 %). The extracts FT-IR spectra showed the same type of functional groups (hydroxyl, amine, carbonyl and hydrocarbon) but at different concentration. The results showed that ethanol and methanol:chloroform extracts are more efficient for inhibition than the ether extract.

Keywords

Flourensia cernua, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*

INTRODUCTION

The use of chemical control of pathogenic fungi is common in several crops although chemicals may affect essential functions of microorganisms and higher organisms (Leroux, 2003) such as cellular respiration. The immoderate use of chemicals caused toxicity, allergies, irritation, etc. (Whalen *et al.*, 2003) to the person applying them, as well as damage to environmental and to beneficial microorganisms such as entomopathogens and microbial flora (Anderson *et al.*, 2003; Bettinetti *et al.*, 2003; Ferraro *et al.*, 2003) and also favored the development of resistant microorganisms (Cooke *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2003; Rivero *et al.*, 2003). Root rotting and vascular withering are the most harmful illness, widely spread all over the world in more than 80 species of plants. The pathogens in the soil causing this damage grow in all types of soils and weather,

affecting both seedling production in greenhouses and developed crops (Recorbet *et al.*, 2003; Flynn, 1995). Plant extracts are an alternative for pest control because its residual time is lower than that of synthetic chemicals and are efficient against phytopathogenic microorganisms (Montes y Figueroa, 1995; Wilson *et al.*, 1999; Montes, 2000). For example, the methanol extract from the leaves of Asteraceae *Flourensia cernua* DC is effective against *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora infestans* (Gamboa *et al.*, 2003) whereas the hexane extract controls *Colletotrichum* spp (Téllez *et al.*, 2001).

The present study aimed for the evaluation of *in vitro* inhibition of *Flourensia cernua* extracts on mycelia growth of three soil microorganisms and the conidia inhibition on *Fusarium oxysporum*. Also, preliminary identification of functional groups in the extract was obtained.

MATERIALS AND METHODS

The *Flourensia cernua* sampling was carried out at the Guadalupe Victoria Ejido, Saltillo municipality, with plants of 0.5 to 0.6 m height, stem diameter 5 to 6 cm. Apical parts from the 10 to 12 cm branches were cut, stored in plastic bags and transported to the laboratory and stored at 4 °C. The leaves were separated from the branches and stored in plastic bags at -18 °C for further analysis.

Extract and resin

yield

Leaves extracts of 460 g were carried out with 2.5 L solvent in 4 L, amber flasks with mechanical agitation (150 rpm). A sequential extraction was carried out starting with hexane, followed by diethyl ether and finally ethanol at room

temperature (Téllez *et al.*, 2001) for 22 h. Alternatively the same weight of leaves was extracted with a methanol:chloroform mixture under the same agitation and temperature conditions. The extracts were filtered through a Whatman No 1 paper and the solvent evaporated by rotary evaporation. The resin yield was determined gravimetrically at 65°C.

Fungi production

The fungi used in this study were obtained by seeding infected material in PDA culture media and later isolated by the hiphae point technique (Anguiz, 1989). The *F. oxysporum* and *R. solani* were seeded in PDA whereas *P. capsici* was seeded in Agar- V8 media. Temperature was maintained at 27 °C and incubation time was four days, this time was defined for the explants sown in poisoned media for antifungal evaluation.

Extracts activity

Evaluation of antifungal activity was performed in PDA media (Bioxon) and Agar- V8 at extract concentrations of 500; 1,000; 2,000 y 4,000 $\mu\text{l l}^{-1}$ having as a reference the growing media without extract. The culture media were poured in Petri dishes and gel formation was allowed 4h (PDA) and 12 h (Agar- V8) in a laminar flow chamber. Inoculation of the Petri dishes was performed at the center of the dish with 0.45 cm explants collected after four days of seeding.

Mycelial inhibition

The mycelial growth data was collected every day for a seven days period. The inhibition percentage was calculated with respect to the diameter growth of the control, taking two measurements in cross at every Petri dish.

Spore formation

The *Fusarium oxysporum* conidia number in the Petri dishes was measured seven days after inoculation for quantification of spore formation inhibition using a Neubauer chamber (Hausser Scientific). The reference was the absolute control. This measurement was not performed in the other fungi because *R. solani* does not produce spores and the experimental conditions did not allow the process in *P. capsici*.

Pathogens control

For evaluation of the effect on fungi and the *P. capsici* alga, mycelia from the treatments where inhibition was higher than 50 %, five days after seeding, was seeded by hyphae point in a media without *F. cernua* extract.

Experiment design

The effect of *F. cernua* extracts (4 solvents) on each microorganism was evaluated applying four concentrations and an absolute control (PDA for fungi and Agar-V8 for *P. capsici* Oomycetae). Each determination was performed four times and each Petri dish was considered as a repetition. The data analysis was performed with a divided plots design AXB (Little y Hills, 1989), where "A" was the solvent effect, and "B" that of the concentration. The means comparison was carried out with LSD at a 0.01 significant level.

Extracts spectroscopy

Infrared spectroscopy was carried out using KBr encapsulation of the extracts, the bands selected were analyzed for composition evaluation.

RESULTS AND DISCUSSION

Extract yield

The resin extraction was 19.1 % with the methanol-chloroform mixture. No reports were found for *F. cernua* extracts with this mixture, although methanol and chloroform extract high amounts of resin from *Larrea tridentata*, and the absolute ethanol extraction is lower (Lira, 2002). The extraction using sequenced solvents was 5.79% for hexane, 9.61 with ether and 8.21 with ethanol. These results were higher than those reported by Tellez *et al* (2001).

Mycelial inhibition

Fusarium oxysporum

The four extracts results are shown in Figure 1, the ethanol fraction showed the highest inhibition ($P \leq 0.01$) with an average value of 90.0 % whereas the ether inhibition (55.6%) was the lowest. The highest inhibitions 93.1 and 94.5 % were obtained with 2,000 and 4,000 $\mu\text{l l}^{-1}$ ethanol extract. The methanol-chloroform extract at 4000 $\mu\text{l l}^{-1}$ showed 91.5 % inhibition. Reported inhibition for extracts of *Melia azedarach* (Carpinella *et al.*, 2003) coincide with the highest inhibition for the ethanol fraction. Also, methanol extracts of 23 plants from the Uttaranchal mountains significantly inhibited *F. oxysporum* (Arora and Kaushik, 2003).

Rhizoctonia solani

The extracts with better mycelia inhibition were methanol-chloroform and ethanol (Fig. 2) there was a statistically significant difference (LSD 0.01) among them, the average value was 98.3 % for methanol-chloroform and 92.46 % for ethanol extracts. The ether fraction was the less effective, 62.58 %. Total inhibition was observed with the methanol-chloroform extract from 2,000 $\mu\text{l l}^{-1}$.

Other bioassays of methanol extracts of *F. cernua* on *R. solani* reported inhibition of 86.2 % (Gamboa *et al.*, 2002) even when concentrations were five times higher than those used in this work. This might be due to high temperatures used for Soxhlet extraction.

Phytophthora capsici

The ethanol extract showed the best result on inhibition (Fig. 3) with an average value of 99.1 % whereas the less efficient 55.83 % (LSD 0.01) was the methanol-chloroform extract and the hexane extract at 4,000 $\mu\text{l l}^{-1}$ inhibition values was higher than 90 %. Total inhibition was achieved with the ethanol extract starting at 1,000 $\mu\text{l l}^{-1}$. Gamboa *et al.* (2002) reported values of 88.4 % on *P. infestans* for concentration five times higher than ours, in this case extraction was also carried out by Soxhlet.

Anti-spore activity

The conidia diminishing in *F. oxysporum* by the extracts is shown in Figure 4, the best agent was the methanol-chloroform extract at 2,000 and 4,000 $\mu\text{l l}^{-1}$ with inhibition values of 76.7 and 77.8 %, No inhibition was observed at 500 $\mu\text{l l}^{-1}$ for this extract.

Infrared spectroscopy

The infrared results (Table 1) showed that the four extracts have the same type of functional groups hydroxyl, carbonyl, amine and hydrocarbons but at different ratios. This suggested that composition and specific compounds have more effect on each fungi.

CONCLUSIONS

The highest resin extraction was obtained with a mixture of methanol-chloroform (1: 1)

Mycelial inhibition was highest for *F. oxysporum* and *P. capsici* with ethanol extracts at 4,000 to 1,000 $\mu\text{l l}^{-1}$ respectively. However for *R. solani* the highest effect was achieved with 2,000 $\mu\text{l l}^{-1}$ of the methanol-chloroform extract.

Spore production inhibition was obtained with the mentioned mixture at 4000 $\mu\text{l l}^{-1}$

BIBLIOGRAPHY

Anderson, B. S., J. W. Hunt, B. M. Phillips, P. A. Nicely, V. De Vlaming, V.

Connor, N. Richard y R. S. Tjeerdema. 2003. Integrated assessment of the impacts of agricultural drainwater in the Salinas River (California, USA). *Environmental Pollution* 124:523-532.

Anguiz, R. 1989. Anastomosis group's pathogenicity and other characteristics of *Rhizoctonia solani* isolated from potatoes in Peru. *Plant Diseases* 73:199-201.

Arora, C. y R.D. Kaushik. 2003. Fungicidal activity of plants extracts from Uttaranchal hills against soybean fungal pathogens. *Allelopathy Journal* 11(2):217-227.

Bettinetti, R., C. Giarei y A. Provini. 2003. Chemical analysis and sediment toxicity bioassays to assess the contamination of the River Lambro (Northern Italy). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45:72-78.

- Carpinella, M.C., L.M. Giorda, C.G. Ferrayoli y S.M. Palacios. 2003. Effects of different organic extracts from *Melia azedarach* L. on phytopathogenic fungi and their isolated active components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(9):2506-2511.
- Cooke, D. E. L, V. Young, P.R.J. Birch, R. Toth, F. Gourlay, J.P. Day, S.F. Carnegie y J.M. Duncan. 2003. Phenotypic and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Scotland (1995-97). *Plant Pathology* 52(2):181-192.
- Fernández, P. S.P., G. Rodríguez y J.M. Sánchez. 2003. Buckeye rot of tomato caused by *Phytophthora capsici* in Michoacan, Mexico. *Plant Disease* 87(7):872.
- Ferraro, D. O., C. M. Ghera y G. A. Sznajder. 2003. Evaluation of environmental impact indicators using fuzzy logic to assess the mixed cropping systems of the Inland Pampa, Argentina. *Agriculture Ecosystems & Environment* 96:1-18.
- Flynn, P. 1995. Wilt diseases of tomato. *Plant pathology*. Iowa State University. Ames, Iowa, USA. 120 p
- Gamboa, A.R, F. D. Hernández, E. Guerrero y A. Sánchez. 2003. Inhibición del crecimiento Micelial de *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Phytophthora infestans* Mont. (De Bary) con extractos vegetales metanólicos de Hojasén (*Flourensia cernua* D.C.), Mejorana (*Origanum majorana* L.) y Trompetilla (*Bouvardia ternifolia* (Ca.)Schlecht.) *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:13-18.

- Leroux, P. 2003. Mode of action of agrochemicals towards plant pathogens. *Comptes Rendus Biologies* 326(1):9-21.
- Lima, G., F. DeCurtis, R. Castoria y V. DeCicco. 2003. Integrated control of apple postharvest pathogens and survival of biocontrol yeasts in semi-commercial conditions. *European Journal of Plant Pathology* 109(4):341-349.
- Lira, S. R.H., G. F. Balvantín, F. D. Hernández, R. Gamboa, D. Jasso y F. Jiménez. 2002. Evaluation of resin content and the antifungal effect of *Larrea tridentata* (Sesse and Moc. Ex D.C.) coville extracts from two Mexican deserts against *Pythium* sp. Pringsh. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:97-101
- Little, T.M. y F.J. Hills. 1989. Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. Ed. Trillas. 2ª edición, 4ª Reimp. 2002. México. 270 p.
- Montes, B. R., 2000. Evaluación de plantas antifúngicas y su potencial aplicación en la fitosanidad. Memorias XXXV Congreso Nacional de Entomología. 835 p.
- Montes, B. R. y B. R. Figueroa. 1995. Biocontrol de hongos en granos almacenados. pp 26-30. *In: Plantas: Biotecnología, Agronomía, Nutrición.* Bermúdez T., K. y A. Jiménez P. (eds.). COFAA-IPN. México.
- Recorbet, G., C. Steinberg, C. Olivain, V. Edel, S. Trouvelot, E. DumasGaudot, S. Gianinazzi y C. Alabouvette. 2003. Wanted: pathogenesis-related marker molecules for *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist* 159(1):73-92.

- Rivero, B. F., R. Sotomayor y V. Rivera. 2003. Resistencia de *Phytophthora infestans* (Montagne) De Bary a Metalaxil, en cultivo de papa en el norte de Chile. *Agricultura Técnica* 63(2):117-124.
- Tellez, M., R. Estell, E. Fredrickson, J. Powell, D. Wedge, K. Schrader y M. Kobaisy 2001. Extracts of *Flourensia cernua* (L): volatile constituents and antifungal, antialgal, and antitermite bioactives. *Journal of chemical ecology* 27:2263-2285.
- Whalen, M. M., S. Wilson, C. Gleghorn y B. G. Loganathan. 2003. Brief exposure to triphenyltin produces irreversible inhibition of the cytotoxic function of human natural killer cells. *Environmental Research* 92:213-220.
- Wilson, C. L., A. E. Ghaouth, y M. E. Wisniewski. 1999. Prospecting in nature's storehouse for biopesticides. *Revista Mexicana de Fitopatología* 17:49-53.

Table 1. Infrared results for the *Flourensia cernua* extracts with different solvents.

Signal (cm ⁻¹)	Extract			
	Hexane	Ether	Ethanol	Methanol- chloroform
	Signal relative concentration (%)			
3500	6.7	6.9	7.2	9.5
2928	21.0	16.9	18.1	16.8
2868	14.4	11	10.9	11.7
1736	13.9	10.5	11.5	10.0
1710	14.5	12	11.5	10.3
1645	6.8	11.2	9.7	10.9
1627	7.9	9.9	11.2	10.5
1603	4.8	11.6	9.9	10.2
1024	7.3	5.8	6.9	6.9
835	2.7	4.2	3.2	3.4

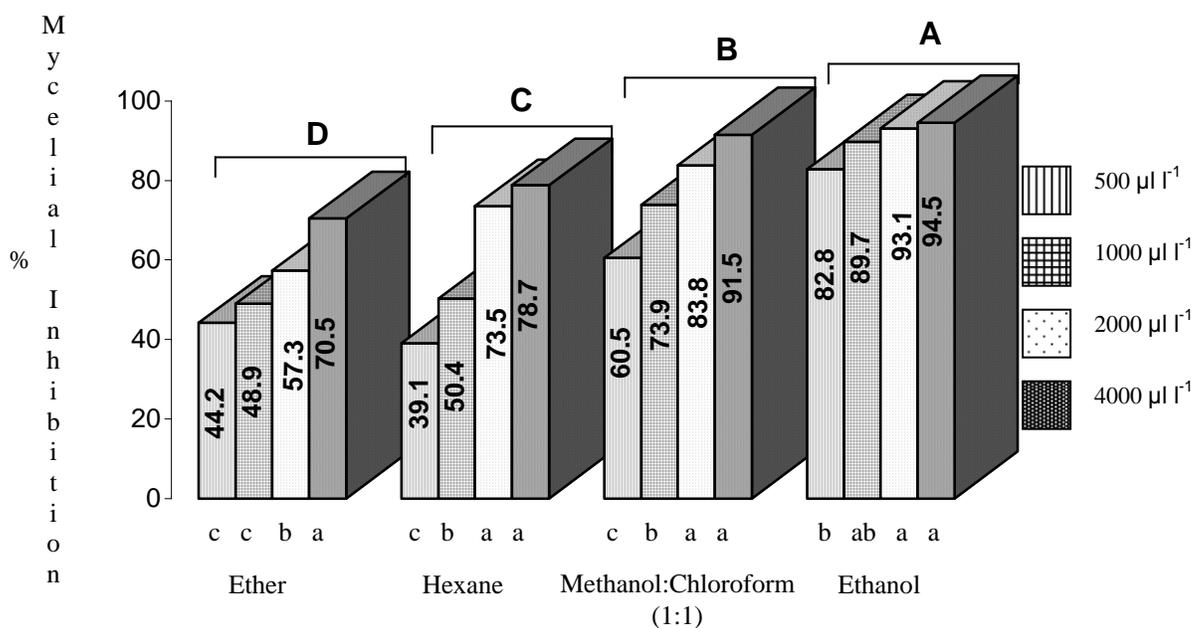


Figure 1. Average of mycelial inhibition of *Fusarium oxysporum* by effect of *Flourensia cernua* extracts in four concentrations

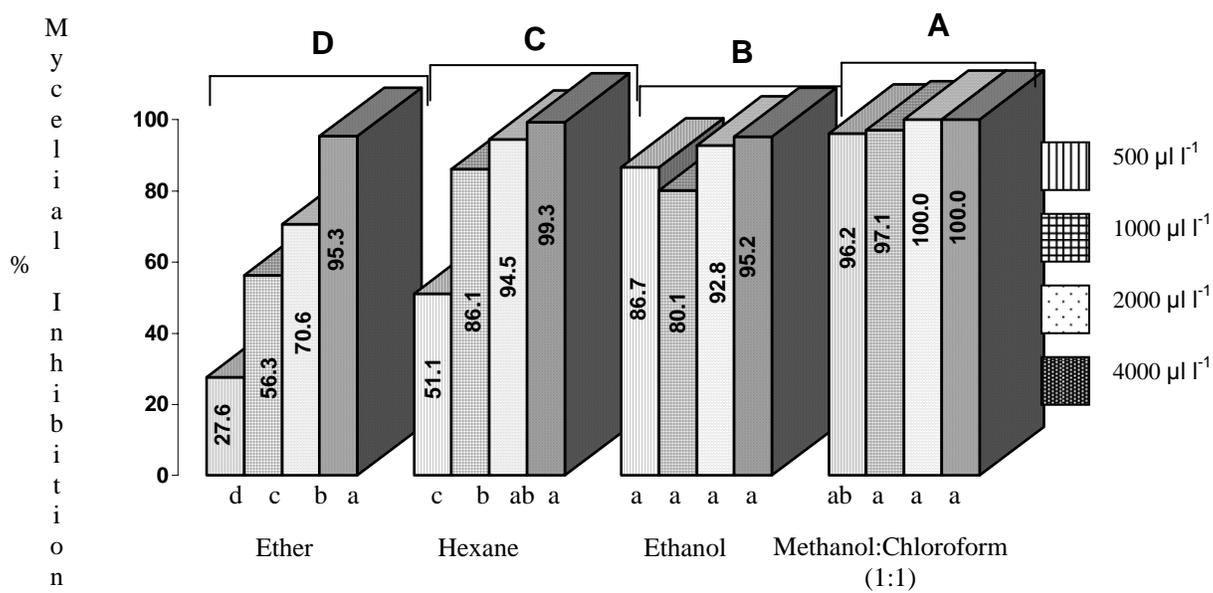


Figure 2. Average of mycelial inhibition of *Rhizoctonia solani* by effect of *Flourensia cernua* extracts in four concentrations

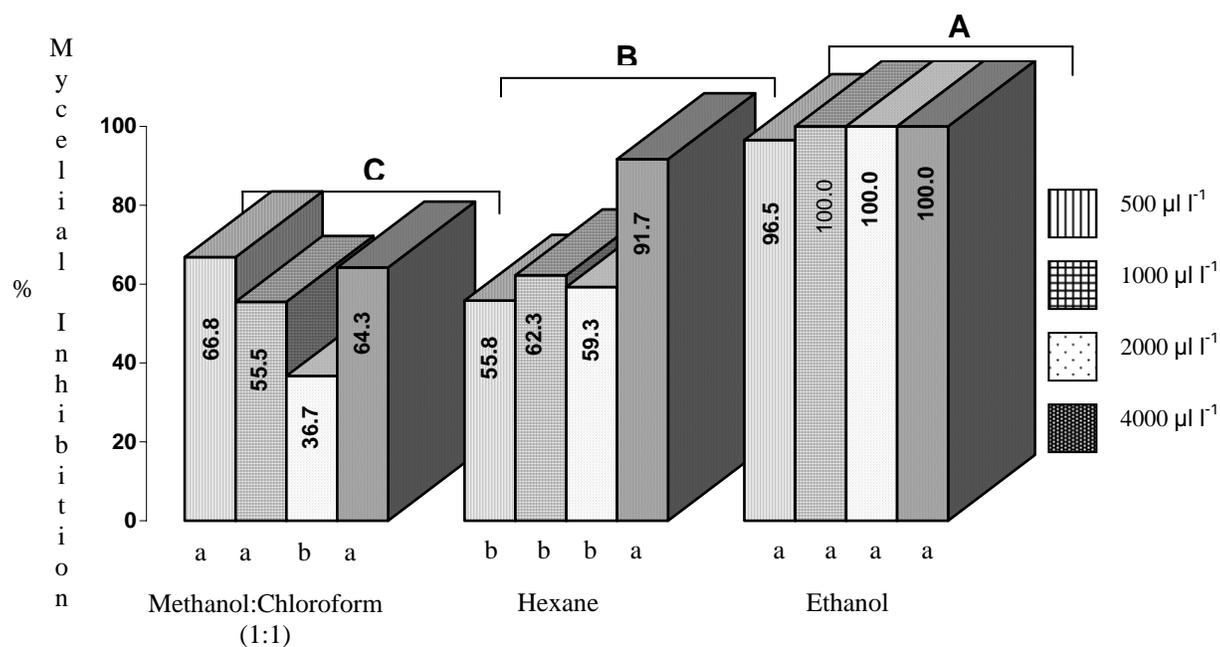


Figure 3. Average of mycelial inhibition of *Phytophthora capsici* by effect of *Flourensia cernua* extracts in four concentrations

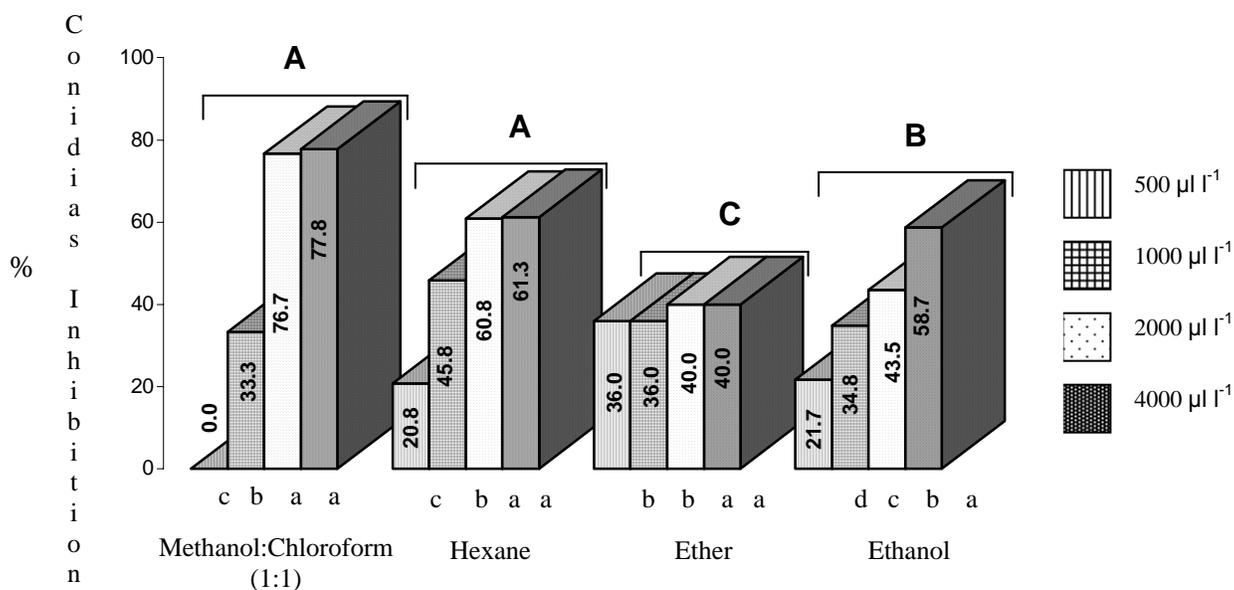


Figure 4. Sporulation inhibition of *Fusarium oxysporum* by effect of *Flourensia cernua* extracts in four concentrations

**¹ACTIVIDAD DE EXTRACTOS DE *Flourensia cernua* D.C. EN BACTERIAS
FITOPATOGENAS *in vitro* / *Flourensia cernua* D.C. ACTIVITY EXTRACTS
IN PHYTOPATHOGENIC BACTERIA *in vitro***

**Eugenio Guerrero Rodríguez^{1†}, Diana Jasso Cantú², José E. Peralta Bello¹,
Susana Solís Gaona¹ y F. Daniel Hernández Castillo¹.** ¹Departamento de
Parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista,
Saltillo, Coahuila, México. CP 25315. ²Departamento de Fitomejoramiento.
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila,
México. CP 25315.

RESUMEN

En este trabajo, se evaluaron cuatro extractos de *Flourensia cernua* DC sobre la inhibición de las bacterias fitopatógenas *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli*, *Pectobacterium caratovora* Subs. *atroseptica* y *Pseudomonas cichorii*. Se utilizaron concentraciones de los extractos a 500; 1,000; 2,000 y 4,000 $\mu\text{l ml}^{-1}$, además de un testigo con solo medio KB. Se identificaron por FT-IR los grupos funcionales presentes en los cuatro extractos. La mayor inhibición de *X. axonopodis* se presentó con el extracto hexano (82.5 % a 4000 $\mu\text{l ml}^{-1}$) y sobre

[†]Este artículo es *In Memoria* del Dr. Eugenio Guerrero Rodríguez, Director de tesis a quien Dios lo llevó a su lado, antes de la culminación de este trabajo.

P. cichorii 83.9 % a 4,000 $\mu\text{l ml}^{-1}$. Ninguno de los extractos mostraron inhibición de *P. carotovora subsp. atroseptica*. Los espectros de infrarrojo de los extractos muestran que los cuatro extractos tienen el mismo tipo de grupos funcionales (hidroxilo, aminas, carbonilo e hidrocarburos) aunque en diferentes proporciones. El extracto hexánico fue el que presentó actividad bactericida.

Palabras clave: Hojasén, *Xanthomonas axonopodis pv phaseoli*, *Pectobacterium carotovora* Subs. *atroseptica*, *Pseudomonas cichorii*.

ABSTRACT

In this study, were evaluated four extracts from *Flourensia cernua* DC on inhibition of *Xanthomonas axonopodis pv phaseoli*, *Pectobacterium carotovora subsp atroseptica* y *Pseudomonas cichorii*. The evaluated concentrations were 500; 1,000; 2,000 and 4,000 $\mu\text{l ml}^{-1}$ with a control of KB as culture media. Functional groups of the extracts were identified by FT-IR. Inhibition was best with the hexane extract on *X. axonopodis* (82.5 % at 4,000 $\mu\text{l ml}^{-1}$) and *P. cichorii* 83.9 % at 4000 $\mu\text{l ml}^{-1}$. Neither of extracts showed inhibition on *P. carotovora* pv. *atroseptica*. The FT-IR spectra of the extracts showed the same type of functional groups hydroxyl, amine, carbonyl and hydrocarbon, but at different concentration. The results showed that hexane extract had the most efficient bacterial activity.

Key words: Hojasén, *Xanthomonas axonopodis pv phaseoli*, *Pectobacterium carotovora subsp atroseptica*, *Pseudomonas cichorii*.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias fitopatógenas son responsables de fuertes pérdidas económicas en la agricultura, afectando tanto cultivos intensivos como extensivos. La importancia económica de las bacterias en cultivos es variable pero por ejemplo en Canadá por ataque de *Xanthomonas axonopodis* se estiman pérdidas hasta de 38 %, en Colombia las estimaciones son de 22 % de daños en infecciones naturales y hasta del 45 % en condiciones inducidas; en tanto que en Estados Unidos en 1976 se estimaron pérdidas de 4 millones de dólares (Kennedy y Alcorn, 1980). Por otra parte Cartin y Fucikouisky (1981) señalan pérdidas de hasta 29 % en rendimientos por *Pectobacterium (Erwinia) caratovora* en el cultivo de la papa; a su vez French (1977), considera esta enfermedad como una de las más importantes en Latino América. Por lo que concierne a *Pseudomonas cichorii* en varias regiones del mundo no se considera un problema primario, pero en países como Italia causa ataques epidémicos. En Japón y en Estados Unidos es económicamente importante en el cultivo de lechuga (Messiaen *et al.*, 1995). Para el combate de estos microorganismos en muchos países del mundo se recurre al uso de cobres y de antibióticos como la oxitetraciclina y la estreptomicina; Aunque el uso de estos dos últimos en diversos países de Europa está prohibido en atención al potencial problema de generar resistencia a bacterias patógenas en hombre y animales domésticos (Heilig *et al.*, 2002).

Actualmente se conoce que los metabolitos secundarios de algunas plantas pueden presentar diversos tipos de actividad en distintos organismos plaga (Prakash y Rao, 1997; Domingo y López-Brea, 2003). Otros

investigadores reportan actividad sobre hongos fitopatógenos (Alcalá de Marcano *et al.*, 2005), insectos (Pérez-Pacheco *et al.*, 2004) y nemátodos (Adegbite y Adesiyun, 2005). En cuanto a bacterias Taguri *et al.* (2006), mencionan efectos sobre *Pseudomonas*, Satish *et al.* (1999), sobre *Xanthomonas* y Mehmet (2004), sobre *Pectobacterium* (*Erwinia*). En caso de *Flourensia cernua* D.C. (Hojasén) se han demostrado efectos fungistáticos (Gamboa *et al.*, 2003; Jasso *et al.*, 2007; Guerrero-Rodríguez *et al.*, 2007). Por otro lado Dayan y Tellez (1999) y Mata *et al.* (2003) demostraron que los metabolitos secundarios de esta Asterácea afectan el desarrollo de otras plantas. En México, sus hojas se usan en la medicina tradicional en forma de té para atender problemas de digestión. Sin embargo, no se tiene conocimiento de su efecto sobre bacterias fitopatógenas.

Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue determinar si los extractos de *F. cernua* obtenidos con hexano, éter, etanol y de la mezcla metanol:cloroformo manifiestan actividad antibacterial sobre *Pseudomonas cichorii* (*Pc*), *Xanthomonas axonopodis* pv, *phaseoli* (*Xap*) y *Pectobacterium caratovora* subsp. *atroseptica* (*Pca*).

MATERIALES Y METODOS

Colecta del material vegetal

La colecta de las hojas de hojasén, se llevó a cabo en un sitio con gran abundancia de esta Asterácea, en el municipio de Guadalupe Victoria, Saltillo, Coahuila, por la carretera 54 a Zacatecas, durante los meses de marzo a septiembre de 2005. Se seleccionaron plantas de una altura de 50-60 cm y con

un diámetro de tallos de 5-6 cm, se cortaron las puntas de las ramas con mayor cantidad de hojas, tomando ramas de 10-12 cm de longitud. El material cortado se colocó en bolsas de plástico negro para su traslado a un cuarto frío a 4 °C. Posteriormente, se separaron las hojas de los tallos y se guardaron en bolsas de polietileno en un congelador a -18 °C hasta su utilización.

Obtención de los extractos de *F. cernua*

Se colocaron 460 g de hojas en frascos de 4 L color ámbar, con 2.5 L de solvente y se siguió una técnica de extracción secuenciada con hexano, éter dietílico y etanol (Téllez, 2001). La extracción con la mezcla de metanol y cloroformo en proporción 1:1 se realizó por separado, con la misma cantidad de hoja y solvente. Todas estas mezclas se sometieron a agitación a 150 rpm en un baño María de agitación mecánica (Brickman) a temperatura ambiente 25 ± 2 °C por 22 h. Al término de la extracción con cada solvente, se filtró sobre papel Wathman No. 1 y el solvente de la resina presente, se separó en un rotavapor Buchii. Las temperaturas de ebullición fueron para; hexano 60 ± 2 °C, éter 38 ± 2 °C, etanol 66 ± 2 °C y para metanol: cloroformo 55 ± 2 °C.

Obtención e identificación de bacterias

Para *Pc* se colectaron hojas de lechuga en cultivos comerciales de Colombia, Nuevo León, que presentaron halos cloróticos cuya consistencia fue acuñosa. Este material se lavó con agua destilada estéril, y se procedió a macerar al tejido y a la siembra, por diluciones en el medio de B de King. Se incubó a 28 ± 2 °C por 4 días, se seleccionaron aquellas colonias que presentaron fluorescencia, característica típica de este género bacteriano en dicho medio de cultivo, para ello se utilizó una lámpara de luz ultravioleta. En

caso de *Xap* se colectaron ejotes de frijol de la región de Navidad, Nuevo León, que presentaron lesiones hundidas de carácter acuanoso. Este material se aisló, se maceró y se sembró por diluciones en el medio de Tween B a 28 ± 2 °C por 4 días, La selección de colonias fue en atención a que presentaran un color amarillo brillante de tipo mucóide y un halo blanquecino producto de la hidrólisis del Tween.

Para la *Pca* se colectaron tubérculos de papa en la zona papera de Navidad, Nuevo León, que presentaron pudriciones blandas y se tomó el inóculo del margen café oscuro de la lesión, Posteriormente se maceró y se sembró por diluciones en el medio B de King. La siembra se incubó a $28 + 2$ °C, y la selección de colonias se realizó en atención a la característica de “superficie- enrejillada” al observar en el estereoscopio con luz indirecta, el color fue blanquecino- transparente con bordes irregulares de consistencia butirosa.

Los análisis bioquímicos para la caracterización de las bacterias para género, especie, subespecie o patovar se presentan en los Cuadros 1 y 2. Para *Pc* se utilizó el método recomendado por Braun-Kiewnick y Sands (2001); para *Xap* por el establecido por Schaad *et al.* (2001), y para *Pca* por lo citado por DeBoer y Kelman (2001). Las pruebas de patogenicidad que se realizaron de acuerdo a estos autores fueron para *Pc*: aspersion de la suspensión bacteriana acorde a la escala de Mac Farland 10^6 ; para *Xap* punción en vainas de frijol ejotero y para *Pca* inoculación en rodajas de papa.

Transferencia de Bacterias

Se realizaron transferencias de las colonias bacterianas a medios de cultivo estériles de B de King, por medio de estrías seriadas para obtener

colonias aisladas. La incubación fue por 24 h a una temperatura de 28 °C, estas colonias se manipularon con la técnica de diluciones para determinar la concentración que permitiera determinar el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC ml⁻¹), para ser contadas con facilidad. La siembra se realizó por dispersión y se incubó por el mismo periodo y temperatura.

Realización de los Bioensayos

Una vez que se obtuvieron los extractos y las bacterias a utilizar, se establecieron los bioensayos evaluando las siguientes concentraciones: 500; 1,000; 2,000 y 4,000 µl ml⁻¹, de los cuatro extractos de *F. cernua* para las tres especies de bacterias. Se utilizó para ello la técnica del medio envenenado en cajas Petri, en el medio de cultivo K-B. Previo al vaciado a las cajas, se agregó el extracto a la concentración correspondiente. Las muestras se diluyeron en 5 ml del solvente para la concentración mayor, reduciéndose a la mitad en cada concentración subsecuente de los tratamientos. La distribución de las concentraciones se realizó de tal manera que el medio fuera lo más homogéneo con el extracto.

Se cuantificó el número de colonias con ayuda de un lector de colonias a 24 h, con estos datos se estimó el porcentaje de inhibición, tomando el número de UFC en el testigo como el 100 % mediante la fórmula siguiente: % Inhibición Colonial = 100 – (Crecimiento Colonial del Tratamiento x 100/ Crecimiento Colonial Testigo).

Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó un diseño experimental bifactorial completamente al azar, con dos variables; donde A fue el efecto de los extractos, y B representa el efecto de las concentraciones. Se utilizaron seis tratamientos con cuatro repeticiones involucrando un testigo absoluto con solo K-B y un testigo convencional con oxitretetraciclina a la concentración de 0.8 g l^{-1} ($48 \mu\text{l ml}^{-1}$).

El análisis de varianza de los datos se realizó con el programa estadístico SAS, (1996), las comparaciones de medias de los tratamientos fue mediante la prueba de Tukey ($P = 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas bioquímicas

En el Cuadro 1 se muestran los resultados de las pruebas que permitieron diferenciar los tres géneros de bacterias en estudio que son: *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Pectobacterium*. Para las bacterias provenientes de lechuga, en el Cuadro 2, se presenta la serie de pruebas que permitió ubicar a las *Pseudomonas* dentro del grupo III, como formadoras de pigmentos fluorescentes. Las pruebas fisiológicas permitieron caracterizarla como *P. cichorii*. En el Cuadro 2 se muestran también las pruebas bioquímicas que ayudaron a identificar como *X. axonopodis* pv. *Phaseoli* a las bacterias provenientes de ejote de frijol; y como *P. caratovora* subsp. *atroseptica* a las bacterias procedentes de brotes de manzano.

En las pruebas de patogenicidad para *Pc* en cuanto a la aspersión de la suspensión bacteriana de acuerdo a la escala de Mac Farland 10^6 , el resultado fue positivo ya que se observó pudrición de hojas de lechuga. En cuanto a *Xap* con la prueba de punción de vainas de frijol ejotero se observó formación de lesiones. Por último para *Pca* en la inoculación en rodajas de papa se observó el crecimiento de la placa bacteriana.

Actividad bactericida de *F. cernua*

Las diluciones permitieron un crecimiento colonial promedio de 565 UFC ml^{-1} para *Xap* en la dilución 10^{-4} , en el caso de *Eca* la dilución de $10^{-3.5}$ presentó un promedio de 122.5 UFC ml^{-1} . Con respecto a *Pc* corresponden 57 UFC ml^{-1} a la misma dilución anterior. La actividad antibacteriana de los cuatro extractos sobre las tres bacterias bajo estudio, expresado en por ciento de inhibición se muestra en el Cuadro 4. Todos los extractos mostraron actividad sobre *Xap* y *Pc*, sin embargo, ninguno mostró efecto de inhibición cuando se evaluaron sobre *Pca*. El extracto que mostró la mayor inhibición de *Xap* y *Pc* fue el hexánico de *F. cernua* a la concentración de 4000 $\mu\text{l ml}^{-1}$ con 82.51 % y 83.96 %, respectivamente ($P \leq 0.05$), los demás extractos presentaron menor actividad. En análisis anteriores de caracterización de compuestos de aceites obtenidos por arrastre de vapor de extracto hexánico de *F. cernua* se reportan 41 compuestos volátiles. La mayoría fueron monoterpenoides de los cuales el limoneno y myrceno presentaron la mayor proporción con 27.7 y 19.9 % respectivamente. Estos compuestos no fueron encontrados en extracto obtenido con solvente mas polar como el etanol, aunque si estuvieron presentes al igual que otros 30 compuestos en menor proporción, en el de éter (Tellez et

al., 2001). En este trabajo, el extracto de éter siguió al de hexano en eficiencia de inhibición sobre *Xap* ($P \leq 0.01$). El limoneno ha sido reportado con variable e incluso nula actividad antimicrobial (Aggarwal *et al.*, 2002; Tsunezi *et al.*, 2006). El myrceno por su parte presentó efecto antibacterial antagónico al mezclarse con penicilina (Gallucci *et al.*, 2006). Por lo que es posible que estos compuestos por si solos no le confieran la actividad bactericida a *F. cernua*, sino la mezcla sinérgica de todos o algunos de los 41 compuestos contenidos en el aceite del extracto hexánico. Esto hace necesario fraccionar este extracto para evaluar sus fracciones sobre *Xap* y *Pc* y caracterizar los compuestos presentes en la fracción más efectiva.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la T.A. Cristina Sánchez Flores por su apoyo en los análisis de la presente investigación

BIBLIOGRAFÍA

- Adegbite, A. A. y Adesiyan, S.O. 2005. Root Extracts of Plants to Control Root-Knot Nematode on Edible Soybean. *World Journal of Agricultural Sciences* 1: 18-21.
- Aggarwal, K. K., Khanuja, S. P. S., Ahmad, A., Kumar T. R. S., Gupta y V. K., Kumar S. 2002. Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. *Flavour and fragrance journal* 17:59-63.
- Alcalá de Marcano, D., Vargas, N. y Pire, A. 2005. Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial *in vitro* de

- Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis basicota*. Revista Facultad de Agronomía (LUZ) 22: 315-323.
- Cartin, L. F. y L. Fucikovsky. 1981. Distribución de la pierna negra de la papa en México y la supervivencia de las bacterias causales. Fitopatología 16 (20): 55-59.
- Domingo, D. y López-Brea, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. Revista Española de Quimioterapia 16:385-393.
- French, E. R. 1977. Enfermedades bacterianas de la papa en Latinoamérica. Fitopatología 12 (2): 87-96.
- Gallucci, N., Casero, C., Oliva, M., Zygadlo, J. y Demo, M. 2006. Interaction between terpenes and penicillin on bacterial strains resistant to beta-lactam antibiotics. Molecular Medicinal Chemistry 10:30-32.
- Gamboa, A.R, Hemández, F. D., Guerrero, E., Sánchez, A. 2003. Inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora infestans* Mont. (De Bary) con extractos vegetales metanólicos de hojásén (*Flourensia cernua* D.C.), mejorana (*Origanum majorana* L.) y trompetilla (*Bouvardia ternifolia* (Ca.)Schlecht.) Revista Mexicana de Fitopatología 21: 13-18.
- Guerrero-Rodríguez, E., Solís-Gaona, S., Hernández-Castillo, F.D., Sandoval-López, V. y Jasso-Cantú, D. 2007. Actividad biológica in vitro de extractos de *Flourensia cernua* DC en patógenos de postcosecha *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. Revista Mexicana de Fitopatología 25:(en prensa).

- Heilig, S., Lee, P. y Breslow, L. 2002. Curtailing antibiotic use in agriculture
Western Journal of Medicine 176:9-11.
- Jasso de R., D., Hernández-Castillo, D., Angulo-Sánchez, J. L., Rodríguez-García, R., Villarreal-Quintanilla, J. A. and Lira-Saldivar, R.H. 2007. Antifungal activity in vitro of *Flourensia* spp. extracts on *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*. Industrial Crops and Products 25:111-115.
- Kennedy, B. W. y S. M. Alcorn. 1980. Estimation of US crop losses to prokaryote plant pathogens. Plant Diseases 64: 614-676.
- Mata, R., Linares, E., Macias, M. R., Pérez, O. y Timermann, B. N. 2003. Phytotoxic Compounds of *Flourensia cernua*. Phytochemistry. 64:285-295
- Mehmet Nuri. 2004. In Vitro Studies on Some Natural Beverages as Botanical Pesticides against *Erwinia amylovora* and *Curtobacterium flaccumfaciensis* subsp. Poinsettiae. Turky Journal Agricultural Forestal 28: 57-61.
- Messiaen, C.M., Blancard D., Rouxel F. y Lafon R. 1995. Enfermedades de las hortalizas. Ed. Mundi-Prensa. 3ª edición. Madrid, España. 576 p.
- Pérez-Pacheco, R., Rodríguez Hernández, C., Lara-Reyna, J., Montes-Belmont, R. y Ramírez Valverde, G. 2004. Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Acta Zoológica Mexicana 20: 141-152.
- Prakash, A. y J. Rao. 1997. Botanicals pesticides in agriculture. CRC Lewis Publishers. New York, USA. 461 p.
- SAS Institute, Inc. 1996. SAS/STAT Software: Changes and enhancements through release 6.12. SAS Inst., Cary, NC.

- Satish, S., Raveesha, K. A. y Janardhana, G. R. 1999. Antibacterial activity of plant extracts on phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pathovars. Letters in Applied Microbiology 28:145-147.
- Schaad, N. W., J.B. Jones y G. H. Lacy. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, 3rd ed. Minnessota, USA. 398 p.
- Tsunezi, Sh. M., Franco, B. L. de J., Oliveira, R. R.F., Sallowicz, F.A, Frankland, S. A. C. y Maio, M. M.O. 2006. Essential oil of *Lithraea molleoides* (vell.): chemical composition and antimicrobial activity. Brazilian Journal of Microbiology 37:556-560.
- Taguri, T., Tanaka, T., y Kouno I. 2006. Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl Structure. Biology Pharmacology Bulletin 29:2226-2235.

Cuadro 1. Pruebas bioquímicas para caracterización de los géneros de las bacterias fitopatógenas

Pruebas	<i>Pectobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Xanthomonas</i>
Gram	(-)	(-)	(-)
Forma de célula	bacilar	bacilar	bacilar
Prueba de Ryu	(+)	(+)	(+)
Flagelos	(+) flagelos	(+) polar	(+) polar
Catalasa	(+)	(+)	(+)
Pigmentos fluorescentes	(-)	(+)	(+)
Oxidasa	(-)	(+)	(-)

Cuadro 2. Pruebas bioquímicas para caracterizar a las tres bacterias fitopatógenas

<i>Pseudomonas cichorii</i>		<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>		<i>Pectobacterium carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	
Prueba	Respuesta	Prueba	Respuesta	Prueba	Respuesta
(LOPAT)					
Levana	(-)				
Oxidasa	(+)				
Pudrición de papa	(-)				
Arginina	(-)				
Reacción de hipersensibilidad en tabaco	(+)				
Oxidación/fermentación	(+/-)	Oxidación/fermentación	(+/-)	Oxidación/fermentación	(+/-)
Reducción de nitratos	(-)	Formación de ácido de arabinosa	(+)	Formación de ácido de arabinosa	(+)
Crecimiento en NaCl 2 %	(-)	Digestión de proteína	(+)	Sorbitol	(-)
Crecimiento a 37 °C	(-)	Crecimiento mucoide en YDC	(+)	Melibiosas	(+)
Licuefacción de gelatina	(-)	Crecimiento en SX	(+)	Citrato	(+)
Manitol	(+)	Hidrólisis de almidón	(+)	Arabitol	(-)
Celobiosas	(-)	Hidrólisis de esculin	(+)	Lactosa	(+)
Sorbitol	(-)	Crecimiento a 40 °C	(+)	Crecimiento a 37 °C	(-)
Trehalosa	(-)	Levana	(+)	Fosfatasa	(-)
Sucrosa	(-)	H ₂ S de cisteína	(+)	Degradación de pectatos	(+)
				Licuefacción de gelatina	(+)
				Reducción de sustancias de sucrosa	(+)
				H ₂ S de cisteína	(+)

Cuadro 3. Pruebas de patogenicidad para cada especie de bacteria (Schaad et al., 2001)

Especie	Prueba	Establecimiento
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	Vainas de frijol (Punción)	(+)
<i>P.cichorii</i>	Plántulas de lechuga, aspersión de suspensión bacteriana, concentración según escala de Mac Farland de 10^6	(+)
<i>E. caratovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	Rodajas de papa (Inoculación)	(+)

Cuadro 4. Interacción de extractos-concentración de *Flourensia cernua* D.C. del porcentaje de inhibición de UFC ml⁻¹ de 3 bacterias a 24 h de incubación

Extractos y concentración (µl l ⁻¹)	Pc	Inhibición de UFC ml ⁻¹								
		A	B	Xap	A*	B**	Eca	A	B	
Hexano	500	1.89		a	37.23		a	0		a
	1000	26.41	B	ab	51.55	C	ab	0	A	a
	2000	44.34		b	74.77		b	0		a
	4000	83.96		c	82.51		c	21.73		b
Eter	500	0		a	2.41		a	11.01		c
	1000	12.95	A	ab	0	B	a	5.29	A	b
	2000	17.27		b	2.08		a	0		a
	4000	47.48		c	63.44		b	3.96		ab
Etanol	500	18.7		a	0		a	4.58		a
	1000	20.87	A	ab	0	A	a	5.6	B	ab
	2000	43.04		b	1.47		a	13.49		c
	4000	52.17		c	14.73		b	9.92		b
Metanol: cloroformo	500	0		a	0		a	5.93		c
	1000	6.77	A	b	0	A	a	3.56	A	a
	2000	0		a	17.46		b	3.86		a
	4000	0		a	0		a	4.91		b

Pc = *Pseudomonas cichorii*

Xcp = *Xanthomonas axenopodis* pv.
phaseoli

Eca = *Pectobacterium caratovora* subsp. *atroseptica*

* A = Extracto (Tukey P = 0.05)

** B = Concentración (Tukey P = 0.05)

**ACTIVIDAD BIOINSECTICIDA, REPELENCIA Y ATRACCIÓN DE
EXTRACTOS DE *Flourensia cernua* D.C. / BIOINSECTICIDE ACTIVITY,
REPELLENCY AND ATTRACTION OF *Flourensia cernua* D.C. EXTRACTS**

**Eugenio Guerrero-Rodríguez[†], Susana Solís-Gaona, Diana Jasso-Cantú y
Francisco Daniel Hernández-Castillo.** Universidad Autónoma Agraria Antonio
Narro C.P. 25315. Programa de Doctorado en Ciencias en Parasitología
Agrícola, Saltillo, Coahuila, México. e-mail: susysolgao@gmail.com

RESUMEN

Extractos de *Flourensia cernua* DC fueron obtenidos con metanol:cloroformo (1:1) y por extracción secuenciada con hexano, éter dietilo y etanol, para evaluar el efecto insecticida sobre tres insectos plaga de importancia agronómica mundial: *Brevycorine brassicae*, *Phthorimaea operculella* y *Sitophilus oryzae*. El efecto atrayente fue evaluado sobre el gorgojo *Sitophilus oryzae*. Las concentraciones evaluadas fueron 2,500; 5,000; 10,000; 20,000 y 40,000 $\mu\text{l l}^{-1}$ además de un testigo sin tratar. La mayor cantidad de resina fue extraída con la mezcla metanol:cloroformo (19.17 %). Todos los extractos mostraron efecto bioinsecticida únicamente sobre *B. brassicae*. Respecto al efecto de repelencia o atracción sobre *S. oryzae*, el extracto hexánico presentó repelencia y el extracto etanólico en sinergismo con costales de yute presentó

[†] Este artículo es *In Memoria* del Dr. Eugenio Guerrero Rodríguez, Director de tesis a quien Dios lo llevó a su lado, antes de la culminación de este trabajo.

efecto de atracción.

Palabras clave: *Brevycorine brassicae*, *Phthorimaea operculella*, *Sitophilus oryzae*, hojasén.

ABSTRACT

Extracts from *Flourensia cernua* DC were obtained with methanol:chloroform (1:1) and sequential extraction with hexane, diethyl ether, and ethanol to evaluate the insecticide effect on three pest with world agricultural importance: *Brevycorine brassicae*, *Phthorimaea operculella* and *Sitophilus oryzae*, the attractant effect was evaluated on *Sitophilus oryzae* grain pest. The evaluated concentrations were 2,500; 5000; 10,000; 20,000 and 40,000 $\mu\text{l l}^{-1}$ with a control. The highest resin extraction (19.17 %) was obtained with methanol:chloroform mixture. All extracts showed a bioinsecticide effect only on *B. brassicae*. Related to attractant and repellent effect on *S. oryzae*, the hexane extracts showed repellence and the ethanolic extract had synergism with yute sacks as attractance on *S. oryzae*.

Additional keywords: *Brevycorine brassicae*, *Phthorimaea operculella*, *Sitophilus oryzae*, hojasen.

INTRODUCCION

Los insecticidas botánicos tienden a poseer un amplio espectro de acción, son relativamente específicos en su modo de acción y fáciles de procesar y usar; además, son seguros para los animales superiores y para el ambiente (Wilson *et al.*, 1999; Elzen *et al.*, 2003). La mayoría de las especies

de plantas que se utilizan en protección vegetal exhiben un efecto insectistático más que insecticida (Silva *et al.*, 2005). Es decir, inhiben el desarrollo normal de los insectos de varias maneras; alteran la metamorfosis, evitan que ésta se produzca en el momento y tiempo preciso (Sanguanpong *et al.*, 2001), afectan la alimentación, este último es el modo de acción más estudiado de los compuestos vegetales como insecticidas (Das *et al.*, 2007).

El uso de extractos vegetales con propiedades repelentes que protegen a las plantas del ataque de insectos, haciendo su alimentación o condiciones de vida poco atractivas u ofensivas, también ha sido estudiado, (Viglianco *et al.*, 2006). Por otro lado, los compuestos químicos de una determinada planta constituyen efecto de atracción que puede ser utilizado como trampa para que el insecto tenga muchas fuentes de estímulo y no sea capaz de reconocer la planta que nos interesa proteger.

Los áfidos constituyen uno de los grupos de insectos de mayor importancia mundial, por los daños que producen a los cultivos al succionar savia, taponar sus estomas y al producir melanina. Además, los pulgones transmiten cerca del 50 % de los virus que afectan a las plantas; y a través de su capacidad reproductiva y la aparición de formas aladas pueden dispersarlos a grandes distancias (Botto *et al.*, 1995), ya se han reportado plantas con actividad sobre áfidos (Ricci *et al.*, 2006).

Otro insecto plaga de importancia mundial es *Sitophilus oryzae*, que ocasiona grandes daños en granos almacenados y sobre esta plaga se han evaluado efectos insectistáticos de extractos vegetales (Viglianco *et al.*, 2006). En el cultivo de papa, la palomilla de la papa representa un grave problema

dado que afecta los tubérculos tanto en almacén, como desde el campo. Sobre esta plaga existen también reportes de evaluación de productos de plantas (Niroula y Kamini, 2004). Tomando en cuenta lo antes mencionado, debemos considerar a todos aquellos compuestos que sabemos que su efecto es principalmente insectistático como preventivos más que como curativos.

Téllez *et al.* (2001), encontraron que extractos obtenidos con los solventes hexano, éter dietílico, y etanol mostraron ser eficientes en el control de termitas. Por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad bioinsecticida de resinas de hojas de hojásén, extraídas con cuatro disolventes de polaridad variable sobre tres insectos plaga de importancia agronómica: *Sitophilus oryzae* (Linnaeus), *Phthorimaea operculella* (Zeller), y *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus), así como su efecto de repelencia o atracción sobre *S. oryzae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de extractos de *F. cernua*

Se utilizaron 460 g de hojas con 2.5 L de disolvente en frascos de 4 L color ámbar. Los frascos se agitaron mecánicamente a 150 rpm en un baño de agitación marca Brickman durante 22 h a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Posteriormente se realizó una extracción secuenciada con hexano, éter dietílico y etanol (Téllez *et al.*, 2001). De otra cantidad igual de hojas (460 g), se realizó la extracción con la mezcla de metanol-cloroformo (1:1), bajo las mismas condiciones de agitación y temperatura. Al término de las extracciones, se filtró el extracto sobre papel Whatman No. 1 y se separó el disolvente de la resina en

un rotavapor marca Buchii. El rendimiento de resina fue determinado gravimétricamente.

Cría de insectos

En el caso del *S. oryzae*, se desarrolló todo el ciclo del insecto en granos de maíz cacahuazintle con 10 % de humedad a temperatura de 25 °C. Mientras que *B. brassicae*, se colectó directamente de poblaciones de campo infestando plantas de repollo. Previo al bioensayo se seleccionaron pulgones adultos libres de exuvias y no parasitados. La palomilla de la papa *P. operculella* se multiplicó utilizando tubérculos de papa.

Bioensayos

Las técnicas utilizadas para evaluar los extractos crudos de *F. cernua* variaron dependiendo del insecto, no así las concentraciones: 40,000; 20,000; 10,000; 5,000 y 2,500 $\mu\text{l l}^{-1}$, además de un testigo absoluto y un testigo comercial neem. Para el pulgón de la col, *B. brassicae*, se utilizó la técnica de inmersión de porciones de hojas de 4 x 4 cm, con 50 a 100 pulgones en las concentraciones de los extractos y se cuantificaron los individuos muertos a las 24, 48 y 72 h. Para la evaluación sobre palomilla de la papa, también se realizó bioensayo por inmersión de larvas de primer estadio contenidas en la superficie de tubérculos. En el caso de *S. oryzae*, se evaluaron por la técnica de película residual en frascos Gerber y granos tratados. Para ello se utilizó el solvente particular de cada extracto crudo, cada frasco y 100 granos que se tomaron como una repetición. Se colocaron diez gorgojos por frasco y 15 en los granos. Las lecturas de mortalidad se realizaron por 24, 48 y 72 h.

El efecto de atracción o repelencia de los extractos de hojasén, se evaluó sobre *S. oryzae* por la técnica de película residual en costales de yute y rafia de 15 x 20 cm. El conteo de individuos vivos y muertos dentro de los costales de yute y/o rafia se realizó a los cinco y 40 días posteriores a la aplicación de concentraciones de los extractos por película residual. Se calculó porcentaje de atracción y repelencia.

El análisis de los datos se efectuó procesándolos en Polo PC para obtener la CL50 y CL90, ANVA y comparación de medias en SAS, (1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto bioinsecticida

Los resultados muestran que los extractos no provocaron mortalidad a 24 y 48 h ($P \leq 0.05$) en palomilla de la papa, ni en gorgojos en los bioensayos de película residual en frascos gerber y en granos (Cuadro 1 y Cuadro 2). Sin embargo, el extracto hexánico y etanólico mostraron efecto de repelencia y atracción sobre *S. oryzae*, respectivamente en la evaluación en costales. Para el caso del pulgón de la col, se observó mortalidad por efecto de todos los extractos, aunque algunos requirieron la concentración más alta para matar al 100 % de individuos (Cuadro 1 y Cuadro 2). El extracto que presentó potencial de efecto insecticida contra *B. brassicae* fue el hexánico que tuvo 100 % de mortalidad desde la concentración de 10,000 $\mu\text{l l}^{-1}$ ($P \leq 0.05$) desde las 24 h. Una forma de reducir las altas concentraciones requeridas para causar el 100 % de mortalidad es evaluar fracciones de estos extractos, dado que en trabajos anteriores donde evaluaron el efecto de los extractos crudos y el efecto de

aceites vegetales, se observó que los extractos no superaron el 20 % de mortalidad. Sin embargo, los aceites presentaron más de 60 % y alcanzando hasta 100 % de mortalidad (Pérez-Pacheco *et al.*, 2004). Además del efecto insecticida sobre *B. brassicae*, el extracto hexánico mostró efecto insectistático al provocar repelencia a *S. oryzae* a los 5 y 45 días tanto en los costales de rafia como en los de yute (Fig. 1). El efecto de repelencia provocado por el extracto con hexano puede ser debido a que contiene las sustancias volátiles: borneol y camphor (Tellez *et al.*, 2001). Por otra parte, en evaluaciones donde asperjaron estas sustancias solas y mezcladas con aceite de neem a granos de frijol y arroz, se redujo el daño a granos de frijol por *Acanthoscelides obtectus* y en granos de arroz por *S. oryzae* (Regnault-Roger y Hamraoui, 1995; Sanguanpong *et al.*, 2001).

Efecto de atracción

El extracto etanólico mostró atracción a *Sitophilus oryzae*, aunque el efecto se dio únicamente en sinergia con costales de fibra de la planta yute (*Corchorus capsularis*). En esta planta se ha realizado extracción de compuestos de la corteza y del tallo. Mosihuzzaman *et al.* (2006) encontraron compuestos fenólicos como ácido cumárico, vainillina y beta sitosterol. El extracto etanólico, por su parte reportó 14 compuestos de tipo sesquiterpenoide en sus aceites esenciales, los cuales en conjunto con los de yute generaron atracción a *S. oryzae*.

BIBLIOGRAFÍA

- Botto, E. N. Monetti, C., Ortego, J. y Duchetti, A. 1995. Natural enemies of cereal aphids and their potential impact against the russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) in Argentina. *VEDALIA* 2: 39-40.
- Elzen, G. W. y D. D. Hardee. 2003. Agricultural Research Service Research on managing insect resistance to insecticides. *Pest Management Science* 59:770-776.
- Das, N.G., Goswami, D. y Rabha, B. 2007. Preliminary evaluation of mosquito larvicidal efficacy of plant extracts *Journal Vector Borne Diseases* 44:145–148.
- Mosihuzzaman, M., Chowdhury, T. A., Mollah, A. H., Theander, O. y Lundgren, L. N. 2006. Phenolic acids in the jute plant (*Corchorus capsularis*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 37:955-960.
- Niroula, S.P. y Kamini, V. 2004. Efficacy of Some Botanicals against Potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873). *Our Nature* 2:21-25.
- Pérez-Pacheco, R., Rodríguez.Hernández, C., Lara-Reyna, J., Montes-Belmont, R. y Ramírez, V. G. 2004. Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Acta Zoológica Mexicana* 20: 141-152.
- Regnault-Roger, C. y A. Hamraoui. 1995. Fumigant toxic activity and reproductive inhibition induced by monoterpenes on *Acanthoscelides obtectus* (Say)(Coleoptera), a bruchid of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Stored Products Research* 31 (4):291-299.

- Ricci, M., Padín, S., Ringuelet, J. y Kahan, A. 2006. Utilización de Aceite Esencial de Lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) Como Repelente de *Diuraphis noxia* Kurdj. (Hemiptera: Aphididae) en Trigo. Agricultura Técnica (Chile) 66:256-263.
- Sanguanpong, U., Kongkathip, N. y Sombatsiri, K. 2001. Reproductive inhibition of rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.) induced by vapor of formulated neem oil-based pellets. In : 20th ASEAN / 2nd APEC Seminar on Postharvest "Quality Management and Market Access", 11-14 September 2001, Chiangmai, Thailand Resumen 59. pp 336-344.
- SAS Institute, Inc. 1996. SAS/STAT Software: Changes and enhancements through release 6.12. SAS Inst., Cary, NC.
- Silva, G., Orrego, O., Hepp, R. y Tapia, M. 2005. Búsqueda de plantas con propiedades insecticidas para el control de *Sitophilus zeamais* en maíz almacenado. Pesquisa Agropecuaria Brasileña, Brasília 40:11-17.
- Tellez, M., R. Estell, E. Fredrickson, I. Powell, D. Wedge, K. Schrader y M. Kobaisy. 2001. Extracts of *Flourensia cernua* (L): volatile constituents and antifungal, antialgal, and antitermite bioactives. Journal of chemical ecology 27:2263-2285.
- Viglianco, A.I.; R.J. Novo, C.I. Cragolini y M. Nassetta. 2006. Actividad biológica de extractos crudos de *Larrea divaricata* Cav. y *Capparis atamisquea* Kuntze sobre *Sitophilus oryzae* (L.). Agriscientia 23:83-89.
- Wilson, C. L., A. E. Ghaouth, y M. E. Wisniewski. 1999. Prospecting in nature's storehouse for biopesticides. Revista Mexicana de Fitopatología 17:49-53.

Cuadro 1. Porcentaje de mortalidad de tres insectos plaga por efecto de extractos de *F. cernua* a 24 h

Extractos	Dosis $\mu\text{l l}^{-1}$	<i>P. operculella</i>	<i>B. brassicae</i>	<i>S. oryzae</i>	
		Técnica de inmersión		Película residual	Granos tratados
Etanol	40 000	16.1 a ^x	100.0 a	12.4 a	0.0 a
Etanol	20 000	16.7 a	100.0 a	0.0 a	0.0 a
Etanol	10 000	6.7 a	47.3 b	0.0 a	0.0 a
Etanol	5 000	3.3 a	2.5 c	0.0 a	0.0 a
Etanol	2500	0.0 a	9.0 c	0.0 a	0.0 a
hexano	40 000	9.4 a	100.0 a	3.3 a	0.0 a
hexano	20 000	0.0 a	100.0 a	0.0 a	0.0 a
hexano	10 000	0.0 a	100.0 a	0.0 a	1.8 a
hexano	5 000	0.0 a	27.5 b	0.0 a	0.0 a
hexano	2500	3.3 a	0.0 c	3.3 a	1.7 a
MetOH:CHCl ₃	40 000	6.7 a	100.0 a	0.0 a	0.0 a
MetOH:CHCl ₃	20 000	12.9 a	45.5 ab	3.3 a	0.0 a
MetOH:CHCl ₃	10 000	9.7 a	4.2 bc	3.3 a	0.0 a
MetOH:CHCl ₃	5 000	36.7 a	4.4 bc	0.0 a	0.0 a
MetOH:CHCl ₃	2500	0.0 a	0.0 bc	0.0 a	0.0 a
Éter	40 000	9.7 a	100.0 a	3.3 a	0.0 a
Éter	20 000	0.0 a	30.3 b	3.3 a	0.0 a
Éter	10 000	0.0 a	24.6 b	0.0 a	0.0 a
Éter	5 000	0.0 a	0.0 c	0.0 a	0.0 a
Éter	2500	16.7 a	0.0 c	3.3 a	0.0 a

^x $P \leq 0.05$

Cuadro 2. Porcentaje de mortalidad de tres insectos plaga por efecto de extractos de *F. cernua* a 48 h

Extractos	Dosis $\mu\text{l l}^{-1}$	<i>P. operculella</i>	<i>B. brassicae</i>	<i>S. oryzae</i>	
		Técnica de inmersión		Película residual	Granos tratados
Etanol	40 000	16.1 a ^x	100.0 a	15.5 a	0.0 a
Etanol	20 000	26.7 a	100.0 a	0.0 a	0.0 a
Etanol	10 000	6.7 a	34.4 b	0.0 a	0.0 a
Etanol	5 000	3.3 a	3.7 c	0.0 a	0.0 a
Etanol	2500	0.0 a	7.8 c	0.0 a	0.0 a
hexano	40 000	9.4 a	100.0 a	3.3 a	0.0 a
hexano	20 000	0.0 a	100.0 a	0.0 a	0.0 a
hexano	10 000	0.0 a	100.0 a	0.0 a	1.8 a
hexano	5 000	0.0 a	33.3 b	3.3 a	0.0 a
hexano	2500	3.3 a	3.0 c	20.0 a	1.7 a
MetOH:CHCl ₃	40 000	6.7 a	100.0 a	0.0 a	0.0 a
MetOH:CHCl ₃	20 000	12.9 a	89.1 ab	3.3 a	0.0 a
MetOH:CHCl ₃	10 000	9.7 a	7.1 bc	6.7 a	0.0 a
MetOH:CHCl ₃	5 000	43.3 a	7.1 bc	0.0 a	0.0 a
MetOH:CHCl ₃	2500	0.0 a	7.6 bc	0.0 a	0.0 a
Éter	40 000	9.7 a	100.0 a	6.7 a	1.7 a
Éter	20 000	0.0 a	58.8 b	6.7 a	0.0 a
Éter	10 000	0.0 a	52.7 b	0.0 a	0.0 a
Éter	5 000	0.0 a	0.0 c	3.3 a	0.0 a
Éter	2500	16.7 a	0.0 c	6.7 a	0.0 a

^x $P \leq 0.05$

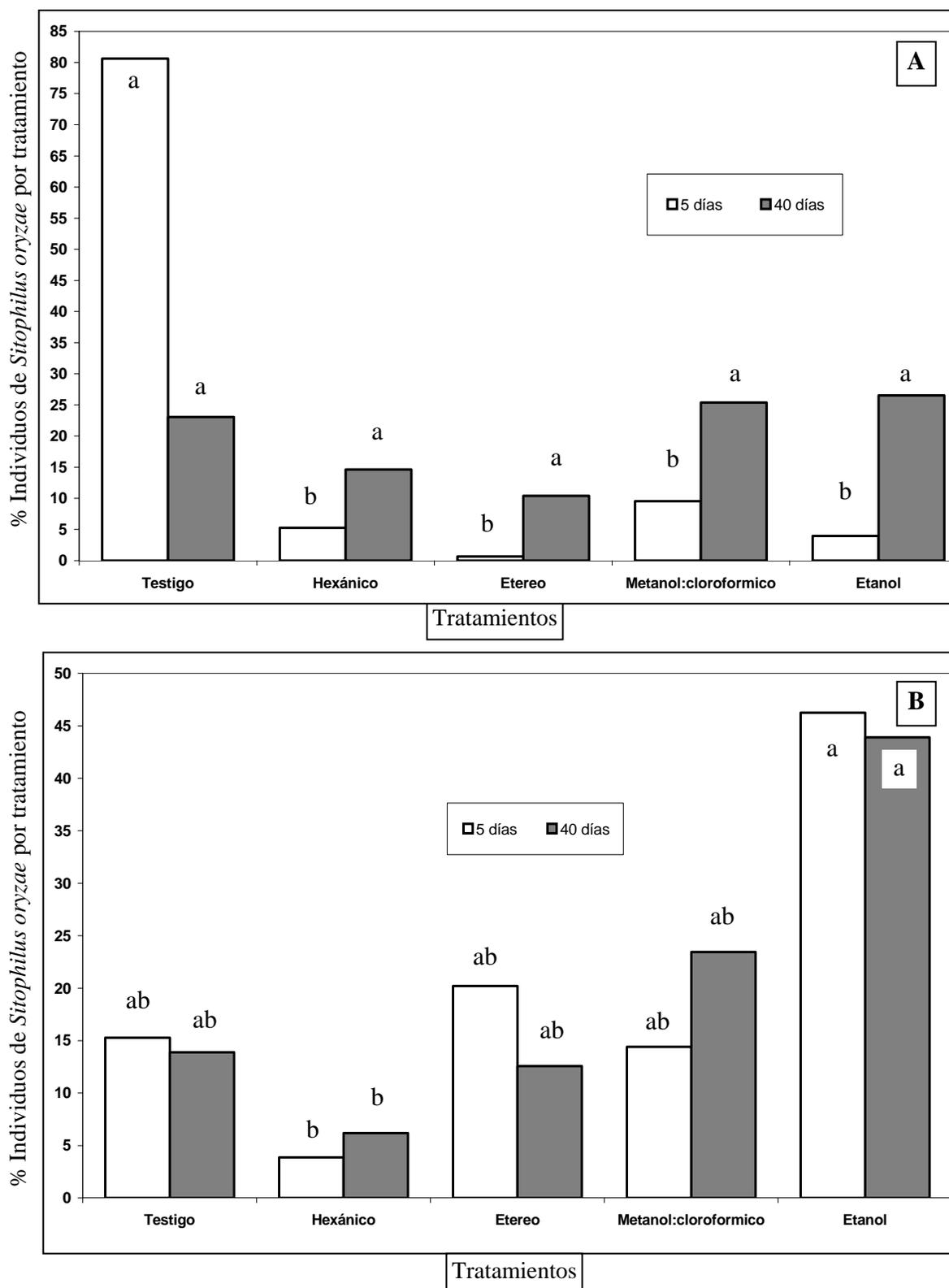


Fig. 1. Por ciento de individuos encontrados en granos de maíz tratados con cuatro extractos de *Flourensia cernua* a $20,000 \mu\text{l l}^{-1}$ en (A) costales de rafia y (B) costales de yute con granos de maíz.

**FRACCIONAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN COMPUESTO DE
Flourensia cernua DC. CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA / FRACTIONATION
AND CHARACTERIZATION OF A *Flourensia cernua* DC. COMPOUND WITH
ANTIFUNGAL ACTIVITY**

**Diana Jasso-Cantú¹, Eugenio Guerrero-Rodríguez^{1†}, Susana Solís-Gaona¹,
Francisco Daniel Hernández-Castillo¹, Alberto Flores-Olivas¹.** Universidad
Autónoma Agraria Antonio Narro. C.P. 25315. Programa de Doctorado en
Parasitología Agrícola, Saltillo, Coahuila, México. e-mail:

susysolgao@gmail.com.

RESUMEN

Debido a que el extracto etanólico de *Flourensia cernua* obtenido por extracción secuenciada, presentó la mayor actividad fungistática sobre un alga y cinco hongos fitopatógenos. El objetivo de este trabajo fue fraccionar el extracto etanólico y evaluar el efecto de las fracciones sobre *Fusarium oxysporum* además de caracterizar los compuestos que le confieren la actividad fungistática. El extracto etanólico se fraccionó por cromatografía en columna con soporte de sílica gel y un gradiente de solventes hexano; acetato de etilo: metanol (10-0:0-10:5-5). Las fracciones obtenidas fueron evaluadas sobre *Fusarium oxysporum* en placas de microdilución de 96 pocillos con medio

[†] Este artículo es *In Memoria* del Dr. Eugenio Guerrero Rodríguez, Director de tesis a quien Dios lo llevó a su lado, antes de la culminación de este trabajo.

líquido RPMI 1640 (BioWhitaker) estabilizado a pH 7.0 con 0.165 M de ácido morfolin propanosulfónico (MOPS), las concentraciones evaluadas fueron: 500; 1,000 y 2,000 $\mu\text{l l}^{-1}$. El efecto de las fracciones se determinó por comparación de la tasa de crecimiento de *F. oxysporum* tratado y sin tratar, en base a lecturas de absorbancia en lector de placas (Stat Fax 2100) a 0, 24, 48 y 72 h. La fracción más eficiente para inhibir a *F. oxysporum* fue eluída con hexano:acetato de etilo (3:7). Los compuestos se caracterizaron por Espectroscopia de Infrarrojo (FT-IR) y por Cromatografía de Gases acoplada a detector de Masas. El compuesto encontrado en mayor proporción presentó una fórmula condensada de $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$ con peso de 236 uma.

Palabras clave: Fraccionamiento; Cromatografía de columna; FT-IR; GC-MS; Hojasén; Extracto etanólico; Compuesto de fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$

ABSTRACT

Due to the fact that *Flourensia cernua* ethanolic extract obtained at successive extractions presented the most effective effect on six phytopathogenic. The objective of this study was to carried out the fractionation of the ethanolic extract to evaluate the effect of fractions obtained of the ethanolic extract on *Fusarium oxysporum* and to characterize the compounds with antifungal activity. Ethanolic extracts were fractionated by column chromatography on silice gel with a gradient system of hexane:acetate ethyl:methanol (10-0:0-10:5-5), the fractions were evaluated on *F. oxysporum* growth at microdilution plates-96 well with liquid media RPMI 1640

(BioWhitaker) buffered to a pH of 7.0 with 0.165 M morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) buffer, the concentrations of fractions were at 500; 1,000 and 2,000 $\mu\text{l l}^{-1}$. The fractions effect on *F. oxysporum* was determinate by comparison of growth rate of treatments and *F. oxysporum* control, measured by Stat fax 2100 Microplate Reader at 630-545 nm of absorbance values at 0, 24, 48 and 72 h of incubated time. The fraction that caused the higher absorbance decrease in relation with the other fractions was eluted with hexane:ethyl acetate (3:7). The antifungal compound was characterized by FT-IR spectra Gas Chromatography with mass spectra detector. The major constituent of fraction was a compound whose molecular formula was established as $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$.

Additional keywords: Fractionation; Column Chromatography; FT-IR; GC-MS, hojasen, ethanol extract, Column Chromatography; compound of molecular formula $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$

INTRODUCCION

Las plantas biosintetizan una gran cantidad de sustancias químicas (Domingo y López-Brea, 2003; Field *et al.*, 2006). Los metabolitos secundarios más comunes con funciones defensivas contra insectos, hongos, bacterias y competencia por espacio con otras plantas son del tipo alcaloide, esteroides, fenoles, flavonoides, glicósidos, glucosinolatos, quinonas, taninos y terpenoides. Existe gran variación en los metabolitos secundarios que los individuos de una población expresan, de ahí la importancia de realizar estudios fitoquímicos que permitan separar e identificar los compuestos responsables de la función

defensiva. En este ámbito, estudios sobre *Flourensia cernua* DC. han logrado caracterizar tres compuestos responsables de su actividad fitotóxica (Dayan y Tellez, 1999; Mata *et al.*, 2005). En estudios preliminares de infusión en papa dextrosa agar (PDA) de extractos de esta especie sobre tres hongos que afectan a frutos en campo y postcosecha, así como sobre tres patógenos de suelo que causan marchitez y pudrición radicular en diversos cultivos, se encontró que el extracto etanólico fue el más eficiente (Solís-Gaona *et al.*, 2005; Guerrero-Rodríguez *et al.*, 2007), también se han evaluado aceites esenciales sobre especies de *Colletotrichum* (Tellez *et al.*, 2001). En cuanto a las técnicas de evaluación antifúngica, la más común es la difusión de compuestos en cajas de Petri con medio de cultivo PDA. Una limitante para el uso de esta técnica es que no es posible evaluar compuestos de plantas que estén disponibles en bajas cantidades, pero existe otra forma de evaluación que permite la utilización de una cantidad 225 veces menor de estos compuestos (Bidlack *et al.*, 2000; Solís-Gaona *et al.*, 2007). Esta técnica compara la tasa de crecimiento del hongo tratado y sin tratar, en base a lecturas de absorbancia de tratamientos en placas de microdilución de 96 pocillos con medio líquido RPMI 1640. En resultados preliminares de *F. cernua* DC sobre hongos, el extracto etanólico mostró la mayor eficiencia como fungistático. Por lo que este trabajo se planteó con el objetivo de: Fraccionar el extracto etanólico de *F. cernua*; evaluar el efecto de fracciones de extracto etanólico obtenido por cromatografía en columna en *Fusarium oxysporum*, y caracterizar espectroscópicamente los compuestos que le confieren la actividad fungistática.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de extracto etanólico de *Flourensia cernua* D.C.

Las hojas de *F. cernua* se colectaron a 20 km de la ciudad de Saltillo, Coahuila, México, por la carretera Saltillo-Zacatecas, en el mes de julio del 2005. El proceso de extracción se llevó a cabo mezclando 460 g de hojas con 2.5 L de disolvente en frascos de 4 L color ámbar; los que se agitaron mecánicamente a 150 rpm en un baño de agitación marca Brickman durante 22 h a temperatura ambiente (25 ± 2 °C); para ello se realizó una extracción secuenciada con hexano, éter dietílico y etanol (Téllez *et al.*, 2001). Por otra parte, de una cantidad igual de hojas se realizó la extracción con la mezcla de metanol-cloroformo (1:1), bajo las mismas condiciones de agitación y temperatura. Al término de las extracciones, se filtró el extracto sobre papel Whatman No. 1, y se separó el disolvente de la resina en un rotavapor marca Buchii. El rendimiento de resina fue determinado gravimétricamente.

Separación de fracciones cromatográficas

Las fracciones fueron obtenidas por separación en cromatografía de columna con un sistema de eluyentes: hexano (10-0), acetato de etilo (0-10) y metanol (5-5). Se obtuvieron 64 fracciones de 1.516 % volumen cada una por columna, de acuerdo a los siguientes pasos; se utilizó sílica gel saturada en hexano: acetato de etilo (1:1) para el empacado de la columna, sobre la cual se colocó 1000 mg de extracto etanólico y se dejaron pasar los eluyentes (mezcla de gradientes de los tres solventes anteriormente mencionados). En la parte inferior se colocaron matraces para coleccionar o recuperar los 5 ml por fracción de

un total de 320 ml por columna. Los solventes se evaporaron en baño María y se obtuvo el rendimiento de cada fracción.

Aislamiento y Cultivo de *Fusarium oxysporum*

El hongo bajo estudio se aisló de muestras de plantas de tomate con marchitez vascular por *Fusarium*, las muestras se desinfectaron con cloro al 2.5 % y se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA). A continuación se incubó a una temperatura de 25 ± 2 °C para el crecimiento del hongo, posteriormente se purificó por punta de hifa y se identificó con las claves de Burgess (1988). La cepa purificada se volvió a sembrar en PDA y se incubó por tres días. Al término de los cuales se agregaron 10 ml de agua destilada estéril, se frotó la superficie de la cepa con asa de vidrio estéril, se recuperó la solución conidial a un tubo estéril y se contaron las conidias ml^{-1} con ayuda de una cámara de Neubauer (Hemocitómetro Hausser Scientific) al microscopio óptico binocular Olympus BX50, para utilizarse como fuente de inóculo en los bioensayos con fracciones.

Actividad de fracciones sobre *F. oxysporum*

La evaluación se llevó a cabo en placas Costar® para microtitulación de 96 pocillos, vaciando en cada pocillo 100 μl de medio de cultivo RPMI 1640 (MetrixLab, S.A de C.V.) esterilizado con filtro Millipore (Stericup de Millipore S. A de C. V.). Se utilizaron 90 μl de solución conidial de *F. oxysporum* a 1×10^4 en RPMI 1640 y 10 μl de solución madre de cada fracción previamente preparadas en etanol para obtener tres concentraciones por fracción (500, 1000 y 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$), dando un total de 200 μl por cada pocillo. Primero se vació a las placas el medio RPMI 1640, seguido por la solución conidial y finalmente la

concentración de cada fracción. Los tratamientos se acomodaron en las placas como sigue; 29 fracciones a tres concentraciones 2000, 1000 y 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Se utilizaron seis pocillos solos por placa para tener control de la contaminación, también se pusieron seis pocillos con solo medio RPMI 1640 más conidias como testigo. Las placas se incubaron a 28 °C, se tomaron lecturas de absorbancia de los tratamientos a 0, 24, 48 y 72 h, con filtros 545-630 nm mediante lector de placas Stat fax 2100. El efecto de las fracciones sobre el hongo, se determinó por diferencia de la tasa de crecimiento de cada una de las fracciones (incremento o disminución de absorbancia) a 24, 48 y 72 h, en comparación con la tasa de crecimiento del testigo. Se utilizó un microscopio óptico marca Olympus modelo BX60 para observaciones del efecto de cada una de las concentraciones de la fracción 22 sobre *F. oxysporum* y se tomaron fotografías del efecto de la fracción que mostró la mayor inhibición de crecimiento del hongo en comparación con el testigo a las 24 h y 48 horas.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar, factorial A x B x C (Little y Hills, 1989), donde A son las 29 fracciones, B son las concentraciones ($\mu\text{g ml}^{-1}$) y C equivale a tiempo (h). Se utilizaron seis repeticiones y cada repetición constó en un pocito. Las lecturas obtenidas de absorbancia, se analizaron estadísticamente por el programa estadístico SAS Institute (1996). La comparación de medias se hizo mediante la prueba de LSD 0.05.

Caracterización de compuestos

La caracterización del compuesto mayoritario presente en la fracción que mostró la mayor inhibición al desarrollo de *F. oxysporum* se llevó a cabo por espectroscopía de infrarrojo (FT-IR), además por Cromatografía de Gases (Modelo Keypad Quick HP 6890) acoplado a Espectrómetro de Masas (HP 5973), equipado con columna capilar HP-5 (5%-fenil)-metilpolisiloxano de 30 m x 0.32 mm x 1.0 µm de grosor. Se inyectó 1 µl por muestra de cada una de las concentraciones de la fracción 22 eluída con hexano:acetato de etilo (3:7), el gas acarreador fue Helio, el rango de temperatura fue de 150 a 280 °C, con un flujo de 0.8 min °C⁻¹. Los componentes de la muestra fueron identificados por comparación de espectros de masa con los espectros referencia de la base de datos Wiley 229, 2000.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se logró fraccionar al extracto etanólico de *F. cernua* y caracterizar un compuesto que le confiere la mas alta actividad fungistática demostrada en estudios previos de esta investigación en los que mostró un rango de inhibición micelial de 86 a 100 % sobre un alga y cinco hongos fitopatógenos (Guerrero-Rodríguez *et al.*, 2007).

Efecto de fracciones sobre *F. oxysporum*

La separación cromatográfica en columna del extracto etanólico generó 64 fracciones de 1.56% volumen/volumen cada una, de las cuales 29 obtuvieron suficiente rendimiento para ser evaluadas sobre *F. oxysporum*

(Cuadro 1). El efecto de las 29 fracciones fue variable: las eluidas con el gradiente de hexano y acetato de etilo fueron efectivas para inhibir el crecimiento del hongo; por el contrario, las eluidas con acetato y metanol no mostraron control sobre el hongo, incluso algunas promovieron su crecimiento. La mayor disminución de tasa de crecimiento de *F. oxysporum* ($P \leq 0.05$) se dio a las 24 h (Fig. 1) y fue provocada por la fracción 22 de color verde claro eluida con hexano:acetato de etilo en proporción (3:7). El análisis de la interacción de las 29 fracciones a las tres concentraciones a través de 24, 48 y 72 h muestra que las fracciones 22 y 23 eluidas con hexano:acetato de etilo en proporción (3:7) provocaron la mayor disminución de tasa de crecimiento de *F. oxysporum* con 7.5 y 7.3 veces menor crecimiento que el testigo (Cuadro 2). Las fotografías tomadas a 24 y 48 h (Fig. 2), muestran que las estructuras del hongo fueron degradadas totalmente a las 48 h por efecto de los compuestos de la fracción.

Respecto al análisis de caracterización de la fracción 22 por espectroscopía de infrarrojo (FT-IR), este muestra bandas importantes en la región huella, ≈ 1650 a 1700 cm^{-1} , pertenecientes a los estiramientos (γ) C=O, característicos de la familia de los ácidos carboxílicos, además de la intensa banda 2924 y 2853 cm^{-1} , correspondiente a los estiramientos (γ) C-O de los alcanos (Fig. 3). En lo que respecta al análisis por medio de cromatografía de gases con detector de masas, se obtuvo un pico base de $m/z = 59$ y el ion molecular = 222 (Fig. 4). Respecto al patrón de fragmentación, presenta rupturas que corresponden a la fragmentación de un ácido carboxílico así como la presencia de alcanos y alquenos (C-C y C=C), con el análisis de estas dos

importantes técnicas de caracterización, podemos concluir que la molécula en estudio se trata de un ácido carboxílico, con enlaces de alcanos y alquenos además proponemos las siguientes estructuras elucidadas (Fig. 5) con las dos técnicas de caracterización antes mencionadas. A la fecha se han reportado diferentes trabajos sobre la *Flourensia cernua*, Kingston *et al.* 1978, reportaron la estructura del *flourensadiol*, así como Witwat *et al.* 1967, reportaron el *metil-orselinato*, y más recientemente Mata *et al.* 2003, reportaron el *ácido hidroflourénsico*.

Al tratarse de una molécula orgánica, proponemos el nombre sistemático, según la regla establecida por la IUPAC: Internacional Union of Pure and Applied Chemistry, para nombrar estructuras orgánicas: La molécula presenta una fórmula condensada, $C_{15}H_{24}O_2$ con un peso de 236 uma.

Consideramos de gran importancia, continuar con la caracterización química de la molécula en estudio, ya que hasta la fecha los reportes de caracterización publicados en la literatura, sobre este tipo de moléculas químicas, extraídas de productos naturales, específicamente de *Flourensia cernua*, sobre caracterización y elucidación de este tipo de moléculas es poco y no presenta semejanza con lo obtenido en este estudio por lo que es aún de mayor interés el continuar la investigación de caracterización.

La actividad fungistática de *Flourensia cernua* podría atribuirse a este compuesto cuya caracterización química nos muestra que no ha sido reportado para esta especie.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la T.A. María Guadalupe Moreno Esquivel; a la Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal, al Ing. José Omar Cárdenas Palomo y al L.C.Q. José Javier Borjas Ramos por su apoyo en diferentes etapas de análisis de esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Bidlack, W. R., Omaye, S. T., Meskin, M. S. y Topham D. K. W. 2000. Phytochemicals as bioactive agents. Technomic Publishing Company, Inc. Pensilvania, United States of America. 271p.
- Burgess, L. W.; Liddell, C. M. y Summerell, B. A. 1988. Laboratory Manual for *Fusarium* Research: Incorporating a Key and descriptions of common species in Australasia. 2nd Ed. Department of Plant Pathology and agricultural Entomology of the University of Sidney. New South Wales Australia. 98 p.
- Dayan, F. E., y Tellez, M.R. 1999. Phytotoxicity of tarbush (*Flourensia cernua* D.C.). Allelopathy Journal 6:1-12.
- Domingo, D. y López-Brea, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. Revista Española de Quimioterapia 16:385-393.
- Field, B., Ferenc, J., y Osbourn, A. 2006. First encounters – deployment of defence-related natural products. New Phytologist 172: 193–207.
- Gomes, P. B., Mata, V. G. y Rodrigues, A. E. 2005. Characterization of the Portuguese-grown *Cistus ladanifer* essential oil. Journal of Essential oil Research 17:160-165

- Guerrero-Rodríguez, E., Solís-Gaona, S., Hernández-Castillo, F.D., Sandoval-López, V. y Jasso-Cantú, D. 2007. Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Flourensia cernua* D.C. en patógenos de postcosecha *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y *Sacc.* y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. Revista Mexicana de Fitopatología 25:48-53.
- Hadj-Salah, K.B., Mahjoub, M.A., Chaumont, J.P., Michel, L., Millet-Clerc, J., Chraeif, I., Ammar, S., Mighri, Z. y Aouni, M. 2006. Chemical composition and *in vitro* antifungal and antioxidant activity of the essential oil and methanolic extract of *Teucrium sauvagei* Le Houerou. Natural Product Research 20:1089-1097.
- Haider, F., Naqvi, A.A. y Bagchi, G.D. 2007. Oil Constituents of *Artemisia nilagirica* var. *septentrionalis* during different growth phases at subtropical conditions of North Indian Plains. Journal of Essential Oil Research 19:8:12.
- Hernández, T., Canales, M., Terán, B., Avila, O., Duran, A., García, A.M., Hernández, H., Angeles-López, O., Fernandez-Araiza, M. y Avila, G. 2007. Antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Cordia curassavica* (Boraginaceae). Journal of Ethnopharmacology 111:137:141.
- Little, T.M. y F.J. Hills. 1989. Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. Ed. Trillas. 2a edición, 4a Reimp. 2002. México, D.F. México. 270 p.
- Mata, R., Bye, R., Linares, E., Macias, M., Rivero-Cruz, I., Pérez, O. y Timmermann, B.N. 2003. Phytotoxic compounds from *Flourensia cernua*. Phytochemistry 64:285-291.

- Solís-Gaona, S., Guerrero-Rodríguez, E., Galván-Cendejas, A., Jasso-Cantú, D., y Hernández-Castillo, F. D. 2005. Actividad biológica de extractos de Hojasén (*Flourensia cernua*) sobre los patógenos del suelo *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora capsici*. In: Memorias VII Congreso internacional de Fitopatología. Chihuahua, Chih., México. Resumen C43.
- Solís-Gaona, S., Guerrero-Rodríguez, E., Jasso-Cantú, D., Cárdenas-Palomo, J. O., Flores-Olivas, O. y Daniel-Hernández, F. D. 2007. Bioassay in microtiter plates of fractions of *Flourensia cernua* ethanolic extract on *Fusarium oxysporum*. In: Memorias IX Congreso Internacional de Fitopatología. Riviera Maya, Quintana Roo, México. Resumen. 252. p 166.
- Tellez, M., R. Estell, E. Fredrickson, 1. Powell, D. Wedge, K. Schrader y M. Kobaisy .2001. Extracts of *Flourensia cernua* (L): volatile constituents and antifungal, antialgal, and antitermite bioactives. Journal of chemical ecology 27:2263-2285.
- Yang, D., Michel, L., Chaumont, J. P. y Millet-Clerc, J., 1999. Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an in vitro experimental model of onychomycosis. Mycopathologia 148:79-82.

Cuadro 1. Rendimiento de fracciones cromatográficas de extracto etanólico de *Flourensia cernua* DC obtenidas con gradiente hexano:acetato de etilo:metanol (10-0:0-10:5-5)

Fracciones	Eluyentes (proporción)			Rendimiento (mg)	Rendimiento (% p/p)	
	1.56% v/v	Hexano	Acetato de etilo Metanol			
12		6	4	0	72.8	4.7
13		6	4	0	21.6	1.4
22		3	7	0	40.4	2.6
23		3	7	0	87.8	5.6
24		2	8	0	80.9	5.2
25		2	8	0	<u>167.5</u>	10.8
26		2	8	0	<u>145.4</u>	9.4
27		1	9	0	139.2	9.0
29		1	9	0	96.4	6.2
30		0	10	0	95.0	6.1
31		0	10	0	75.0	4.8
32		0	10	0	63.1	4.1
33		0	10	5	45.9	3.0
34		0	10	5	26.8	1.7
35		0	10	5	24.7	1.6
36		0	9	5	21.6	1.4
37		0	9	5	18.9	1.2
38		0	9	5	5.2	0.3
39		0	8	5	17.1	1.1
40		0	8	5	15.9	1.0
41		0	7	5	15.9	1.0
42		0	7	5	14.6	0.9
44		0	6	5	14.0	0.9
45		0	6	5	16.2	1.0
46		0	6	5	16.1	1.0
47		0	5	5	13.2	0.8
48		0	5	5	50.1	3.2
49		0	5	5	24.1	1.6
51		0	4	5	15.0	1.0

Cuadro 2. Promedio de lecturas de Absorbancia a 24, 48 y 72 h de las 29 fracciones de extracto etanólico de *Flourensia cernua* a concentraciones de 500; 1,000 y 2,000 $\mu\text{l l}^{-1}$ sobre *Fusarium oxysporum*.

Fracciones	Medias*	Tukey	Veces X**
F36	0.05785	A	6.1
F46	0.03041	BA	3.2
F47	0.02622	BC	2.8
F40	0.02470	BC	2.6
F39	0.02324	BC	2.4
F37	0.01983	BC	2.1
F33	0.01678	BCD	1.8
F51	0.01635	BCD	1.7
F45	0.01276	BECD	1.3
F49	0.01220	FBECD	1.3
F44	0.01185	FBECD	1.2
Testigo	0.00950	FBECD	1.0
F48	0.00804	FBECD	0.8
F38	0.00532	FBECD	0.6
F34	0.00217	FBECD	0.2
F29	0.00120	FBECD	0.1
F30	-0.00102	FECD	-0.1
F42	-0.01206	FEGD	-1.3
F32	-0.01559	FHGE	-1.6
F41	-0.01717	FHGI	-1.8
F13	-0.03089	HJGI	-3.3
F24	-0.03748	HJGI	-3.9
F27	-0.04483	HJKI	-4.7
F25	-0.04654	JKI	-4.9
F12	-0.04761	JKI	-5.0
F31	-0.04976	JKI	-5.2
F26	-0.05028	JKI	-5.3
F35	-0.05217	JKI	-5.5
F23	-0.06972	LK	-7.3
F22	-0.07078	LK	-7.5

*Tukey ($P \geq 0.05$) factorial A x B x C. Media total de concentraciones (Valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes).

** Veces X= Medias de fracciones / Testigo.

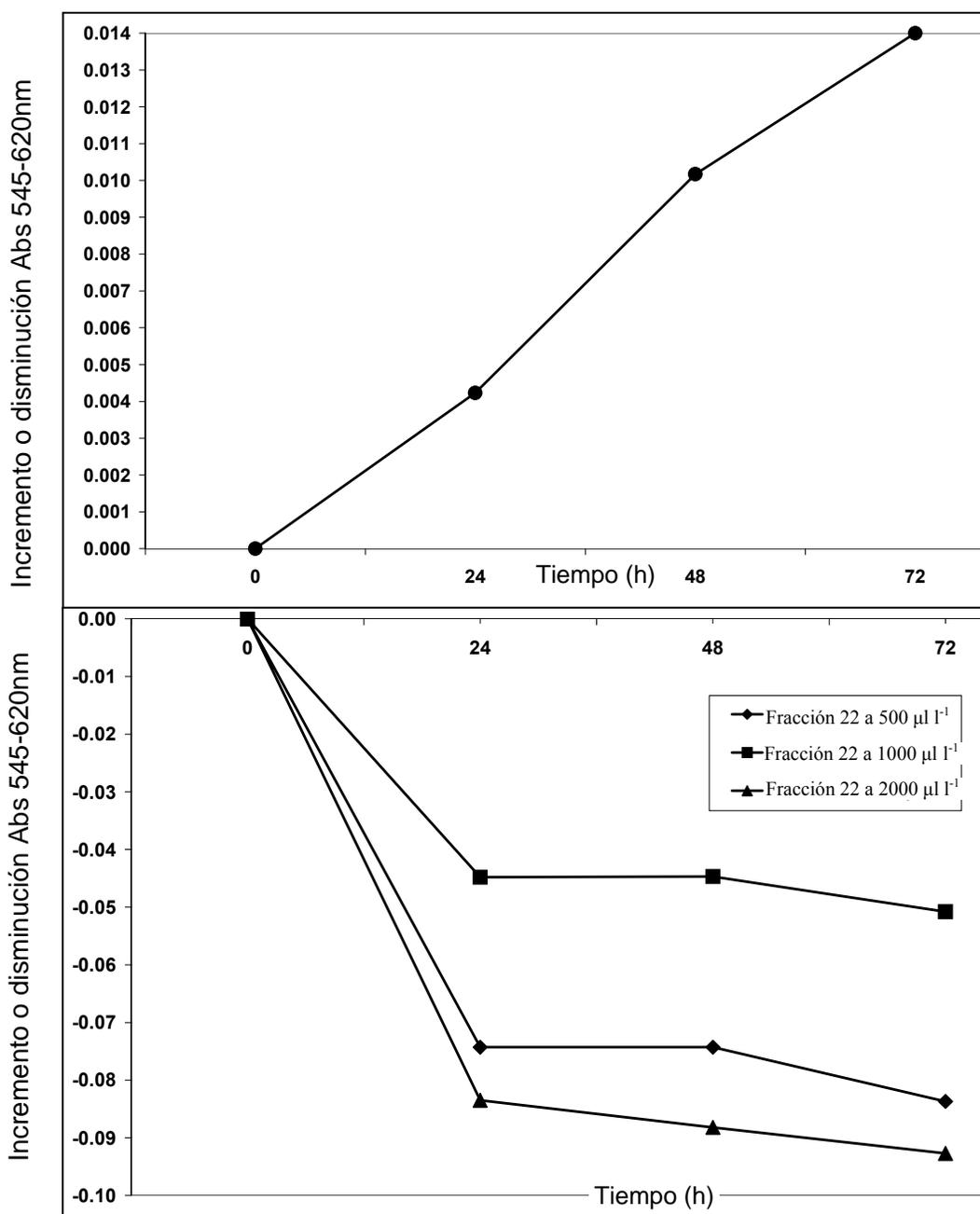


Fig. 1. Tasa de crecimiento de *Fusarium oxysporum* en medio de cultivo líquido RPMI 1640 con MOPS, (A). Efecto de la fracción 22 de extracto etanólico de *Flourensia cernua* DC sobre tasa de crecimiento de *F. oxysporum* (B).

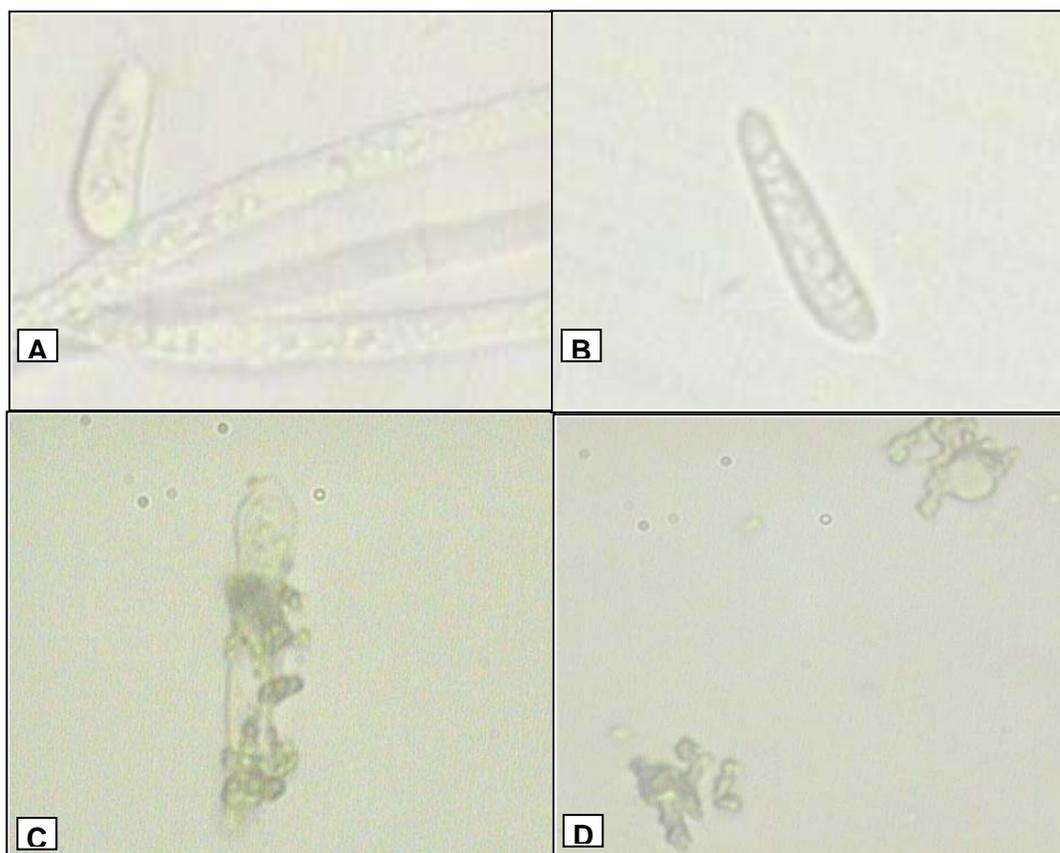


Fig. 2. Efecto de la fracción 22 de extracto etanólico de *Flourensia cernua* DC a $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ sobre *Fusarium oxysporum* (A) Testigo a 24 h; 1000X; (B) Testigo a 48 h, 1000X; (C) Fracción 22 a $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ (24 h), 1000 X, (D) Fracción 22 a $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ (48 h), 1000 X.

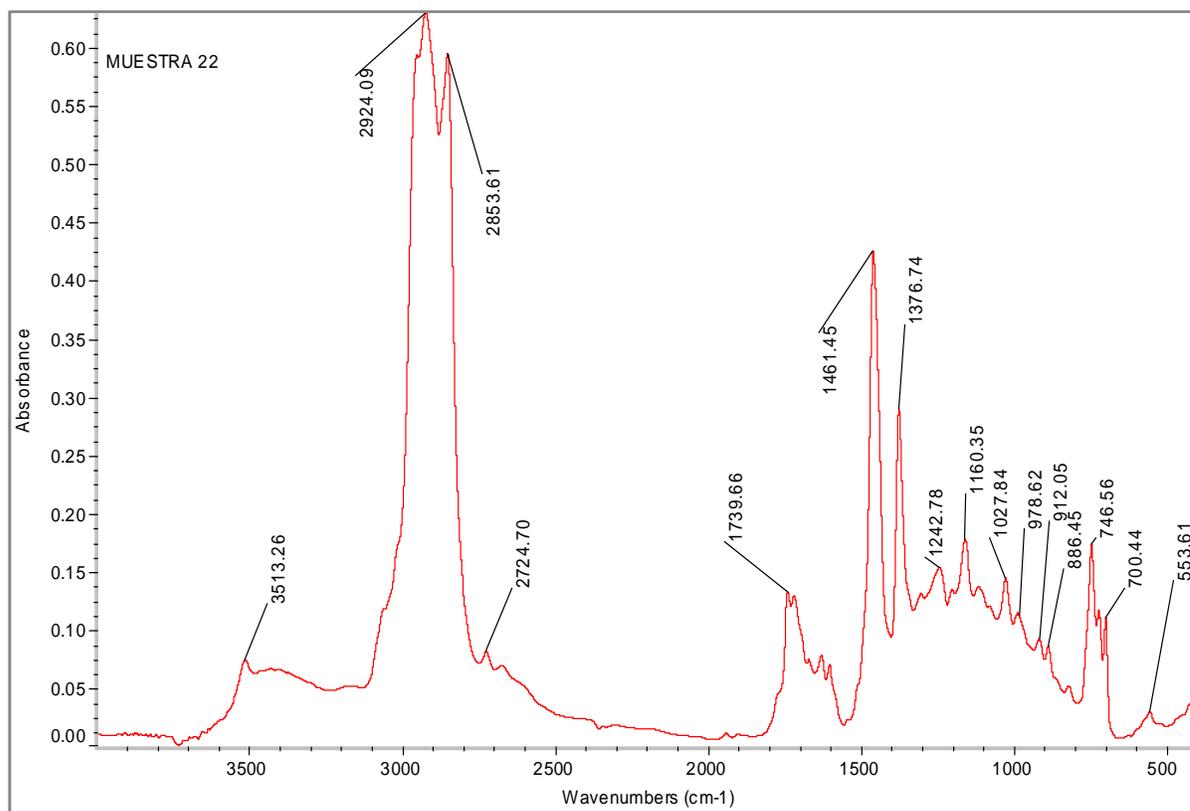


Fig. 3. Resultados de análisis de Espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) de la fracción 22 de extracto etanólico de *Flourensia cernua* DC..

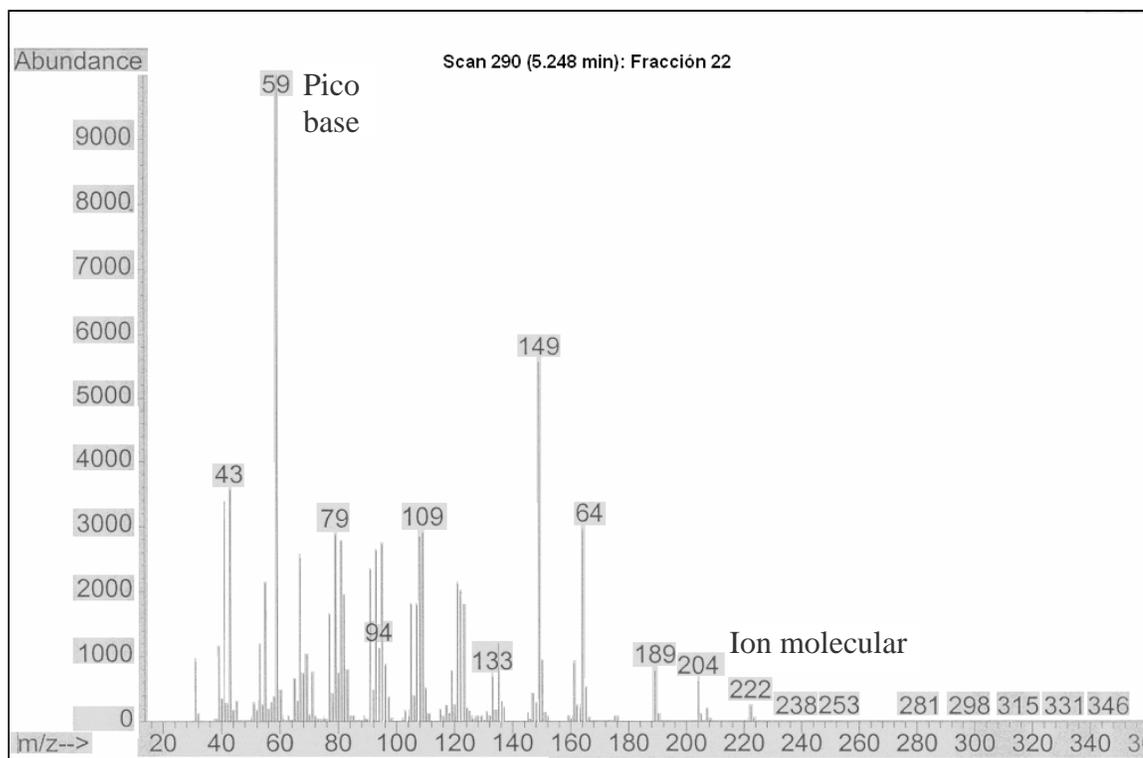


Fig. 4. Espectro de masas de un compuesto de la fracción 22 (hexano : acetato de etilo 3:7) de extracto etanólico de *Flourensia cernua* DC.

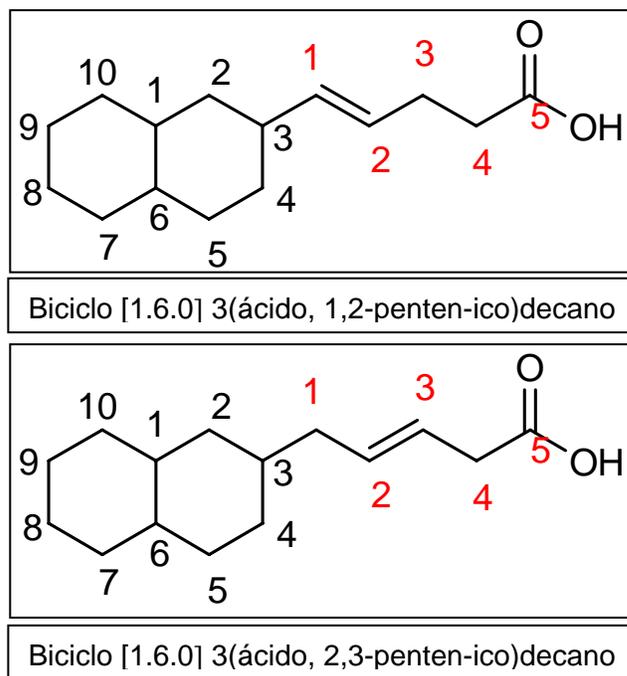


Fig. 5. Estructuras moleculares propuestas para un compuesto caracterizado en la fracción 22 de extracto etanólico de *Flourensia cernua* DC.

CONCLUSIONES GENERALES

Los extractos de *F. cernua* presentaron actividad algicida y antifúngica, además de actividad insecticida, insectistática y bactericida. La variación de actividad biológica estuvo en función de la polaridad de los compuestos.

El extracto etanólico mostró actividad biológica sobre hongos y alga fitopatógenos, además de efecto atrayente al gorgojo *Sitophilus oryzae*

El extracto hexánico presentó actividad antibacterial sobre bacterias de los géneros *Xanthomonas* y *Pseudomonas*, además de efecto insecticida sobre áfidos y efecto insectistático como repelente de gorgojos *S. oryzae*

El extracto etanólico mostró la mayor actividad antifúngica.

Las fracciones mas eficientes para disminuir la tasa de crecimiento del hongo fueron la 22 y 23 eluídas con hexano:acetato de etilo (3:7).

Se elucidó de la fracción 22 la molécula de fórmula condensada $C_{15}H_{24}O_2$ con un peso de 236 uma, la cual podría ser la responsable de la actividad antifúngica de *F. cernua*

PERSPECTIVAS A FUTURO

Es necesario que de la fracción 22, se efectúen estudios de Resonancia Magnética Nuclear C^{13} y H^1 (RMN C^{13} y RMN H^1) para corroborar la estructura de la fórmula condensada que proponemos según la regla establecida por la IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.

LITERATURA CITADA

Arredondo, V. D. G. 1981. Componentes de la vegetación del rancho demostrativo Los Ángeles. Tesis Licenciatura UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México 284 p.

Benson, L. and R. A. Darrow, 1981. Tress and shrubs of the south western desert. The University of Arizona Press. Tucson Arizona, USA. 416 p.

Blake, C. A. 1913. Revision of the genus *Flourensia*. Proc. Amer. Acad. 49: 393-409.

Briones, O y Villarreal, Q. J. A. 2001. Vegetación y flora de un ecotono entre las provincias del altiplano y de la planicie costera del noreste de México. Acta Botánica Mexicana 55: 39-67.

Cavazos, C.O.E. 1984. Control químico de *Flourensia cernua* DC. en pastizal mediano abierto. Tesis de maestría. Especialidad de manejo de pastizales UAAAN, Saltillo, Coahuila, México. 121 p.

Correl, D.S. and Johnston M.C. 1970. Manual of the vascular plants of Texas. Texas Research Fundation. Ranner, Texas, USA. 1881 p.

Dayan, F. E., and Tellez, M.R. 1999. Phytotoxicity of tarbush (*Flourensia cernua* D.C.). *Allelopathy Journal* 6:1-12.

Domingo, D. y López-Brea, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*. 16:385-393

Díaz, S.H. 1985. Control de hojaseñ (*Flourensia cernua* DC.) con diferentes diseños de riel en el norte de Zacatecas. México. Tesis de maestría con especialidad de manejo de pastizales UAAAN, Saltillo, Coahuila, México. 113 p.

Dillon, M. D. 1976. Two species of *Flourensia* (Asteracea) From North Central México. *The South Western*. 21: 145-149.

Dorman H.J.D.and Deans S.G.. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 2000, 88, 308–316

Duke, S. O., Rimando, A. M., Dayan, F. E., Canel, C., Wedge, D. E., Tellez, M. R., Schrader, K. K., Weston, L. A., Smillie, T. J., Rex, N. P. and Duke M. V. 2000. Strategies for the discovery of bioactive phytochemicals. pp 1-20. In: Bidlack, W. R., Omaye, S. T., Meskin, M. S. and Topham, D. K. W. *Phytochemicals as bioactive agents*. Technomic Publishing Company, Inc. Lancaster, Pennsylvania, U. S. A. p. 271

Estell, R. E., Anderson, D. M. and Havstad, K. M. 1994. Effects of organic solvents on use of tarbush by sheep. *Journal of Chemical Ecology*. 20: 1137-1142

Estell, R. E., Fredrickson, E. L., Tellez, M. R., Havstad, K. M., Shupe, W. L., Anderson, D. M. and Remmenga, M. D. 1998. Effects of Volatile Compounds on Consumption of Alfalfa Pellets by Sheep. *Journal of Animal Science* 76:228–233

Estell, R. E., Fredrickson, E. L., Anderson, D. M., Havstad, K. M. and Remmenga, M. D. 2002. Effects of four mono- and sesquiterpenes on the consumption of alfalfa pellets by sheep. *Journal of Animal Science*. 80:3301–3306

Estell, R. E., Fredrickson, E. L., Anderson, D. M., and Remmenga, M. D. 2005. Effects of γ -terpinene, terpinolene, α -copaene, and α -terpinene on consumption of alfalfa pellets by sheep. *Journal of Animal Science*. 83:1967–1971

Field, B., Ferenc, J., and Osbourn, A. 2006. First encounters – deployment of defence-related natural products. *New Phytologist*. 172: 193–207

Fredickson, E., Thilsted, J., Estell, R., Havstad, K. 1994. Effect of chronic ingestion of tarbush (*Flourensia cernua*) on ewe lambs. *Veterinary Hum Toxicol.* 36: 409-415.

Gamboa, A.R, Hemández, F. D., Guerrero, E., Sánchez, A. 2003. Inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora infestans* Mont. (De Bary) con extractos vegetales metanólicos de hojaseén (*Flourensia cernua* D.C.), mejorana (*Origanum majorana* L.) y trompetilla (*Bouvardia ternifolia* (Ca.)Schlecht.) *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 13-18.

Gay, C. W.; D. Wyer, D.D. and Steger, R. E. 1970. New México range Plants. New México, Sate Univ. Unites States of América. Circ. No. 374. 85 p.

Jasso de R., D., Hernández-Castillo, D., Angulo-Sánchez, J. L., Rodríguez-García, R., Villarreal-Quintanilla, J. A. and Lira-Saldivar, R.H. 2007. Antifungal activity in vitro of *Flourensia* spp. extracts on *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*. *Industrial Crops and Products* 25:111-115.

López, B.A., López, B.S.R., Vázquez, B.M.E., Rodríguez, H.S.A, Mariano Mendoza, E.M. y Padrón, C.E. 2005. Inhibición del Crecimiento Micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen,

Rhizoctonia solani Kühn y *Verticillium dahliae* Kleb. Mediante Extractos Vegetales Acuados Revista Mexicana de Fitopatología. 23:183-190.

King, D.W., Fredrickson, E.L., Estell, R.E., Havstad, K.M., Wallace, J.D. and Murray, L.W. 1996. Effects of *Flourensia cernua* ingestion on nitrogen balance of sheep consuming tobosa. Journal of range management 49:331-335

Korthuis, Sara Lynn. 1988. *Flourensia cernua*. In: Fire Effects Information System, [Online]. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky mountain research station, fire sciences Laboratory (Producer). Available: <http://www.fs.fed.us/database/feis/> (2007, June 20).

Marroquín, J., G. Borja, R. Velázquez y J. A. de la Cruz. 1964. Estudio ecológico dasonómico de las zonas áridas del norte de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. Publicación Especial 2, Secretaría de Agricultura y Ganadería. México, D.F. 165 p.

Mata, R., Linares, E., Macias, M. R., Pérez, O. y Timermann, B. N. 2003. Phytotoxic Compounds of *Flourensia cernua*. Phytochemistry. 64:285-295

Miranda, F. y Hernández X., E. 1963. Los tipos de vegetación de México y su clasificación. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 28: 29-178.

Müller, Cornelius H. 1940. Plant succession in the *Larrea-Flourensia* climax. *Ecology*. 21: 206-212.

Rundel, P. W.; Rosul, S. M. and Gonzalez, C. A. 1994. Resource availability and hervvory in *Larrea tridentata*. In: M. Arianoutsoy and R. H. Graves, (Eds). *Plant-Animal Interactions in Mediterranean Type Ecosystems*, Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. Pp 114-115.

Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Limusa. México, D.F. 432 p.

Silva, S. R. E. 1980. Estado actual de los recursos naturales renovables de los ejidos el Predo y San Juan del Predo, Municipio de Galeana Nuevo León, México. Tesis licenciatura. UANL. Monterrey, N. L., México. 75 p.

Tellez, M.R., Estell, R.E., Fredrickson, E.L., Havstad, K.M. 1997. Essential oil of *Flourensia cernua* DC. *Journal of Essential Oil Research* 9:619-624.

Tellez, M. E., Fredrickson, R. E., Powell, J. W., Schrader, K. D. and Kobaisy, M. 2001. Extracts of *Flourensia cernua* (L): volatile constituents and antifungal, antialgal, and antitermite bioactivities. *Journal of Chemical Ecology* 27: 2263-73.

Vines, R. A. 1960. *Trees, shrubs and woody vines of the Southwest*. University of Texas Press. Ed. United States of America. 1104 p.

Vivanco, J. M., Loyola-Vargas, V. M., Cosio, E., y Flores H. E. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. Revista Investigación y ciencia. Febrero:68-75