

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
“ANTONIO NARRO”**

**DIVISIÓN AGRONOMÍA**



**EFECTO ANTIFÚNGICO DEL EXTRACTO CRUDO Y  
PARCIALMENTE REDUCIDO CATALÍTICAMENTE DE  
CHILCUAGUE (*Heliopsis longipes* A. Gray Blake) SOBRE EL TIZÓN  
TEMPRANO (*Alternaria solani*) EN CONDICIONES “*IN VITRO*” E  
INVERNADERO.**

**POR:**

**René Robles Carrasco**

**TESIS**

**PRESENTA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**INGENIERO EN AGROBIOLOGIA**

**BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MEXICO DICIEMBRE DEL 2005**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
“ANTONIO NARRO”**

**DIVISIÓN AGRONOMÍA**

**DEPARTAMENTO BOTÁNICA**

**EFFECTO ANTIFÚNGICO DEL EXTRACTO CRUDO Y  
PARCIALMENTE REDUCIDO CATALÍTICAMENTE DE  
CHILCUAGUE (*Heliopsis longipes* A. Gray Blake) SOBRE EL TIZÓN  
TEMPRANO (*Alternaria solani*) EN CONDICIONES “*IN VITRO*” E  
INVERNADERO.**

**TESIS**

**QUE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR,  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**INGENIERO EN AGROBIOLOGIA**

**PRESENTA**

**René Robles Carrasco**

**APROBADA POR**

---

**Biol. Joel Luna Martinez**  
PRESIDENTE DEL JURADO

---

**Dr. Jorge Molina Torres**  
SINODAL

---

**Biol. Sofia Comparan Sanchez**  
SINODAL

---

**M. C. Arnoldo Oyervides Garcia**  
Coordinador de la División de Agronomía

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO DICIEMBRE DEL 2005

## DEDICATORIA

Esta tesis es dedicada a  
mis padres Juan Robles  
Hernández y Sandra Carrasco  
Maldonado por todo el  
esfuerzo y sacrificio que  
me brindaron para terminar  
mi carrera.

A mis hermanos

Francisco Alexander Robles

Carrasco

Ángeles Miriam Robles

Carrasco

Samuel Robles Carrasco

*i*

**AGRADESIMIENTOS**

*Antes que nada quisiera  
agradecerle a Dios, por la*

*oportunidad que me dio para  
seguir estudiando.*

*A mis padres, Juan Robles  
Hernández y Sandra Carrasco  
Maldonado por su apoyo,  
paciencia, amor y confianza,  
para terminar mi carrera Ing.  
en Agrobiología de la cual me  
siento muy orgulloso.*

*A mis hermanos, Ángeles,  
Francisco y Samuel, por su amor  
y confianza.*

*A mis Abuelos y tíos por el  
apoyo que me brindaron.*

*A mi tía Gloria por el apoyo y  
amor que siempre me brindo.*

*A mi novia Gabriela Rodríguez  
Sánchez, por su amor.*

*Al Dr. Jorge Molina Torres y  
Mc. Enrique Ramírez Chávez, por  
la oportunidad de realizar mi  
tesis en su laboratorio, y por  
el apoyo brindado durante mi  
estancia.*

*Al Biol. Joel Luna Martínez,  
por sus consejos.*

*A mi "Alma Terra Mater"  
Gracias a las personas que  
laboran en el CINVESTAV IPN  
Unidad Irapuato, por su apoyo,  
Gracias a Todos mis compañeros  
de la generación 2005 de Ing.  
En Agrobiología, por su apoyo,  
consejos y por todos los  
momentos que compartimos  
juntos.*

**INDICE DE CONTENIDO**

Dedicatoria.....	<i>i</i>
Agradecimientos.....	<i>ii</i>
Índice de contenido.....	<i>iii</i>
Índice de Figuras.....	<i>iv</i>
Resumen.....	<i>v</i>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
<b>III. HIPOTESIS.....</b>	<b>3</b>
<b>IV. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>V. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>5</b>
5.1 El cultivo de jitomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill).....	5
5.1.1 Origen.....	5
5.1.2 Descripción Botánica.....	6
5.1.3 El Cultivo Agrícola del Jitomate: Suelo y Clima.....	7
5.1.4 Fertilización.....	8
5.2 Importancia comercial del cultivo de Jitomate.....	9
5.3 Principales enfermedades.....	9
5.3.1 Tizón Temprano ( <i>Alternaria solani</i> ).....	10
5.3.2 Caracterización Taxonómica.....	10
5.3.3 Síntomas.....	11
5.3.4 Ciclo de la Enfermedad .....	11
5.3.5 Epidemiología.....	12
5.4 Fungicidas.....	12
	12

5.4.1 Definición.....	12
5.4.2 Clasificación.....	13
5.4.2.1 Por su naturaleza química.....	13
5.4.2.2 Por el momento de aplicación.....	13
5.4.2.3 Por su sitio de aplicación.....	13
5.4.2.4 Por su forma de Acción a nivel hospedante.....	14
5.4.3 Problemas de los fungicidas.....	15
5.5 Mecanismos de defensa de las plantas.....	15
5.6 Uso de extractos vegetales.....	17
5.6.1 Uso de extractos vegetales en agricultura.....	19
5.7 Generalidades de <i>Heliopsis longipes</i> .....	19
5.7.1 Caracterización Taxonómica.....	20
5.7.2 Distribución Geográfica.....	21
5.7.3 Características Biológicas.....	21
5.8 Metabolismo.....	22
5.8.1 Metabolitos Primario.....	22
5.8.2 Metabolismo Secundario.....	23
5.8.2.1 Las Alcamidas.....	24
5.8.2.1.1 Las alcamidas alifáticas.....	25
5.8.2.1.1.1 Afinina.....	26
5.8.2.1.1.1.1 Propiedades Fisicoquímicas...	
<b>VI. MATERIALES y MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>

6.1 Obtención del extracto de crudo y parcialmente reducido catalíticamente.....	27
6.2 Condiciones de cultivo " <i>in vitro</i> ".....	29
6.2.1 Bioensayos.....	29
6.2.2 Determinación del peso seco del micelio.....	30
6.3 Condiciones de cultivo en invernadero.....	31
6.3.1 Evaluación del grado de infección de <i>Alternaria solana</i> en plantas de jitomate bajo condiciones de invernadero.....	32
<b>VII. RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
7.1 Resultados obtenidos " <i>in Vitro</i> ".....	33
7.2 Resultados obtenidos en invernadero.....	42
<b>VIII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>44</b>
<b>IX. CONCLUSION.....</b>	<b>47</b>
<b>X. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>48</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución Geográfica del Chilcuague ( <i>H. longipes</i> ) en el Estado de Guanajuato.....	20
<b>Figura 2.</b> Fórmula estructural de la Afinina <i>N</i> -isobutil <i>2E,6Z,8E</i> decatrienamida, principal componente bioactivo presente en el extracto crudo de las raíces del Chilcuague ( <i>Heliopsis longipes</i> ).....	26
<b>Figura 3.</b> Cromatógrama del extracto crudo de Chilcuague ( <i>H. longipes</i> ) en el cual se aprecia el pico mayoritario con un tiempo de retención de 14.48 minutos que corresponde a Afinina.....	34
<b>Figura 4.</b> Espectro de masas de Afinina ( <i>N</i> -isobutil- <i>2E-6Z-8E</i> dicatrienamida) muestra las diferentes fraccionamientos de Afinina caracterizándose por los picos base de <i>m/z</i> 81, 141, este es el fraccionamiento más común de Afinina, así como su ión molecular de <i>m/z</i> 221.....	34
<b>Figura 5.</b> Cromatógrama del extracto reducido catalíticamente durante 12 hrs de Chilcuague ( <i>H. longipes</i> ) que muestra los picos mayoritarios que representan <i>N</i> -isobutil- <i>2E</i> -decenamida y <i>N</i> -isobutil-decanamida.....	36
<b>Figura 6.</b> Espectro de masas de <i>N</i> -isobutil-decanamida que muestra el ión molecular con un valor <i>m/z</i> 227, así como los fraccionamientos.....	37
<b>Figura 7.</b> Espectro de masas de <i>N</i> -isobutil- <i>2E</i> -decenamida que muestra el ión molecular con un valor <i>m/z</i> 225, así como los fraccionamientos.....	37
<b>Figura 8.</b> Efecto del extracto crudo de Chilcuague ( <i>H. longipes</i> ) sobre el crecimiento del micelio de <i>Alternaria solani</i> en condiciones “ <i>in Vitro</i> ”.....	38
<b>Figura 9.</b> Efecto del extracto de Chilcuague ( <i>H. longipes</i> ) Reducido catalíticamente durante un periodo de 12 hrs sobre el crecimiento del micelio de <i>Alternaria solani</i> en condiciones “ <i>in vitro</i> ”.....	39
<b>Figura 10.</b> Fotografía que muestra el efecto del extracto crudo de Chilcuague ( <i>H. longipes</i> ) sobre el crecimiento del micelio de <i>Alternaria solani</i> en condiciones “ <i>in Vitro</i> ”.....	40
<b>Figura 11.</b> Fotografía que muestra el efecto del extracto de Chilcuague ( <i>H. longipes</i> ) Reducido catalíticamente durante un periodo de 12 hrs sobre el crecimiento del micelio de <i>Alternaria solani</i> en condiciones “ <i>in Vitro</i> ”.....	40

**Figura 12.** (a) Micelio del control (0µg/ml), observado a 100x, (b) Micelio del tratamiento 4 (900µg/ml), observado a 100x, ambas fotografías muestran diferencias altamente significativas con respecto al tamaño de micelio, ramificación y esporulación.....41

**Figura 13.** Incidencia de *Alternaria solani* sobre plantas de jitomate a los 65 días, bajo condiciones de invernadero.....42

**Figura 14.** Grado de severidad de *Alternaria solani* en planta de jitomate a los 65 días, bajo condiciones de invernadero .....43

## I. INTRODUCCIÓN

En México el jitomate está considerado como la segunda especie hortícola más importante por la superficie sembrada y como la primera por su valor de producción. El principal Estado productor de jitomate en nuestro país es Sinaloa, con un 40% de la producción total del país, seguido por Baja California Norte, San Luis Potosí y Michoacán.

El jitomate es una de las hortalizas más atractivas a nivel mundial, ya sea por su valor nutritivo, como por su uso a nivel industrial, pero muchas veces su producción se ve afectada por la aparición de enfermedades y plagas. Una de las enfermedades fungosas que más afecta la producción de jitomate en nuestro país es la marchitez o tizón temprano, provocado por el hongo *Alternaria solani*, llegando a causar pérdidas en las cosechas hasta de un 80 % y en ocasiones la pérdida total del cultivo (Fernández, 1996). Esta enfermedad es probablemente una de las más frecuentes y destructivas del cultivo del jitomate (FUSAGRI, 1983), y afecta principalmente a las hojas, tallos y frutos, pudiendo ocasionar inclusive la pérdida completa de la producción (Castaño y del Río Mendoza 1994; Dillard *et al.*, 1995).

Los fungicidas sintéticos son ampliamente utilizados para el control de los hongos fitopatógenos, sin embargo, el uso indiscriminado ha originado diversos problemas, como toxicidad a los usuarios y daños al medio ambiente, por lo que se deben extremar las precauciones al utilizarlos (Wilson *et al.*, 1989). Ante esta situación, una alternativa prometedora es el uso de los productos naturales derivados de las plantas para el control de hongos fitopatógenos.

Las raíces de la planta *Heliopsis longipes*, comúnmente conocida como "Chilcuague" en la región de la Sierra Gorda al norte de Guanajuato, presenta una actividad importante como insecticida (Fisher, 1957). Esta planta, que pertenece a la familia *Asteraceae*, ha sido aprovechada en nuestro país con diversos fines, entre los que se pueden mencionar el uso como saborizante, anestésico local, insecticida entre otros. Algunos géneros de la tribu *Heleanthea* como *Heliopsis* y *Acmella* sintetizan compuestos con actividad biológica denominados "alcamidas" los cuales se asocian a tejidos específicos de la planta principalmente en raíces, en las cabezuelas florales y en las semillas. La especie *H. longipes* las presenta principalmente en las raíces mostrando las concentraciones más altas observadas de estos metabolitos (Molina - Torres *et al.*, 1996).

En trabajos anteriores se ha estudiado la actividad fungicida de Afinina purificada. La afinina es la alcamida mayoritaria en raíces de *H. longipes*, y en extracto crudo de la raíz de esta misma planta. El efecto sobre los fitopatógenos *Sclerotium cepivorum* y *S. rolfsii* fue de una actividad inhibitoria del crecimiento del micelio (Ramírez -Chávez *et al.*, 2001).

Por otra parte se ha observado que la bioactividad de este grupo de alcamidas esta en función de las ligaduras insaturadas de la cadena acídica de estas moléculas. La posición y número de las instauraciones así como su isomería, da selectividad a esta actividad. Las propiedades de las alcamidas han sido estudiadas aislando la afinina y reduciéndola catalíticamente en laboratorio. (Molina-Torres *et al.*, 2004).

## II. OBJETIVOS

- I. Evaluar el efecto antifúngico del extracto crudo y parcialmente reducido catalíticamente del Chilcuague (*Heliopsis longipes*) sobre el Tizón temprano (*Alternaría solani*) en condiciones “*in vitro*”.
  
- II. Evaluar el efecto antifúngico del extracto crudo y parcialmente reducido catalíticamente de Chilcuague (*Heliopsis longipes*) sobre Tizón temprano (*Alternaría solani*) en condiciones de invernadero.

## III. HIPOTESIS

La actividad Antifúngica del extracto alcohólico de las raíces de *Heliopsis longipes* está en función del grado de insaturación de Afinina y otras alcanoides presentes en él.

## IV. JUSTIFICACIÓN

En ensayos preliminares en el laboratorio se observó una importante acción inhibitoria de afinina, presente en la raíz de Chilcuague, sobre desarrollo de cultivos “*in vitro*” de *Escherichia coli* y algunos hongos fitopatógenos como *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* (García-Chávez, 1998).

Debido a que existen evidencias que la posición de los dobles enlaces, juegan un papel importante en la actividad fisiológica e insecticida de las alcanidas (Crombie y Krasinski, 1962), nos dimos a la tarea de proceder a una reducción catalítica parcial de la principal alcanida presente en las raíces de *Heliopsis longipes*, afinina, cambiándole así su configuración respecto a los dobles enlaces.

## V. REVISIÓN DE LITERATURA

### 5.1 El cultivo de Jitomate (*Lycopersicum esculentum* Mill)

#### 5.1.1 Origen

El jitomate es una planta originaria de América tropical, cuyo origen se localiza en la región de los Andes (Chile, Colombia, Ecuador, Bolivia y Perú) y donde se encuentra la mayor variabilidad genética y abundancia de tipos silvestres. Las culturas que habitaron la región tuvieron una importancia grande en la domesticación de diferentes especies vegetales y animales. México esta considerado como el centro de domesticación de múltiples especies ahora incorporadas al cultivo agrícola, entre otros del jitomate.

Esta hortaliza fue llevada a Europa en 1554, empezando a comercializarse en Estados Unidos hacia el año 1835. El nombre jitomate, fue acuñado del lenguaje Náhuatl, de la palabra *tomal* o *tomohuac*, que quiere decir “agua gorda” y variantes de este nombre han sido distribuidos alrededor del mundo. Dada la dificultad de los extranjero en pronunciar este nombre ahora se aplica en forma comercial el nombre de tomate, que se refiere en México a *Physalis ixocarpa* también llamado tomate de cáscara, a lo que es el jitomate. La distribución, adaptación ecológica, taxonómica y evolución del jitomate esta sujeta a diversos estudios detallados (Fraire *et al.*, 1993).

### 5.1.2 Descripción Botánica

El jitomate, *Lycopersicon esculentum*, pertenece a la familia *Solanáceas*. Es una planta anual y puede ser considerada semiperenne en regiones tropicales. Su sistema de raíces es fibroso y robusto, pudiendo llegar hasta 1.8 m de profundidad. Los tallos son cilíndricos en plantas jóvenes y angulosos en plantas maduras; alcanzan alturas de 0.40 a 2.0 m.

El racimo floral o inflorescencia esta compuesto por varios ejes, cada uno de los cuales tienen una flor de color amarillo brillante. La inflorescencia se forma a partir del 6<sup>o</sup> ó 7<sup>o</sup> nudo, y cada 1 o 2 hojas se encuentran las flores, en plantas de hábito determinado y en las de hábito indeterminado se forman a partir del 7<sup>o</sup> o 10<sup>o</sup> nudo y cada cuatro hojas.

El fruto del tomate es una baya o sea un fruto redondo, el cual guarda las semillas dentro de cavidades llamadas lóculos. El color más común del fruto es rojo, pero los hay amarillos, naranjas y verdes, siendo el diámetro comercial aproximado a 10 cm.

Las semillas tienen 0.25 cm de longitud, son grisáceas, deprimidas, ligeramente alargadas del hilo, de forma oval y de 3-5 mm de diámetro. La superficie está cubierta de vellosidades (Cultivos anuales en México, 1991).

### **5.1.3 El Cultivo Agrícola del Jitomate: Suelo y Clima**

Para cultivar el jitomate es necesario contar al menos con tres meses y medio de clima cálido con mucho sol, por lo que regularmente se siembra en primavera, no es recomendable el exceso de agua. El suelo con condiciones óptimas para germinación de semillas de jitomate tiene temperaturas desde 15 y 29°C hasta 10 y 30°C. El tiempo promedio que tarda en germinar la semilla a temperaturas óptimas y cuando la semilla se ha sembrado a 1.25 cm de profundidad, es de unos 10 días, pero a las mínimas y máximas indicadas, el tiempo varía de 9 a 43 días. El pH del suelo debe estar entre 5.5 y 6.8. El suelo debe ser profundo, con buena aireación y drenaje.

Las raíces de jitomate pueden penetrar eventualmente hasta 1.20 m de profundidad si no hay barreras de penetración. Por esta razón y bajo condiciones ideales el jitomate que se produce bajo riego, debe de recibir riegos profundos que mojen más que la capa superficial del suelo. Con respecto a la textura del suelo, el tomate se desarrolla en suelos livianos (arenosos) y en suelos pesados (arcillosos), siendo los mejores los arenosos y limo-arenosos con buen drenaje (Casseres, 1991).

#### **5.1.4 Fertilización**

Las dosis de fertilización recomendadas para este cultivo se presentan a continuación:

*Nitrógeno* ( $\text{NH}_4$ ). Existe una enorme variación en las cantidades recomendadas. En las plantaciones de Culiacán se utilizan cerca de 450 Kg/ha, mientras que en la región de Ensenada, las aplicaciones son del orden de los 300 Kg/ha y en estado de Morelos de 150 Kg/ha, por lo que las dosis que se emplean fluctúan entre este rango. La primera aplicación deberá incluir una tercera parte del nitrógeno junto con todo el fósforo y potasio que se aplicará en el ciclo. Se aplica esta fertilización durante el rayado de las camas antes del trasplante, colocada de 10 a 15 cm de profundidad y separada 10-15 cm del centro de la cama. El nitrógeno restante es fraccionado durante la época de desarrollo hasta que la planta continúe formado frutos. Las aplicaciones se realizan a intervalos de 3-4 semanas. La aplicación de este nutriente se hace en bandas y a un lado de la hilera de las plantas e inmediatamente después de efectuar un riego.

*Fósforo* ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ). La cantidad es aplicada es de 150-400 Kg/ha, toda con la primera fertilización del nitrógeno.

*Potasio* ( $\text{K}_2\text{O}$ ). En las regiones del Noroeste del país se utilizan 200-225 Kg/ha, en el resto de las zonas se aplican 80 kg/ha, aplicados en una sola ocasión junto con el fósforo y la tercera parte del nitrógeno (Casseres, 1991).

## **5.2 Importancia comercial del cultivo de Jitomate**

El cultivo de jitomate ocupa un lugar importante entre las hortalizas del mundo, tiene un enorme valor nutricional, (Nevins y Jones, 1987). En México esta considerado como la segunda especie hortícola más importante por la superficie sembrada y como la primera por su valor de producción. A esta hortaliza de fruto se le encuentra en los mercados durante todo el año, y se le consume tanto fresca como procesada en forma de puré o jugo, siendo una fuente rica en vitaminas.

El principal Estado productor de Jitomate es Sinaloa con alrededor de un 40% de la producción total del país, seguido por Baja California Norte, San Luís Potosí y Michoacán. Su producción en los últimos cinco años ha variado. De 1996 a 1997 se mantuvo casi en dos millones de toneladas por año, gran parte destinadas a la exportación.

Los problemas agrícolas de esta hortaliza se presentan en varios niveles, sobresale el del uso excesivo de agroquímicos. Se calcula que se necesitan 115 diferentes tipos de agroquímicos en su producción, en la vida de anaquel y la conservación de su sabor.

## **5.3 Principales enfermedades**

Existen varias enfermedades que afectan el rendimiento del cultivo de jitomate y la calidad de su producción, estimándose que reduce la producción hasta un 20 % en promedio anualmente, o bien destruye totalmente el cultivo si no se controla a tiempo.

Las enfermedades que ocasionan las principales pérdidas son: *Alternaria solani* (Tizón temprano), *Phitophthora infestans* (Tizón tardío), *Fusarium oxysporum* sp. *licoprcisi* (fusariosis) *Colletotrichum* sp. (atracnosis), *Oidiopsis taúrica* (cenicilla) y el Virus del mosaico del tabaco.

### **5.3.1 Tizón Temprano (*Alternaria solani*)**

*A. solani* es la principal enfermedad del cultivo de jitomate bajo condiciones de invernadero, una de las enfermedades fungosas que más afecta la producción de jitomate en nuestro país, llegando a causar pérdidas en las cosechas hasta de un 80% y en ocasiones la pérdida total del cultivo (Fernández, 1996). Esta enfermedad es probablemente una de las más frecuentes y destructivas del cultivo del jitomate y afecta principalmente a las hojas, tallos y frutos, pudiendo ocasionar inclusive la pérdida completa de la producción (Castaño y del Río Mendoza 1994; Dillard *et al.*, 1995).

### **5.3.2 Caracterización Taxonómica**

**Clase:** *Deuteromycetes*

**Orden:** *Moniliales*

**Familia:** *Moniliaceae*

**Género:** *Alternaria*

**Especie:** *solani*

### **5.3.3 Síntomas**

Las lesiones más típicas de la enfermedad se presentan en las hojas más viejas, forma de manchas circulares de color café, donde destacan anillos concéntricos de color más oscuro. Las hojas severamente atacadas cambian de color verde al amarillo, luego café, se desprenden de las ramas, y dejan a los frutos expuestos a quemaduras del sol.

En plantas vigorosas la defoliación avanza lentamente y permite la maduración casi normal de los frutos. Las lesiones en los tallos y ramas son de forma oval, pero al igual que las manchas en las hojas y frutos presentan anillos concéntricos de color café a café oscuro.

### **5.3.4 Ciclo de la Enfermedad**

El hongo puede sobrevivir en el suelo, en residuos de cultivos infestados y malezas, puede sobrevivir en semillas y este es dispersado con la ayuda del viento, agua, insectos, trabajadores y maquinaria agrícola. Las esporas que aterrizan en las plantas de jitomate germinan e infectan las hojas cuando éstas están húmedas, las esporas pueden penetrar las hojas, tallos o frutos. El hongo es más activo cuando ocurren temperaturas moderadas o altas y el ambiente tiene un alto contenido de humedad.

Esta enfermedad es el mayor problema en la época lluviosa. El tizón temprano es mas severo cuando las plantas están estresadas por la fructificación, ataque de nemátodos, o deficiencias de nitrógeno (Castaño *et al.*, 1994).

### **5.3.5 Epidemiología**

El desarrollo máximo del micelio de *Alternaria* se produce a la temperatura de 27°C, mientras que los conidióforos y conidias requieren de una temperatura óptima entre 19 a 23° C para su desarrollo. La mayor esporulación ocurre cuando las colonias del hongo son expuestas a 18°C, alternadamente en un ambiente con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, durante 12 días. Debido a esta alternancia de luz, se forman anillos en las colonias desarrolladas, similares a los anillos característicos que se producen en las manchas de las hojas infectadas en el campo. La enfermedad tiene mayor incidencia cuando los cultivos están expuestos a una alternancia de períodos lluviosos y secos. Los riegos por aspersión, también favorecen, una mayor incidencia de la enfermedad.

## **5.4 Fungicidas**

### **5.4.1 Definición**

Es una sustancia química que se utiliza para la eliminación y control de hongos en las plantas, por lo que es uno de los elementos más importante para el control de las enfermedades fungosas (Diccionario Agropecuario de México, 1982).

### **5.4.2 Clasificación**

Existen diversas formas de clasificar los fungicidas en función de: su naturaleza química; el momento de aplicación; el sitio de aplicación; o por su forma de acción a nivel hospedante.

#### **5.4.2.1 Por su naturaleza química**

- 1) Los fungicidas inorgánicos como son; sales de azufre, de cobre, entre otros.
- 2) Los fungicidas orgánicos se agrupan en varias familias de acuerdo a los grupos funcionales. La familia de los ditiocarbamatos, benzimidazoles, fenilamidas.

#### **5.4.2.2 Por el momento de aplicación**

- 1) Preventivos, previenen el establecimiento de nuevas infecciones, sin tener ningún efecto sobre infecciones ya establecidas.
- 2) Curativos, eliminan o curan infecciones ya establecidas en el interior de los tejidos de la planta, sin embargo no eliminan, los daños o lesiones ya visibles en el exterior de la misma.

#### **5.4.2.3 Por su sitio de aplicación**

Al suelo, al follaje o a los productos cosechados.

#### **5.4.2.4 Por su forma de acción a nivel hospedante**

- 1) Los de contacto, que impiden la germinación de las esporas al ponerse en contacto con ellas, formando una capa protectora sobre la superficie del follaje, impidiendo que las esporas germinen.
- 2) Los sistémicos, son aquellos que aplicados al suelo o al follaje, son absorbidos por la planta y traslocados a través del sistema vascular; eliminando las infecciones ya establecidas en el interior de la misma, protegiéndolo a si los brotes nuevos.

### **5.4.3 Problemas de los fungicidas**

El uso de agroquímicos ha permitido obtener incrementos substanciales en la producción, no obstante, sus efectos adversos están impactando de manera significativa la sostenibilidad de la agricultura. Los fungicidas son sustancias tóxicas a múltiples organismos cuya aplicación debe ser controlada. Entre los daños ambientales ocasionados a la largo plazo por el uso indiscriminado de fungicidas esta la contaminación irreversible de los suelos, de los mantos freáticos, de las aguas manantiales, costeras y su inclusión en la cadena alimenticia (Cebrian, 1998).

La práctica del monocultivo y la contaminación por el uso indiscriminado de agroquímicos han reducido la biodiversidad de los agroecosistemas, causando la inestabilidad de los mismos, la cual se manifiesta en una mayor incidencia de plagas y enfermedades en los cultivos, entre otros efectos nocivos. Esto y los problemas de seguridad y salud pública inherentes a la fabricación y uso de agroquímicos han conducido a la búsqueda y establecimiento de alternativas de manejo de plagas y enfermedades.

## **5.5 Mecanismos de defensa de las plantas**

Los vegetales producen una diversidad de sustancias, producto del metabolismo secundario, algunas responsables de la coloración y aromas de flores y frutos, otras vinculadas con interacciones ecológicas, como es el caso de la atracción de polinizadores y los compuestos tóxicos a depredadores (Salgado-Garciglia, 1995). Actualmente, se ha demostrado que la mayoría de ellos participan en el mecanismo de defensa de las plantas, como son las fitoalexinas y los alelopáticos, por mencionar algunos estos metabolitos permite una amplia gama de usos en la agricultura y en la medicina. Teniendo como base nuestra riqueza vegetal, es de interés la búsqueda y estudio de las especies vegetales que puedan ser fuente de productos naturales con actividad biocida limitada y selectiva, lo que nos permitiría proponer nuevas alternativas para el combate de las plagas sin dejar de lado el cuidado del medio ambiente (Salgado-Garciglia, 1995).

## **5.6 Uso de extractos vegetales**

Las plantas a través de su evolución han generado diferentes sustancias. Así mismo, las plantas han sido fuente de productos que han mostrado cierta actividad antimicrobiana e insecticida. Diversos grupos de investigadores de todo el mundo se han dado la tarea de demostrar el potencial de los metabolitos secundarios vegetales como plaguicidas (Ley, 1990).

Para su estudio la Fitobioquímica permite aislar e identificar y analizar la bioquímica de los principios activos de numerosas plantas con actividad biológica, tal es el caso de las plantas medicinales. Por el potencial que representan estos metabolitos, las investigaciones no solo se han dirigido a la elucidación de estructuras químicas sino a la evaluación de su actividad biológica mediante bioensayos.

En los últimos años se ha enfatizado la utilización de productos vegetales como plaguicidas selectivos, esto con la idea de lograr una disminución en la utilización de compuestos químicos sintéticos para el control de plagas que afectan los cultivos de valor agronómico. Por los problemas de costos, ó del poco conocimiento de los principios activos y de su acción biológica, y/o la domesticación de las plantas fuente, los extractos vegetales aún no han podido ser utilizados comercialmente en forma masiva (Metcalf, 1982). Los productos de origen vegetal tienen como característica ser específicos en su acción y presentan vulnerabilidad a los factores del medio ambientales, inactivándose en poco tiempo, debiendo utilizar los compuestos en mezclas para aniquilar varias plagas, aplicándose más de dos veces durante el desarrollo del cultivo (Maclaren , 1986).

Los fungicidas orgánicos son normalmente preventivos, es decir que deben aplicarse antes de la aparición de la enfermedad, para proteger las plantas, por tal razón se denominan fungistáticos ya que inhiben primordialmente la germinación de esporas del hongo. Existe información sobre alrededor de 400 plantas con propiedades contra 142 especies de hongos y otras plantas contra 23 taxa de bacterias y 19 virus (Grainge *et al.*, 1988).

### 5.6.1 Uso de extractos vegetales en agricultura.

La industria de los plaguicidas agrícolas tuvo su base en los inicios la utilización de compuestos de origen vegetal, entre los más comunes se encuentran las piretrinas, obtenidas de *Crysanthemum cinerariaefolium* el primer insecticida de origen vegetal (Montes, 1996). Respecto al uso de extractos vegetales para el control de plagas y enfermedades las investigaciones han sido enfocadas en mayor proporción al combate de insectos, que al efecto sobre microorganismos patógenos de plantas como son los hongos y las bacterias (Lagunas *et al.*, 1984).

Una de las sustancias utilizadas por muchos agricultores para el combate de hongos fitopatógenos, es el extracto de *Equisetum* sp., conocido como platero, rabo de mula, *Equisetum* o cola de caballo, este contiene ácido salicílico en proporciones hasta de 65 % lo cual le confiere al extracto, propiedades fungicidas e insecticidas. Existen reportes promisorios de evaluaciones "*in vitro*" de diversos extractos o aceites provenientes de plantas con actividad antifúngica, lo cual nos da la pauta para realizar estudios correspondientes en campo y así determinar su factibilidad como alternativa para el control de enfermedades (Grainage *et al.*, 1988).

Recientemente, en el ámbito nacional se llevan acabo estudios de evaluación "*in vitro*" de extractos de plantas del semidesierto, entre ellas la gobernadora y el hojásén colectadas en diversas regiones de nuestro país, contra microorganismos *Phytophthora infestans* y *Rhizoctonia solani* (Gamboa, 2002).

El extracto obtenido a partir de las flores de *Spilanthes americana* y otras plantas cercanamente relacionadas a *H. longipes* también ha presentado resultados favorables en el tratamiento de algunas micosis, como pie de atleta, y de virus en el caso de *Herpes simplex* y *Herpes zoster* (Ospina *et al.*, 1986). El extracto de *H. longipes* ha sido evaluado "in vitro" como fungicida, sobre el desarrollo de *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotium cepivorum*. (Ramírez-Chávez *et al.*, 2001). El "Chilcuague", comúnmente conocido en la región de la Sierra Gorda al norte de Guanajuato, presenta una actividad importante como insecticida (Fisher, 1957). Sus raíces han sido utilizadas como vermífugo, anestésico local, así como condimento de alimentos y saborizante de bebidas (Martínez, 1994).

Formando parte de las especies importantes de la familia *Asteraceae* que han sido aprovechadas en nuestro país con diversos fines se encuentran las plantas del género *Heliopsis*. Varias especies de este género sintetizan unos compuestos con actividad biológica denominados "alcamidas" los cuales se asocian a tejidos específicos de la planta principalmente en raíces, las cabezuelas florales y en las semillas, pero en algunas especies se distribuyen en la planta completa, la especie *Heliopsis longipes* las presenta en sus raíces (Molina-Torres *et al.*, 1996). *H. longipes* tiene una larga tradición en la herbolaria indígena que se puede ilustrar por su nombre de origen Náhuatl "chilmecatli" (de chili, chile y mecatli, mecate, aludiendo a las raíces filiformes y el sabor picante de éstas) o chilcuague (chile de víbora). Esta planta acumula afinina en las raíces y en las semillas.

## **5.7 Generalidades de *Heliopsis longipes***

El género *Heliopsis* pertenece a la tribu *Helianthaeae* de la familia *Asteraceae*, también conocida como *Compositae*. La mencionada tribu comprende cerca de 2,500 especies agrupadas en 189 géneros y esta fraccionada en diez subtribus *Philactis*, *Sanvitalia*, *Acmella*, *Podachaenium*, *Squamopappus*, *Spilanthes* y *Salmea*, conformada la subtribu Zinniinae (Bremen, 1994). *Heliopsis*, esta asignada a esta última subtribu. Algunas especies del género *Heliopsis*, particularmente las de Norteamérica han recibido una especial atención, existe aún discusión con respecto a la ubicación taxonómica de algunas de ellas lo cual se atribuye a los escasos estudios que al momento se han llevado a cabo sobre este taxón (McVaugh, 1984).

### **5.7.1 Caracterización Taxonómica**

**Nombre común:** Chilcuague o Raíz Azteca

**Nombre botánico:** *Heliopsis longipes*

**Súper Orden:** *Asteridae*

**Orden:** *Asterales*

**Familia:** *Asteraceae*

**Tribu:** *Heliantheae*

**Género:** *Heliopsis*

**Especie:** *Heliopsis longipes*

### 5.7.2 Distribución Geográfica

*H. longipes* habita en lo que se conoce como la Sierra Gorda, entre 1,825 y 2,250 metros de altitud en los municipios de Xichú, Atarjea, Victoria, San Luís de la Paz y cerca de la hacienda La Meza y en Palmillas, Vergel, Mácula, Ahorcados, Charco Azul, y Santa Catarina, todas localidades de Guanajuato, también al sur de San Luís Potosí y al norte del Estado de Querétaro. Sin embargo, en la actualidad esté mucho más restringida su distribución, limitándose a algunas zonas donde se cultiva en forma rústica en los municipios de Atarjea y Xichú (García-Chávez, 1998).



**Figura 1.** Distribución Geográfica del Chilcuague (*H. longipes*) en el Estado de Guanajuato.

### **5.7.3 Características Biológicas**

El Chilcuague (*H. longipes*) es una planta perenne y herbácea, ya que completa su ciclo de vida en tres años o más. Tiende a crecer de dos formas: erecta y subdecumbente. Es escasamente ramificada desde su base con los tallos semileñosos en su parte inferior y de 20 a 70 cm., de altura. Las raíces son gruesas, toscas, fibrosas y miden de 10 a 15 cm. de largo por 3 mm. de ancho. Los tallos, con nudos de 2.5 a 5 cm. de largo, tienen un grosor aproximado de 1 a 1.5 mm. y son glabros en la base y de escasa a densamente escabros en su parte superior. Las hojas son opuestas y ovaladas, aserradas con pecíolos cortos y miden de 2-3 cm. de largo y de 1 a 2.3 cm. de ancho y tienen una forma que varía de oblongo lanceolada a elíptica. Las cabezuelas son largamente pedunculadas y de color amarillo (McVaugh, 1984).

### **5.8 Metabolismo**

Para muchos organismos, incluyendo al hombre, la materia y la energía son suministradas por ciertas sustancias orgánicas como carbohidratos, proteínas, grasas, que sufren algunas transformaciones para ayudar a los organismos a cumplir sus funciones vitales, a estas transformaciones se les denomina como metabolismo por lo tanto, metabolismo se podría definir como el conjunto de cambio de sustancias y transformaciones de energía que tiene lugar en los seres vivos.

### **5.8.1 Metabolitos Primario**

Los organismos vivos poseen rutas metabólicas por las cuales sintetizan y utilizan las especies químicas por las cuales sintetizan y utilizan las especies químicas orgánicas esenciales, tales como azúcares, aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos, a este proceso se le conoce como metabolismo primario, cuyos compuestos primarios son denominados metabolitos primarios. Estos compuestos primarios son indispensables para la supervivencia de los organismos (Lehninger, 1994).

### **5.8.2 Metabolismo Secundario**

En varios organismos, especialmente en las plantas se produce otro tipo de sustancias llamadas metabolitos secundarios. Estos son productos naturales que no funcionan directamente en las actividades bioquímicas primarias que soportan el crecimiento y reproducción del organismo (Conn, 1981).

Para conocer mejor el concepto de metabolitos secundarios, es importante relacionarlos con el mecanismo de supervivencia de las plantas, un hecho conocido es el que la mayoría de los animales dependen de su movilidad para obtener su comida y evadir a sus depredadores. En el caso de las plantas se sabe que estas carecen de movilidad y necesitan de otros mecanismos alternativos para sobrevivir. Uno de estos mecanismos es la síntesis de compuestos secundarios.

Estos son utilizados por la planta para impedir el ataque de depredadores, atraer a los insectos polinizadores o satisfacer alguna otra necesidad. Además de estas funciones, se tiene evidencias por distintos investigadores que los productos secundarios pueden servir en distintos mecanismos de defensa de las plantas (Conn, 1981).

#### **5.8.2.1 Las Alcamidas**

En las raíces de la especie *H. longipes* se producen metabolitos secundarios, que son ejemplo de la evidencia en sus mecanismos de defensa. Alguno de estos metabolitos es el conjunto de alcamidas o mejor llamadas alquilamidas que se forman en las raíces de esta planta. Estas sustancias son producto de condensación de un ácido graso, con una amina (Kirk-Othmer *et al.*, 1978).

El grupo funcional amida es ubicuo; se encuentra en todos los organismos vivos constituyendo la unión peptídica, esto es, en la unión entre los aminoácidos para la formación de la estructura primaria de las proteínas, base funcional de la vida como la conocemos hasta ahora.

Las amidas como productos naturales, por otra parte, no son tan abundantes. Un ejemplo interesante de este grupo de compuestos es el de las alquilamidas o alcamidas que comprenden un grupo de aproximadamente 70 estructuras conocidas y distribuidas a lo largo del reino vegetal. Desde el punto de vista biogénico, las alcamidas representan una clase distinta de productos naturales que se forma al combinar dos diferentes rutas metabólicas.

Están constituidas por la unión de un ácido graso, de longitud de cadena de mediana a larga que puede ser de ocho a dieciocho carbonos generalmente alifática o lineal, unida a una amina proveniente de algún aminoácido.

En esta reacción ocurre una descarboxilación al momento de condensación. Dependiendo del número de enlaces o ligaduras dobles que presenten, las alcanidas se han dividido en dos grupos principales: alcanidas olefínicas, que tienen sólo dobles ligaduras, y alcanidas acetilénicas, con al menos una triple ligadura, y las que presentan anillos homo o heterocíclicos que se observan principalmente en la familia Piperaceae.

#### **5.8.2.1.1 Las alcanidas olefínicas**

Junto con las de anillos homo o heterocíclicos, son las más importantes para el metabolismo secundario y de aquellas utilizadas mayoritariamente por el hombre. Las alcanidas son consideradas como compuestos bioactivos, esto es, una pequeña cantidad de estos compuestos presenta una respuesta notable en las células receptoras. Se manifiestan en unos cuantos grupos de plantas, de los cuales los más importantes están presentes en las familias *Asteraceae* (anteriormente Compuestas), y *Solanaceae* (familia de las papa), más específicamente en las especies del género *Capsicum* (chiles) y en la familia *Piperaceae* (familia de la pimienta). Cada una de ellas tiene características individuales pero es interesante que sus moléculas bioactivas presentan estructuras químicas relacionadas. Han demostrado su eficacia como compuestos medicinales, saborizantes e incluso en control biológico, por lo que son un grupo de metabolitos de gran interés actual.

#### 5.8.2.1.1.1 Afinina

En 1903 por primera vez fue reportado el compuesto denominado "Afinina" por un investigador llamado Gerber, quien hace notar la presencia de compuestos con actividad anestésica y que producen salivación, en plantas utilizadas en la herbolaria tradicional (Acree *et al.*, 1945). El compuesto se aisló de las raíces de colectadas en la Sierra Gorda de Guanajuato, pero careciendo de partes aéreas se identificaron erróneamente como de la planta *Erigeron affinis*, por lo tanto el compuesto se denominó afinina y fue el Dr. S.F. Blake quien la identificó exactamente. Simultáneamente este compuesto fue aislado de plantas pertenecientes al género *Spilanthes oleracea* J. (ahora *Acmella oleracea*), reportándolo como un compuesto químico activo denominado "spilantol".

La Afinina o espilantol se aisló inicialmente de raíces y de partes aéreas respectivamente de dos géneros de la familia *Asteracea*: de *H. longipes* conocido como "Chilcuague" o Raíz azteca" y de *Acmella (Spilanthes) oppositifolia*, llamado "Botón de Oro".

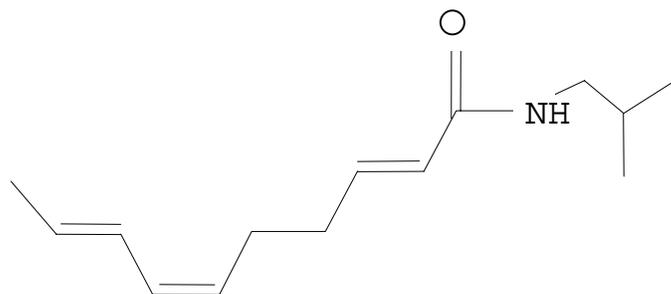
La Afinina es la alcaloide de mayor importancia presente en varias especies la tribu *Heliantheae* las cuales están bien identificadas, siendo las raíces de *H. longipes* las que presentan mayor cantidad de alcaloides en comparación con las otras *Heliantheas* (Molina–Torres *et al.*, 1996). La afinina considerada como la principal alcaloide responsable de los efectos biológicos (anestésico, fúngico, etc.) observados en esta raíz (Martínez, 1994).

Existen informes de la actividad insecticida de la afinina con poblaciones de la mosca doméstica (Crombie y Krasinki, 1962) y con poblaciones de un lepidóptero: *Diaphania hyalinata* y un díptero: *Aedes aegypti* (Jacobson, 1971).

Por sus propiedades insecticidas en la década de los 50' se llevó casi a su extinción para satisfacer la demanda de exportación a Estados Unidos durante la segunda guerra mundial. Esta especie fue la primera donde se observó la presencia de una alcanida olefinica (Johns *et al.* 1982).

#### 5.8.2.1.1.2 Propiedades Fisicoquímicas

La afinina se describe como un aceite viscoso, soluble en disolventes, por ejemplo: cloroformo, éter, benceno, etc., y prácticamente insoluble en soluciones ácidas y alcalinas. Tienen una banda de absorción máxima de 228.5 nm. en la región ultravioleta, con un punto de ebullición de 114°C a 0.2 mm Hg. de presión, un punto de fusión de 23°C y un peso molecular de 221.33. Compuesta en un 75.96% por carbono, en un 10.47% por hidrogeno y un 7.235% por nitrógeno (Merck , 1989).



**Figura 2.** Fórmula estructural de la Afinina *N*-isobutil *2E,6Z,8E* decatrien amida, principal componente bioactivo presente en el extracto crudo de las raíces del Chilcuague (*Heliopsis longipes*).

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Obtención del extracto de crudo y parcialmente reducido catalíticamente.

- a) Los especímenes de *H. longipes* se colectaron en Puerto de Tablas, municipio de Xichú, ubicado en la Sierra Gorda de Guanajuato, a altitudes entre 1500 y 2500 m en terrenos alterados de bosque de encinos (*Quercus* spp.) y con pendientes pronunciadas, la precipitación anual del lugar oscila entre 500 y 1000 mm con una estación de lluvias que ocurre de mayo a septiembre.
- b) Se maceraron 1.5 kg. de raíces de Chilcuague y se colocó el macerado en un garrafón que contenía 10 lt. etanol, se dejó reposar en baño María durante 72 horas.
- c) Trascorrido el tiempo se colectó el sobrenadante, que es nuestro extracto crudo, este se concentró por medio de un rota vapor con vacío a una temperatura de 45°C.
- d) Una vez concentrado se sometió a Cromatografía de gases acoplado con detector selectivo de masas (CG-MSD) para su identificación y cuantificación.

En resumen, un cromatógrafo de gases funciona de la siguiente forma: un gas inerte, que en este caso fue Helio, fluye en forma continua desde un cilindro de gas a través del inyector, la columna y el detector. La velocidad de flujo del gas se controla para asegurar tiempos de retención reproducibles y minimizar las variaciones y ruidos en el detector. La muestra se inyecta, normalmente con una micro-jeringa, en el inyector que se encuentra a alta temperatura donde se vaporiza y es transportada a la columna, en general de 15 a 30 m de largo, cubierta en la parte interior por una

película de un líquido de alto punto de ebullición, la fase estacionaria. La muestra se reparte entre la fase móvil y la estacionaria de modo de que los componentes individuales se separen en base a su solubilidad relativa en la fase líquida y su presión de vapor relativa.

Luego de la columna, el gas y la muestra pasan a través de un detector, donde se mide la cantidad de cada componente y se genera una señal eléctrica. Esta señal se transmite a un sistema de registro e integración, el cual genera un cromatograma que representa un registro del análisis. En la mayor parte de los casos, el sistema integra automáticamente el área de cada pico, realiza los cálculos e imprime un reporte con los resultados cuantitativos y los tiempos de retención.

- e) Se preparó una curva de calibración utilizando un estándar de referencia, luego de analizar la muestra, y se calculó la concentración de la muestra, en base a los valores estándares obtenidos.
- f) Posteriormente se tomaron 20 ml de la muestra concentrada (Extracto crudo) y se colocaron en un tubo de ensaye, se le adicionaron 0.10 g de óxido de platino y se hidrogenó durante un periodo de 12 h.
- g) Se tomó una alícuota de 0.50  $\mu$ l del extracto en hidrogenación en un vial y se analizó en Cromatografía de gases acoplado con espectro de masas (CG-MSD) para su identificación y cuantificación.
- h) Para calcular la concentración del extracto reducido, se hizo una curva de calibración con estándares externos.
- i) Los extractos obtenidos fueron utilizados para la realización de los Bioensayos.

## 6.2 Condiciones de cultivo "*in vitro*"

El experimento se realizó en el laboratorio de Fitobioquímica del Departamento de Biotecnología y Bioquímica de Plantas del CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato. Se efectuó utilizando el extracto crudo de Chilcuague, y reducido parcialmente en forma catalítica.

En cada experimento se evaluaron, además de un control (0 µg/ml), cuatro concentraciones de Afinina: 150, 300, 600, 900 µg/ml. La actividad antifúngica del extracto crudo conteniendo esta amida se evaluó con base en la capacidad de inhibición del desarrollo micelial de la especie *Alternaria solani* comúnmente conocido como Tizón Temprano del jitomate. La cepa de *Alternaria solani* fue donada por el laboratorio de Bioquímica Ecológica del Departamento de Biotecnología y Bioquímica de plantas del CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato.

### 6.2.1 Bioensayos

- a) Para la preparación del medio de cultivo, se pesaron 9.75g de PDA deshidratado en 250 ml de agua destilada disolviendo completamente y esterilizando a 121°C por 15 minutos.
- b) Posteriormente se utilizaron cuatro matraces erlenmeyer de 250 ml , por cada Bioensayo, previamente esterilizados. Fueron marcados correctamente con el tratamiento correspondiente para evitar un error, a los cuales se le administraron concentraciones 150, 300, 600, 900 µg/ml y al mismo tiempo un control como testigo del crecimiento, el que solo contenía etanol. Esto se realizó para que no existan dudas de que el etanol utilizado en la

resuspensión de los compuestos, fuera el causante de la inhibición del crecimiento.

- c) Enseguida se le agregaron 100 ml por tratamiento de medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) el cual es utilizado para el crecimiento de hongos.
- d) Posteriormente se vació el medio preparado con el extracto en cajas petri y una vez que se solidificó se inicio la inoculación con discos de micelio de *Alternaria solani* de 5 mm de diámetro. Este corte se realiza con ayuda de un horador. Por cada tratamiento se obtuvieron tres repeticiones y se incubaron en la oscuridad a 25°C durante 15 días.
- e) Después de 15 días de incubación se determinó el peso seco del micelio, variable a la cual se aplicó un análisis de varianza.
- f) Se realizaron los bioensayos correspondientes al extracto crudo, reducido catalíticamente durante 12 hrs.

### **6.2.2 Determinación del peso seco del micelio**

El peso seco del micelio se determinó mediante la metodología siguiente:

- a) Las cajas petri con el micelio se colocaron en una autoclave, hasta unas quince libras, una vez alcanzada esta presión, se retira del fuego y se esperó que esta se redujera y la temperatura bajara.
- b) De cada caja fue separado el micelio del medio con una espátula y colocado en papel filtro Whatman No 1 previamente secado, pesado y numerado, en un embudo con un matraz al vacío, donde se le aplicó agua tibia para eliminar los residuos solubles de PDA.

- c) El papel filtro que contenía el micelio fresco se sometido a deshidratación en un horno a temperaturas de 60°C durante 24 horas.
- d) El papel filtro fue pesado en una balanza digital donde por diferencia de pesos se obtuvo el peso del micelio.
- e) Finalmente se determinó el peso seco del micelio, variable a la cual se aplicó un análisis de varianza en un diseño completamente al azar.

### **6.3 Condiciones de cultivo en invernadero**

- a. El trabajo se desarrolló en las áreas experimentales del CINVESTAV en los meses de Enero a Junio del año en curso.
- b. El experimento se realizó bajo condiciones de invernadero en instalaciones del CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato, con el propósito de mantener controladas las condiciones ambientales, como son la temperatura y la humedad.
- c. Se utilizó semillas de jitomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) variedad Río Fuego, con un porcentaje de germinación de 85 al 90%.
- d. Se utilizaron semilleros, los cuales fueron sembrados el 27 de Enero del 2005.
- e. El trasplante se realizó el 7 de Marzo a macetas de 5 litros.
- f. Las labores culturales se realizaron según las normas técnicas para el cultivo en la época óptima: Riegos cada tercer día, Inspección cada ocho días, Fertilización cada quince días.
- g. La aplicación de extracto crudo se realizó un mes después del trasplante y aplicaciones cada quince días.
- h. La evaluación se realizó de acuerdo a la escala visual.

### **6.3.1 Evaluación del grado de infección de *Alternaria solani* en plantas de jitomate bajo condiciones de invernadero.**

- a. Los experimentos se desarrollaron bajo un diseño de bloques completamente al azar con 10 repeticiones.
- b. La evaluación de *A. solani* se realizó a los 65 días después del trasplante evaluándose los siguientes aspectos:

1- *Incidencia*: se tomaron 50 hojas de las plantas de jitomate por tratamiento y se determinó el número de ellas que presentaban síntomas de la enfermedad.

2- *Severidad*: a las mismas 50 hojas anteriores se les determinó el porcentaje del área afectado por la enfermedad.

Para ello se utilizó una escala visual del 1 al 5, donde 1= ningún nivel de daño y 5= Plantas completamente afectada.

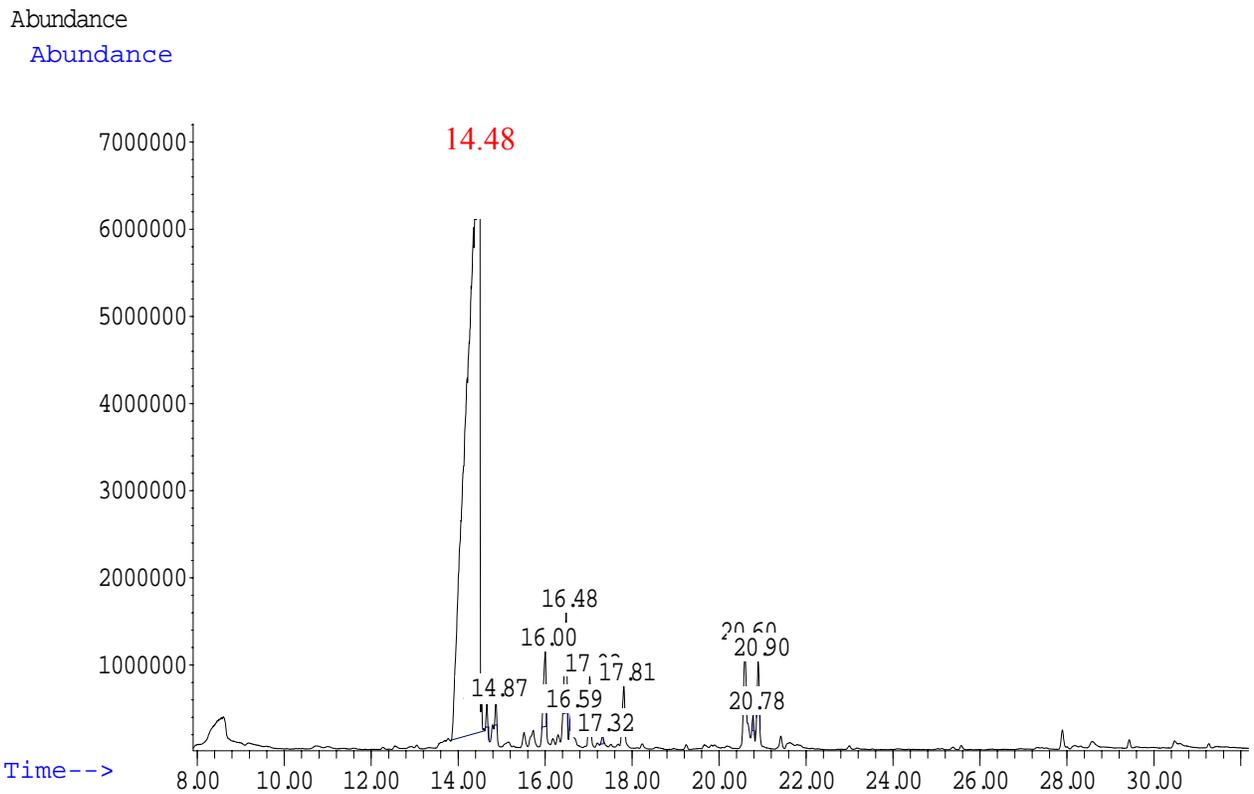
## VII. RESULTADOS

### 7.1 Resultados obtenidos “*in vitro*”

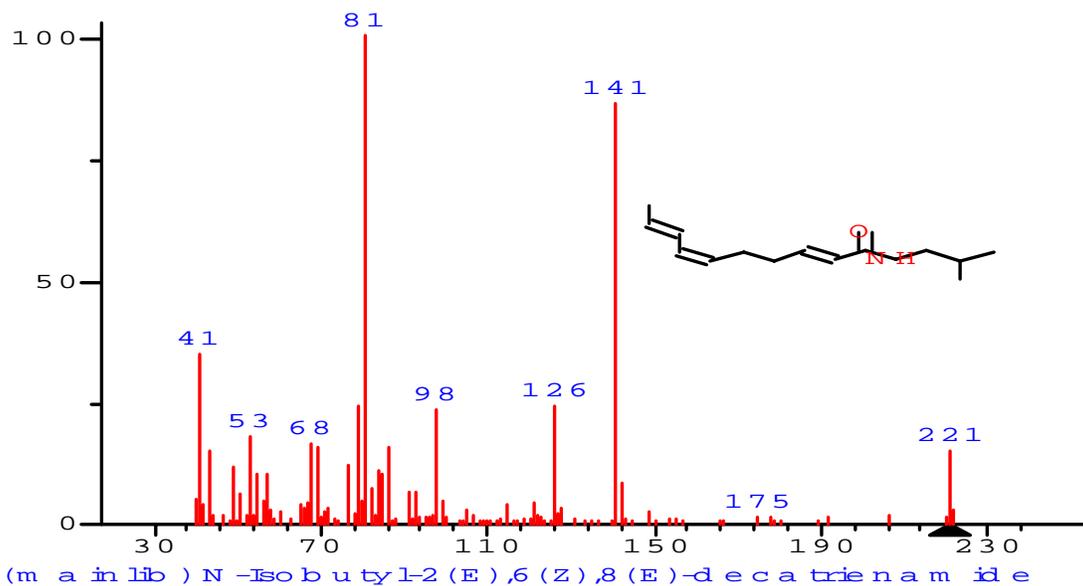
El extracto crudo y el readucido catalíticamente de Chilcuague se sometieron a un análisis de cromatografía de gases acoplado a un detector selectivo de masas (CG-MSD) para identificar y cuantificar los compuestos mayoritarios presentes.

La **Figura 3**. Muestra el Cromatógrama del extracto crudo de Chilcuague, en el cual se aprecia un pico mayoritario con un tiempo de retención de 14.48 minutos que representa Afinina, la cual fue identificada por Acree en 1945 (Jacobson, 1954), además de otros picos que corresponden a otras Alcamidas que se encuentran en menor proporción (García-Chávez *et al.*, 1998).

Con la finalidad de confirmar que el compuesto aislado es Afinina se llevó a cabo un estudio de la comparación del espectro de masas del analito extraído en la columna contra la Biblioteca AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System) del National Institute of Standards and Technology ([www.amdis.net](http://www.amdis.net)). La **Figura 4**. Nos muestra el espectro de la afinina incluyendo los diferentes fragmentos resultantes de la ionización de molécula, caracterizándose por los picos base de  $m/z$  81, 141, y el ión molecular es de  $m/z$  221, observándose que la diferencia es mínima comparado con la molécula de la base de datos de la biblioteca NIST, por la que concluimos que ambos son idénticos.



**Figura 3.** Cromatógrama del extracto crudo de Chilcuague (*H. longipes*) en el cual se aprecia el pico mayoritario con un tiempo de retención de 14.48 minutos que corresponde a Afinina.



**Figura 4.** Espectro de masas de Afinina (*N-isobutil-2E-6Z-8E dicatrienamida*) muestra las diferentes fraccionamientos de Afinina caracterizándose por los picos base de m/z 81, 141, este es el fraccionamiento más común de Afinina, así como su ión molecular de m/z 221.

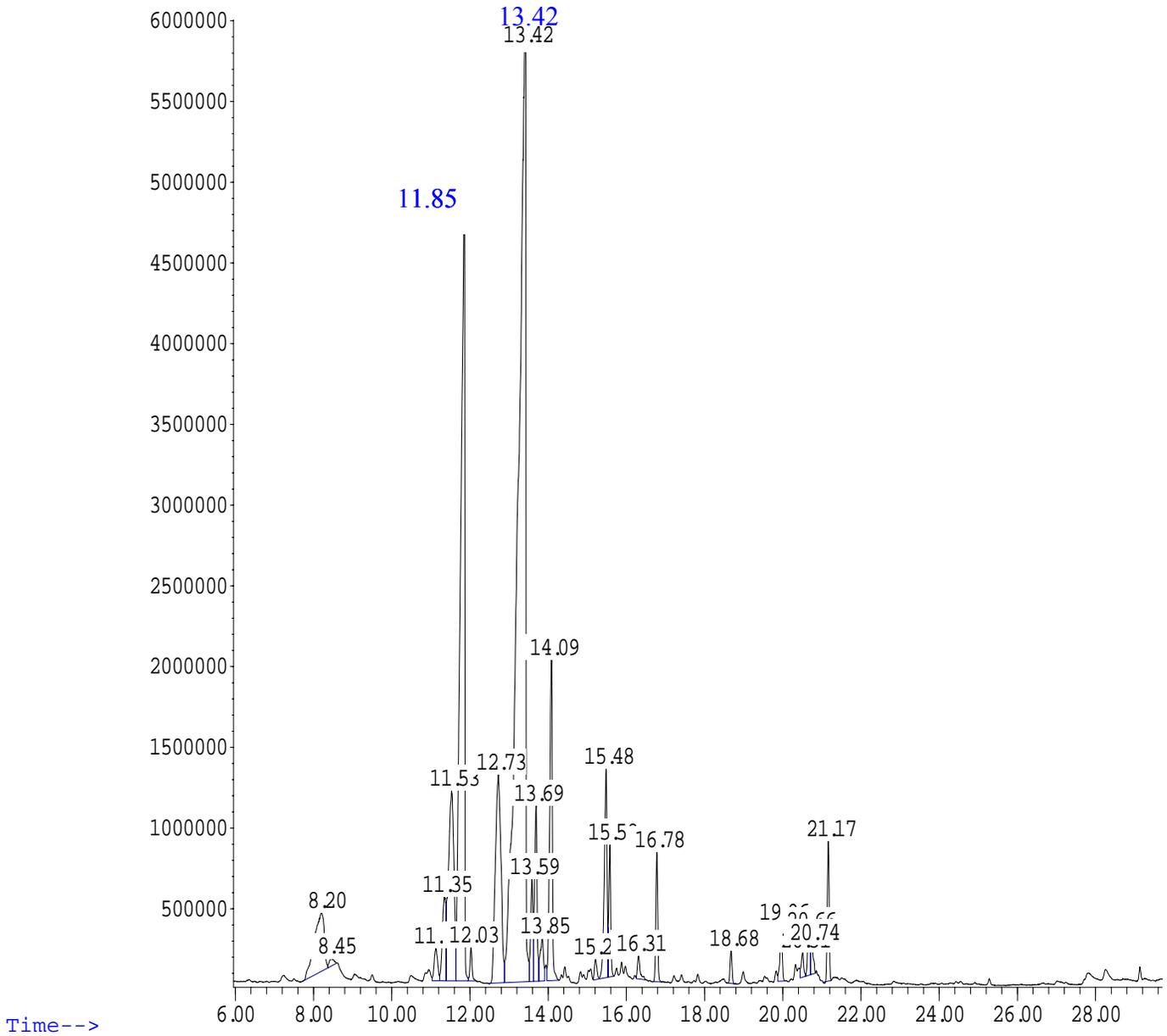
Una vez identificado la alcanida mayoritaria del extracto, se llevó a cabo la reducción parcial de la misma, por medio de una Hidrogenación Catalítica en presencia de Oxido de Platino (PtO<sub>2</sub>), en la **Figura 5**. Se observa el cromatógrama del extracto parcialmente reducido catalíticamente durante un periodo de 12 h. Donde se muestra el pico mayoritario con un tiempo de retención de 13.42 minutos, que representa *N*-isobutil-2*E*-decenamida y 11.85 minutos que corresponde *N*-isobutil-decanamida, observándose la ausencia de Afinina, además otros picos minoritarios de otras alcanidas e isomería de las mismas presentes.

El espectro de masas de la **Figura 6**. Muestra el ión molecular con un valor  $m/z$  227, así como los diferentes fraccionamientos de *N*-isobutil-decanamida

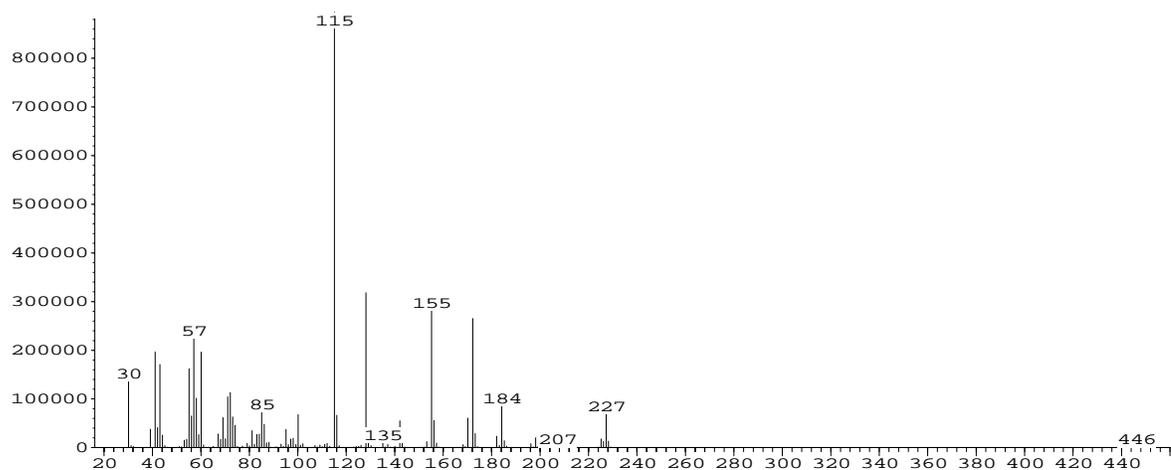
Caracterizándose por 2 picos base de  $m/z$  115 y 155.

En la **Figura 7**. Se muestra el ión molecular con un valor  $m/z$  225, así como los diferentes fraccionamientos de *N*-isobutil-2*E*-decenamida caracterizándose por 2 picos base de  $m/z$  153 y 155.

Abundance

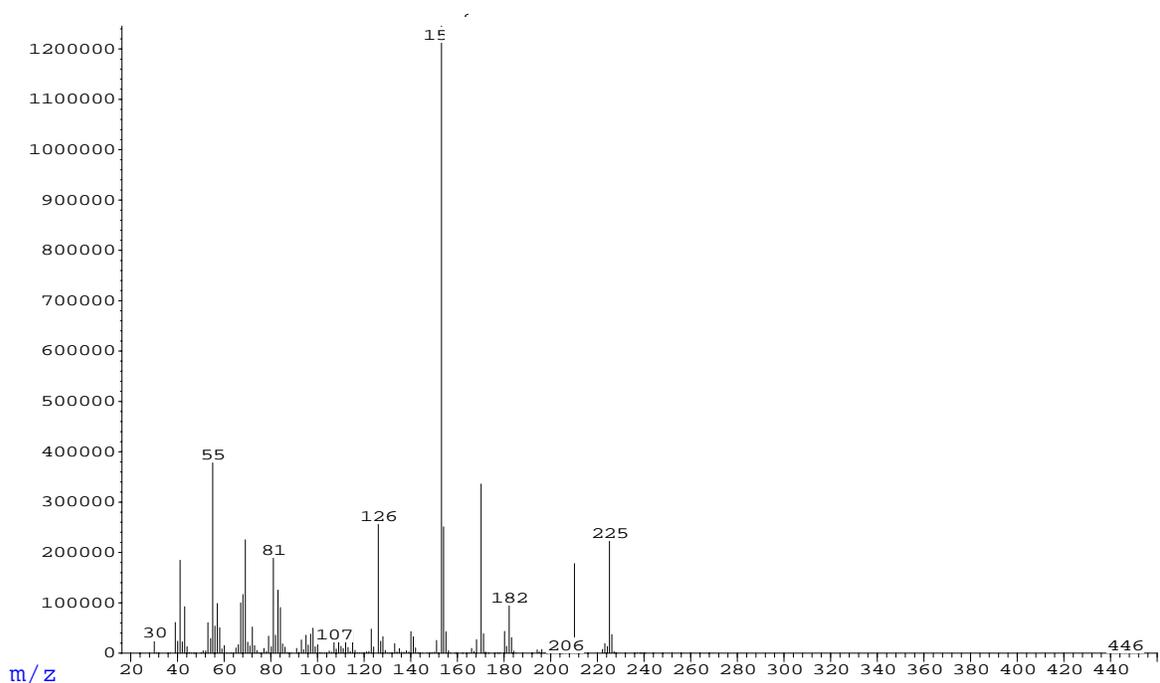


**Figura 5.** Cromatograma del extracto reducido catalíticamente durante 12 hrs de Chilcuague (*H. longipes*) que muestra los picos mayoritarios que representan *N*-isobutil-2*E*-decanamide y *N*-isobutil-decanamide.



**Figura 6.** Espectro de masas de *N*-isobutil-decanamide que muestra el ión molecular con un valor  $m/z$  227, así como los fraccionamientos.

Abundance

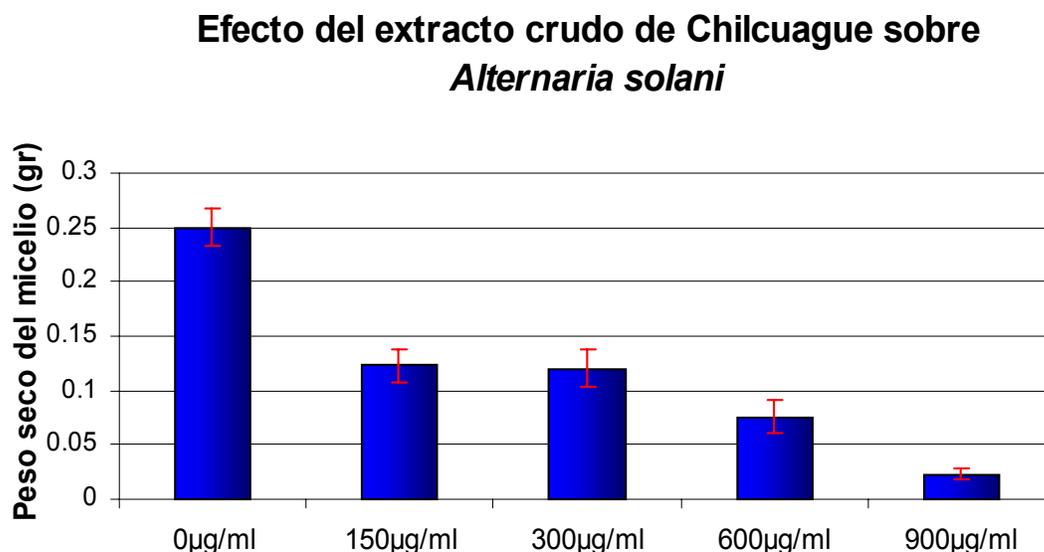


-->

**Figura 7.** Espectro de masas de *N*-isobutil-2*E*-decanamide que muestra el ión molecular con un valor  $m/z$  225, así como los fraccionamientos.

La **Figura 8**. Muestra el efecto Negativo del extracto crudo de Chilcuague (*H. longipes*) sobre el desarrollo micelial de *A. solani* bajo condiciones “*in vitro*”, la acción inhibitoria del extracto fue notable ya que conforme aumenta la concentración de la alcalamida mayoritaria del extracto (Afinina) presentaba una mayor inhibición micelial, como consecuencia se obtenía un menor peso seco del micelio.

En cuanto al comportamiento de los tratamientos 150µg/ml y 300µg/ml presentaron un peso seco inferior a 0.15gr, mientras que el tratamiento 600µg/ml mostró un peso seco inferior a 0.1gr, sin embargo el mejor tratamiento del experimento fue el de 900µg/ml que presentó un peso seco inferior a 0.05gr. El control mostró un peso seco superior a los 0.20gr mostrando una diferencia altamente significativa con respecto a los tratamientos.

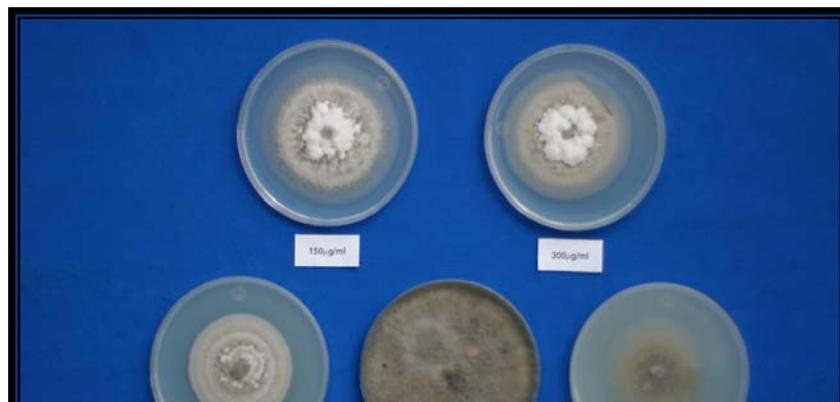


**Figura 8.** Efecto del extracto crudo de Chilcuague (*H. longipes*) sobre el crecimiento del micelio de *Alternaria solani* en condiciones “*in Vitro*”.

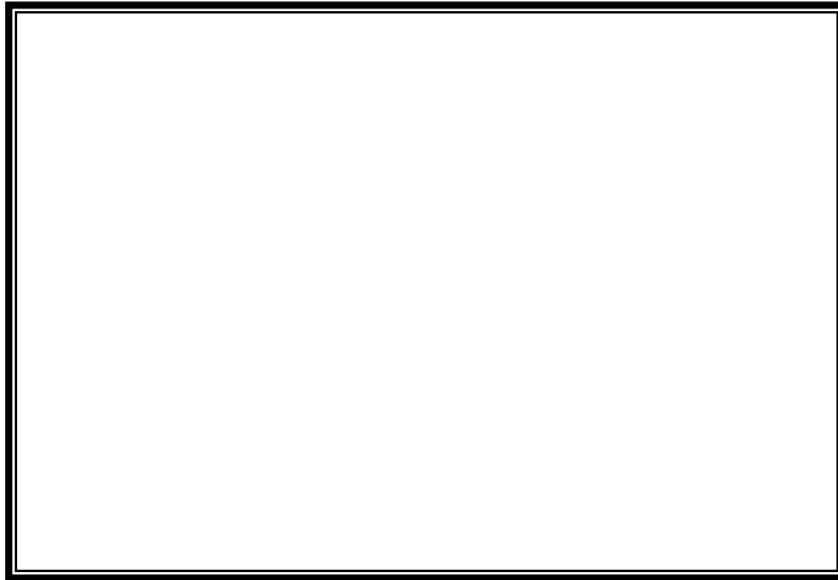
En la **Figura 9**. Se muestra el efecto del extracto de Chilcuague (*H. longipes*) parcialmente reducido catalíticamente durante un periodo de 12 horas sobre el desarrollo micelial de *A. solani* bajo condiciones “*in vitro*”.El comportamiento de los

diferentes tratamientos muestra diferencias estadísticamente significativas ya que los tratamientos 150µg/ml y 300µg/ml presentaron valores superiores a los 0.2 g de peso seco, mientras que los tratamientos de 600 y 900µg/ml mostraron un peso seco superior 0.15 gr, pero inferiores a los 0.2 gr, mostrando diferencias significativas con respecto al control ya que este presentó un peso seco superior a los 0.25. En este experimento se pudo observar que el extracto reducido mostró una disminución de su acción inhibitoria micelial como resultado de la ausencia de Afinina en el extracto, la responsable del efecto antifúngico.

**Figura 9.** Efecto del extracto de Chilcuague (*H. longipes*) Reducido catalíticamente durante un periodo de 12 hrs sobre el crecimiento del micelio de *Alternaria solani* en condiciones “*in vitro*”.



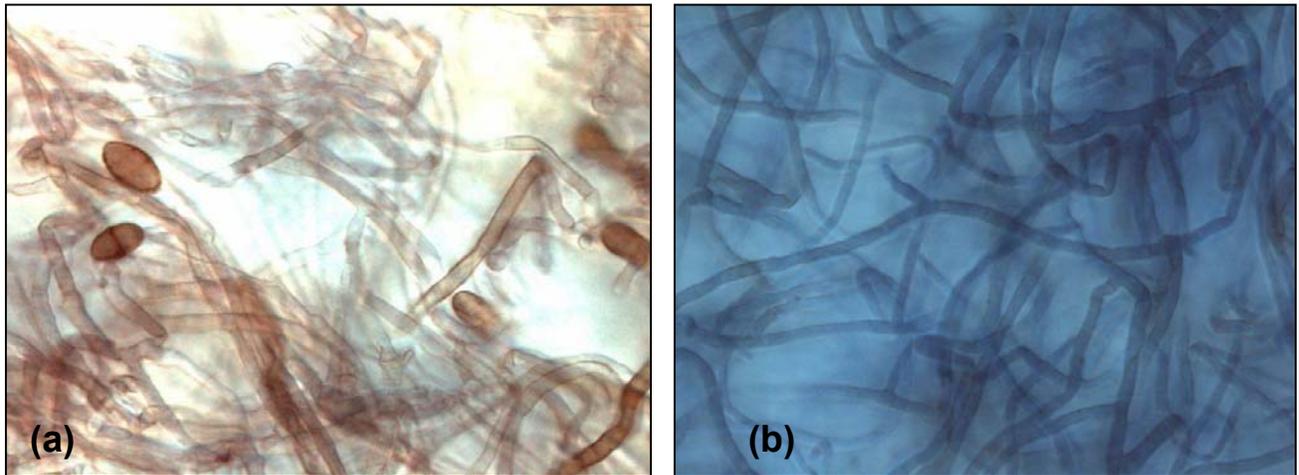
**Figura 10.** Fotografía que muestra el efecto del extracto crudo de Chilcuague (*H. longipes*) sobre el crecimiento del micelio de *Alternaria solani* en condiciones “*in Vitro*”.



**Figura 11.** Fotografía que muestra el efecto del extracto de Chilcuague (*H. longipes*) Reducido catalíticamente durante un periodo de 12 hrs sobre el crecimiento del micelio de *Alternaria solani* en condiciones “*in Vitro*”.

**Figura 12.** Muestra ambas fotografías del micelio tomadas con un microscopio electrónico, de las cuales (a) que es el control se puede observar la presencia de esporas, así como la abundancia de micelio y el tamaño, mientras tanto (b) que comprende al tratamiento 900µg/ml, en el cual se observa una acción inhibitoria por

parte del extracto crudo de Chilcuague (*H. longipes*) ya que esta ausente de presencia de esporas, además se observa un micelio mas delgado y con menos ramificaciones.



**Figura 12.** (a) Micelio del control ( $0\mu\text{g/ml}$ ), observado a  $100\times$ , (b) Micelio del tratamiento 4 ( $900\mu\text{g/ml}$ ), observado a  $100\times$ , ambas fotografías muestran diferencias altamente significativas con respecto al tamaño de micelio, ramificación y esporulación.

## 7.2 Resultados obtenidos en invernadero

En la **Figura 13.** Se observa el efecto positivo que presentó el extracto crudo de Chilcuague (*H. longipes*) en relación a la acción inhibitoria de *A. solani*, mostrándose

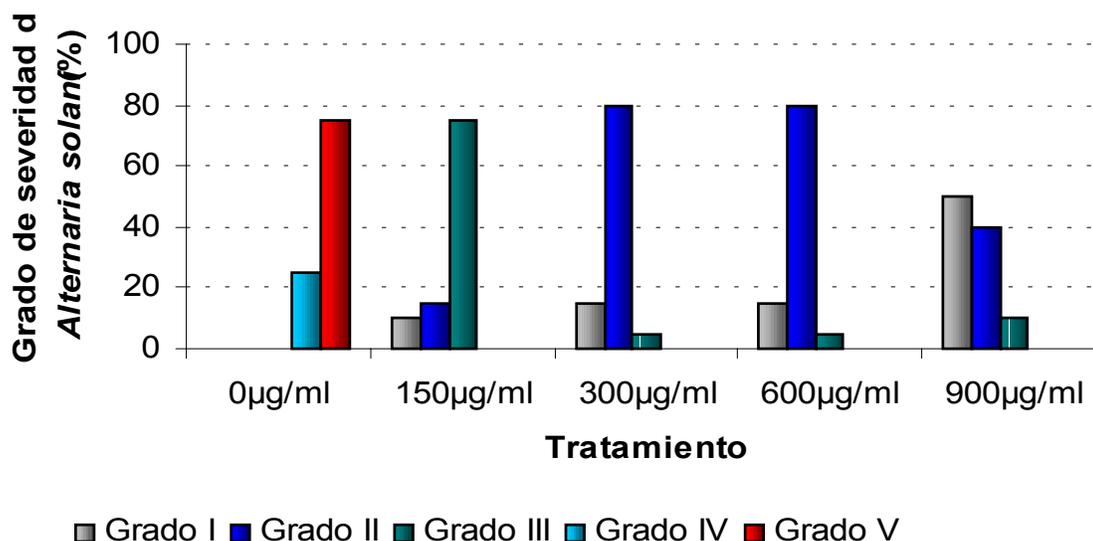
una clara diferencia de los diferentes tratamientos hacia el control. Es importante destacar que el tratamiento del cual se obtuvieron los mejores resultados del experimento fue el 900µg/ml obteniéndose una incidencia por debajo del 20%, con respecto al control se obtuvieron plantas con el 100%. También es importante mencionar que ambos tratamientos presentaron diferencias altamente significativas como es el caso del tratamiento 150µg/ml que mostró una incidencia por arriba del 60%, en cuanto al tratamiento 300 µg/ml mostró una incidencia menor al 50%, sin embargo el tratamiento 600 µg/ml presentó una incidencia menor al 30%, siendo este tratamiento considerado como el segundo tratamiento mejor del experimento.

**Figura 13.** Incidencia de *Alternaria solani* sobre plantas de jitomate a los 65 días, bajo condiciones de invernadero.

En la **Figura 14.** Se observa el grado de severidad de *A. solani* en plantas de jitomate bajo condiciones de invernadero muestreo que se realizó a los 65 días periodo en el que se pudo observar con mayor claridad los diferentes grados de

severidad, el comportamiento de los diferentes tratamientos con respecto al control fueron altamente significativos, ya que para el control se obtuvieron grados de severidad IV y V, mientras que para los tratamientos solo presentaron grados de severidad I, II y III. El tratamiento que mostró el grado de severidad mas bajo fue 900  $\mu\text{g/ml}$ , el cual presentó el 50% de severidad del grado I, 40% de severidad del grado II, 10% de grado de severidad III, mientras que el control mostró 75% de severidad del grado V y el 25% del grado de severidad IV.

### Grado de severidad de *Alternaria solani* en plantas de jitomate a los 65 días



**Figura 14.** Grado de severidad de *Alternaria solani* en planta de jitomate a los 65 días, bajo condiciones de invernadero.

## VIII. DISCUSIÓN

Una de las técnicas de cromatografía mas utilizadas para la identificación, cuantificación, así como la determinación del peso molecular y la estructura de las

sustancias es la Cromatografía de gases acoplada a Detector Selectivo de Masas (CG-MSD), técnica que es viable para muestras volátiles además de que se pueden utilizar muestras en pequeñas proporciones, característica que reúne el extracto de Chilcuague, esta técnica nos permitió obtener las alcanidas mayoritarias presentes tanto en el extracto crudo sin reducción catalítica en el cual se obtuvo a la Afinina, la alcanida mayoritaria, la cual mostró un tiempo de retención 14.97 minutos, mientras que para el extracto parcialmente reducido catalíticamente se obtuvo a la Decanida con un tiempo de retención de 13.42 minutos y la Decenanida con un tiempo de retención 11.82 minutos, resultado de la eliminación de algunas insaturaciones en la estructura de Afinina. Una de las desventajas de esta técnica es que es un proceso laborioso y no es económico su escalamiento.

Por otra parte existen varias alcanidas minoritarias en el extracto sin reducción catalítica y en el extracto parcialmente reducido catalíticamente las cuales pueden llegar a tener una importancia en un futuro, este hace interesante el uso del extracto crudo más que el de las alcanidas purificadas que desde luego sus estudios tienen gran importancia para la investigación básica.

Aunque el extracto alcohólico representa una mezcla compleja de alcanidas, el proceso de reducción catalítica de este extracto para la alteración del estado de reducción de los compuestos presentes puede llegar a ofrecer una alternativa innovadora e interesante para la aplicación y desarrollo en el sector agrícola.

Existen evidencias sobre la posición de los dobles enlaces, que juegan un papel importante en la actividad fisiológica e insecticida de las alcanidas (Crombie y Krasinski, 1962), razón por la cual nos dimos a la tarea de proceder a la parcial reducción catalítica de la principal alcanida presente en las raíces de *Heliopsis longipes*, Afinina, cambiándole así su configuración con respecto a los dobles enlaces.

Como resultado el extracto del cual se obtuvieron los mejores resultados, fue el extracto crudo sin reducción catalítica el cual mostró un porcentaje alto en la inhibición del micelio, hasta de un 96%, con respecto al extracto parcialmente reducido que mostró un efecto no tan significativo con un valor menor del 50% de inhibición. Debido a que este extracto ya no contenía Afinina, la alcanida responsable de los efectos antifúngicos, sino otras alcanidas minoritarias resultado de la reducción catalítica del extracto, técnica que se utilizó con la finalidad de eliminar algunas de las insaturaciones en la estructura Afinina.

Es importante destacar que el comportamiento del extracto sin reducción catalítica mostró bajo condiciones de invernadero una clara acción inhibitoria del micelio superior a bajas concentraciones con lo que respecta a los experimentos realizados "*in Vitro*" que hubo la necesidad de aumentar la concentración, para un mayor efecto

en la inhibición micelial, en ambos experimentos mostró porcentajes altos de inhibición, ya que a medida que aumentaba la concentración de afinina la alcalamida mayoritaria se obtenía una mayor inhibición, además de que mostrando efectos favorables en la inhibición de la esporulación.

Algunas de las recomendaciones que se sugieren para investigaciones futuras es que se disminuya la concentración de afinina en los ensayos bajo condiciones de invernadero, así como también se aumente el número de aplicaciones del extracto por semana.

## IX. CONCLUSION

La actividad Antifúngica del extracto alcohólico de las raíces de *Heliopsis longipes* depende del grado de insaturación de Afinina y otras alcanidas presentes en él.

El extracto que mejor respondió a la inhibición micelial de *Alternaria solani* fue el extracto crudo sin reducción catalítica, bajo condiciones de “*in vitro*” e invernadero.

## X. LITERATURA CITADA

**Acree F., M. Jacobson y H.L. Haller.** 1945. The structure of affinin, the insecticidal amide from *Erigeron affinis* D.C. Journal of Organic Chemistry: 236-242p.

**Bremer, K.** 1994 . Asteraceae: cladistics & classification. Timber Press. Portland. 752p.

**Casseres E.** 1991. Producción de Hortalizas. Ed San José Costa Rica. 1ra. Reimp. Una asignatura pendiente. Avances y Perspectivas, Órgano de difusión del CINVESTAV del IPN.

**Castaño J. y L. del Río Mendoza.** 1994. Guía para el Diagnóstico y Control de Enfermedades en Cultivos de Importancia Económica. 3ra. Edición. Zamorano, Honduras: Zamorano Academic Press. 302p.

**Cebrián M.** 1998. Efectos de los plaguicidas sobre la función reproductiva humana: una asignatura pendiente. Avance y Perspectiva 17: 205-213pp.

**Conn E. E.** 1981. The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. Academic Press, E. U., P1, Volumen 7

**Cultivos Anuales de México.** 1991. Año Agrícola 1990-1991. INEGI, VII Censo Agrícola Ganadero. México D.f.

**Crombie, L. y A. Krasinski.** 1962. Synthesis of *N*-isobutyldeca-*trans*-2,*cis*-6,*trans*-2,*cis*-6,*cis*-8 trienamides. Chem. Ind. 983-984pp.

**Diccionario Agropecuario de México.** 1982 Instituto Nacional de Capacitación del Sector Agropecuario, A.C. México. D.f.

**Dillard H. D. Cole, T. Hedges, A. Turner, D. Utete, B. Muere, R. Agubba y P.**

**Wilkinson.** 1995. Early blight of tomatoes. Zimbabwe. Horticultural crops pest management. NYSAES, Geneva, New York. 2p

**Fernández A.** 1996. Inducción de peroxidasa en hojas de tomate con diferentes grados de susceptibilidad a *A. solani*. Protección Vegetal (CENSA) 11(2):79-83pp.

**Fisher T. R.** 1957. Taxonomy of the genus *Heliopsis* (Compositae). Ohio Journal of Science. 57: 171-191pp.

**Fundación Servicio para el Agricultor (FUSAGRI).** 1983. Tomate, pimentón, ají y Berenjena. Serie Petróleo y Agricultura. N° 3. Cagua, Venezuela. 92-94pp.

**Fraire S, L., R. Montes B. y R. Pérez P.** 1993. Efecto de extractos vegetales en el desarrollo del tizón tardío *Phytophthora infestans* en jitomate. In: Memorias del XX Congreso Nacional de Fitopatología. Zacatecas, Zacatecas, México. 52p.

**Gamboa A. R.** 2002. Efectividad Biológica *in vitro* de extractos de plantas del semidesierto sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora infestans*. Tesis de Maestría. UAAAN, Buenavista Saltillo, Coahuila, Mexico.

**García-Chávez, A.** 1998. Estudio de la actividad de la afinina sobre microorganismos y la homología del gene *fabA* de *Escherichia coli* en plantas productoras de alcalmidas. Tesis de Maestría, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. (Unidad Irapuato).

**García D. G.** 2000. La rentabilidad y la competitividad del tomate rojo (*Lycopersicum esculentum* L.) de exportación de Sinaloa, 1997/98. Tesis Doctoral en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 262 p.

**Heywood, V.H., J.B. Harborne, B.L. Turner.** 1977. The Biology and Chemistry of the Compositae. Academic Press, Inc. New York.

**Grainge M. y Ahmed, S.** 1988. Handbook of Plants with Pest Control Properties, John Wiley & Sons, New York, 470p.

**Jacobson, M.** 1954. Occurrence of a pungent insecticidal principle in American coneflower roots. Science 120:125-129pp.

**Jacobson M.** 1971. The insaturated isobutilamides. In: Naturally Occurring Insecticides. Jacobson, M., and D. G. Crosby (eds.). MarcelDekker. New York. 137-173pp.

**Johns T, Graham K, y Towers GHN.** 1982. Mulluscicidal activity of affinin and other isobutylamides from the Asteraceae. Phytochemistry 21: 2737-2738pp.

**Kirk-Othmer.** 1978. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 3rd ed., vol. 3. New York, NY: JonWiley and Sons

**Lagunas A., C. Arenas, y C. Rodríguez.** 1984. Extractos acuosos y polvos vegetales con propiedades insecticidas. CONACYT. Colegio de Posgraduados, México.

**Lehninger A.** 1994. "Bioquímica". Editorial OMEGA, Segunda edición, Barcelona, 337- 382pp.

**Ley S. V.** 1990. Synthesis of antifeedings for insects: novel behavior modifying, chemicals from plants. Ciba Foundation Symposium 154:80-98pp.

**Maclaren J. J.** 1986. Biologically active substances from higher plants: status and future potential. Pestic. Sci. 17:559-578pp.

- Martínez, M.** 1994. Las Plantas Medicinales de México. Ediciones Botas. 6a ed. 113-115pp.
- McVaugh, R.** 1984. Flora Novo-Galiciana, vol. 12, Compositae. Univ. Michigan Press, Ann Arbor. 1157pp.
- Merck.** 1989. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. Whitehouse Station: Merck Research Laboratories Division of Merck & Co., Inc. 1741pp.
- Metcalf R. L.** 1982. Insect control technology. Encyclopedia of chemical technology (M. Grayson, ed.) A. Wiley-Interscience Publication, USA. Vol. 13: 413-485pp.
- Molina-Torres, J., Salgado-Garciglia R., Ramíres Chávez E. y Del Rio R.** 1996 Purely oleofinic alkamides in *Heliopsis longipes* and *Acmella oppositifolia*. Biochemical Systematics and Ecology. Vol. 24:1, 43-47pp.
- Molina-Torres J, Salazar-Cabrera CJ, Armenta-Salinas C y Ramírez-Chávez E** 2004. Fungistatic and Bacteriostatic activity of alkamides from *Heliopsis longipes* roots: affinin and reduced amides. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 4700-4704pp.
- Montes R.** 1996. Productos Naturales de Origen Vegetal para el combate de Fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología. México, D.F, Vol. 14:1, 9-14pp.
- Nevins D.J. y Jones R. A.** 1987. Tomato Biotechnology. Plant biology 4:3-14pp.
- Ospina N. L. S., C. J. Olarte y O. E. Núñez.** 1986. Estudio fitofarmacológico de la fracción liposoluble de las flores de *Spilanthes americana*. var mutis. Parte 1. Estudio fitoquímico. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas 15: 37-42pp.

**Ramírez-Chávez, E., Lucas-Valdez, G. Virgen-Calleros y Molina-Torres, J.** 2001.

Actividad fungicida de Afinina y extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* sobre dos especies de *Sclerotium*. *AgroCiencia*. 34(2):207-217pp.

**Sarukhán J.** 1995. Diversidad Biológica (Biological Diversity), *Rev. Univ. De México*, 536-537:3-10pp.

**Salgado-Garciglia R.** 1995. Productos Vegetales Utilizados como Agroquímicos.

“Boletín Quetzal” 3:28-30. Publicación de la Facultad de Biología perteneciente a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

**Wilson, C. L. y M. E. Wisniewski.** 1989. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Ann. Rev. Phytopathol.* 27: 425-441pp.

**Zavaleta-Mejía, E.** 1994. Control biológico de fitopatógenos. In: R. Alatorre R. y A.W. Guzmán F. *Memorias V Curso de Control Biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México. 115-125pp.

## RESUMEN

El presente trabajo, tiene como finalidad evaluar el efecto antifúngico del extracto crudo y parcialmente reducido catalíticamente del Chilcuague (*H. longipes*) sobre el hongo fitopatógeno *Alternaria solani* también conocido como tizón temprano o marchitez, considerado como uno de los problemas más importantes en el cultivo de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en nuestro país, ocasionando pérdidas considerables en la producción. En base a ensayos preliminares se a observado una importante acción inhibitoria de la Afinina, presente en las raíces de chilcuague, contra algunas bacterias y hongos de importancia agrícola.

El presente trabajo se realizó en Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I. P. N. Unidad Irapuato, en el Departamento de Biotecnología y Bioquímica de Plantas y laboratorio de Fitobioquímica a cargo del Doctor Jorge Molina Torres. El experimento se realizó en condiciones “*in vitro*” y de invernadero, partiendo de la obtención del extracto crudo, la identificación y cuantificación de sus componentes por medio de Cromatografía de Gases acoplada a un detector selectivo de espectrometría de masas (CG-MSD). Posteriormente se realizó la reducción catalítica del extracto, hidrogenando durante un periodo de 12 h evaluando nuevamente por CG-MSD para la identificación y cuantificación de los componentes resultantes. Por último, en base a ensayos realizados previamente se tomaron dosis para cada tratamiento correspondiendo a: 150µg/ml, 300µg/ml, 600µg/ml, 900µg/ml, además de un control de 0µg/ml. Para cada tratamiento se evaluaron 3 repeticiones en el caso de “*in vitro*”, y 10 repeticiones para el caso de invernadero. El parámetro evaluado “*in vitro*” fue el peso seco de micelio los cuales fueron analizados por un diseño estadístico completamente al azar. En cuanto a invernadero se evaluaron los grados de afección y severidad, utilizando el mismo diseño estadístico para su evaluación.

