

Efecto fungicida de la afinina utilizado para la inhibición de los hongos *Fusarium spp.* y *Alternaria spp.*, así como la evaluación de los métodos de inoculación de estos hongos en plántula de pimiento morrón (*Capsicum annum L*)

Fungicidal effect of affinin used for the inhibition of fungi *Fusarium spp.* and *Alternaria spp.*, as well as the evaluation of the inoculation methods of these fungi in pepper seedlings (*Capsicum annum L*.)

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, Olga Karina*†, MENDEZ-VALENCIA, Dellanira, ROCHA-NAVA, María Concepción y TORRES-ARTEAGA, Iovanna Consuelo

Universidad Politécnica del Bicentenario, Carretera Silao-Romita km2., Col. San Juan de los Durán, s/n, CP. 36283, Silao Guanajuato, México

ID 1^{er} Autor: Olga Karina, Martínez-Rodríguez / ORC ID: 0000-0003-4031-6205, Researcher ID Thomson: V-1347-2018, arXiv ID: Karina-R, CVU CONACYT ID: 588672

ID 1^{er} Coautor: Dellanira, Méndez-Valencia / ORC ID: 0000-0001-9381-9055, Researcher ID Thomson: V-1347-2018, arXiv ID: Della_Méndez, CVU CONACYT ID: 326705

ID 2^{do} Coautor: María Concepción, Rocha-Nava

ID 3^{er} Coautor: Iovanna Consuelo, Torres-Arteaga / ORC ID: 0000-0003-1813-6785, Researcher ID Thomson: V-1242-2018, arXiv ID: Iovanna_Torres, CVU CONACYT ID: 26051

Recibido 09 Abril, 2018; Aceptado 28 Junio, 2018

Resumen

Los hongos fitopatógenos *Fusarium spp.* y *Alternaria spp.*, provocan enfermedades vasculares que se manifiestan en tallos y hojas, ocasionando lesiones que debilitan a la plántula hasta la muerte. Son enfermedades de gran importancia en zonas donde se cultiva pimiento morrón y otros cultivos de interés económico. Actualmente sólo pueden ser eficazmente controladas con tratamientos químicos. El objetivo de éste estudio fue determinar el efecto inhibitorio del extracto etanólico de Chilcuague (*Heliopsis longipes L.*) sobre el crecimiento radial de los hongos *Fusarium spp.* y *Alternaria spp.* en condiciones in-vitro. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado (DCA), con tratamientos: 10%, 25%, 50%, 75% y 100% de concentración de extracto. Adicionalmente se midió la periodicidad de aplicación y el mejor método de inoculación. Se utilizaron plántulas de pimiento morrón de 15 cm, infectándolas en hoja, tallo y sustrato. Los resultados fueron analizados en software Minitab 17. Las inhibiciones más altas se obtuvieron con concentración de extracto al 25 % en aplicaciones cada 24 horas, mostrando porcentajes de inhibición de 33.15 % en *Alternaria* y 25.9 % en *Fusarium*. Los mejores resultados de inoculación se obtuvieron para *Fusarium* en sustrato con 87.36 % de área afectada y *Alternaria* en hoja con 73.98 %

Inhibición, Extracto Vegetal, Inoculación

Abstract

The phytopathogenic fungi *Fusarium spp.* and *Alternaria spp.*, cause vascular diseases that manifest themselves in stems and leaves, causing lesions that weaken the seedling until death, diseases of great economic importance in Bell pepper and other crops. Currently they can only be controlled with chemical treatments. The objective of this study was to determine the *in vitro* inhibitory effect of ethanolic extract of Chilcuague (*Heliopsis longipes L.*) on the radial growth of fungi *Fusarium spp.* and *Alternaria spp.* in seedlings of Bell pepper. A completely randomized experimental design (DCA) was used, with treatments: 10%, 25%, 50%, 75% and 100% of extract concentration. Additionally, the periodicity of application and the method of effective inoculation were determined. Seedlings treated with vermiculite of 15 cm were used, infecting them in leaf and stem. The results show that the highest inhibition was obtained with the 25% extract concentration in applications every 24 hours, showing percentages of inhibition of 33.15% in *Alternaria* and 25.9% in *Fusarium*. The inoculation efficiency was obtained in seedlings with vermiculite for *Fusarium* with 87.36% of affected area and *Alternaria* in leaf with 73.98%. The results were analyzed in Minitab 17 software.

Inhibition, Vegetable Extract, Inoculation

Citación: MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, Olga Karina, MENDEZ-VALENCIA, Dellanira, ROCHA-NAVA, María Concepción y TORRES-ARTEAGA, Iovanna Consuelo. Efecto fungicida de la afinina utilizado para la inhibición de los hongos *Fusarium spp.* y *Alternaria spp.*, así como la evaluación de los métodos de inoculación de estos hongos en plántula de pimiento morrón (*Capsicum annum L*). Revista de Energía Química y Física. 2018. 5-15: 17-21.

* Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: omartinezr@upbicentenario.edu.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor

Introducción

La necesidad de encontrar nuevos mecanismos que eleven la productividad del cultivo de pimiento morrón ha impulsado la búsqueda de nuevas alternativas como lo son los extractos naturales, siendo un cultivo de gran importancia en México ya que el país se considera como el centro de origen de algunas especies, siendo también potencia en la producción y exportación del chile (*Capsicum annum L*), es un cultivo susceptible a presentar daños por enfermedades bióticas que son causadas por nematodos, bacterias, virus, y hongos, y no bióticas causadas por factores extremos humedad del suelo, luz, temperatura, falta de nutrientes en cualquier etapa de su desarrollo, quedando más propenso durante su germinación y después de esta. Damping-Off es una de las enfermedades más relevantes en el cultivo de pimiento morrón, esta enfermedad es causada por varios patógenos como *Pythium spp*, *Fusarium spp.*, *Rhizoctonia spp.* y *Alternaria spp.*, los daños ocasionados por el damping-off son la muerte del embrión de la semilla, pudrición de tallos y raíces, así como también la reducción del número de plántulas.

El chilcuague (*Heliopsis Longipes*) es una de las nuevas alternativas a experimentar para el control de enfermedades fúngicas, ya que dicha planta produce metabolitos secundarios como la afinina producida por la biosíntesis de la planta, una de sus grandes ventajas es que no tiene efectos secundarios en el ecosistema, ya que pueden ser metabolizados por uno u otro organismo, a diferencia de los fungicidas químicos comúnmente aplicados. En el presente trabajo se evaluó el efecto fúngico del extracto etanólico del chilcuague para medir la inhibición del crecimiento de los hongos *Fusarium spp.* y *Alternaria spp.*

Metodología

Se realizó la evaluación in vitro del extracto etanólico de chilcuague con el método de sensidiscos. Para la reproducción de los Hongos *Fusarium spp.* y *Alternaria spp.* Se preparó el medio de cultivo Agar dextrosa y papa. La proliferación de los hongos se realizó a partir de la cepa *Alternaria spp.* 4-D, V8, Ms, purif. 3,2017, y *Fusarium spp.*, PDA, 2017 utilizando la técnica de siembra por punción central, posteriormente se incubaron durante tres días en la estufa de cultivo (Terlab BTC-9100), y se observó su crecimiento cada 24 hrs.

Para la Reproducción en medio líquido, La reproducción de los hongos *alternaria spp.* y *fusarium spp.* se realizó en un medio nutritivo de caldo de papa, en un matraz se colocaron 250 ml del medio previamente estéril, y se colocó una colonia de hongo respectivamente, se realizaron dos repeticiones por cada hongo, posteriormente se colocaron en el agitador orbital (Dabital genie, scientific industries) durante 48 horas.

Se realizaron diluciones seriadas para hacer el conteo de unidades formadoras de colonia, utilizando la fórmula de Saúl Javier, 20016. Para la evaluación del extracto se utilizaron tres repeticiones para cada concentración (100%, 75%, 50%, 25%, 10% y Testigo) en cada uno de los tratamientos: A1- Aplicación una vez, A2- Aplicación cada tercer, A3- Aplicación diaria, utilizando la técnica de sensidiscos, en las cuales se colocó un cubo de pre inculo de aprox. 0.5 cm de hongo respectivamente, en el centro de cada caja, posteriormente se colocaron 4 discos en cada extremo a 26 mm de distancia del pre inculo, en cada disco se colocaron 7ul de extracto de acuerdo a cada tratamiento.

El experimento se llevó acabo en todo momento dentro la cámara de flujo laminar (Laminar flow cabinet ESCO) y finalmente cada una de las cajas fue sellada con cinta auto adherente y debidamente rotulada de acuerdo al tratamiento, posteriormente los cultivos se incubaron a una temperatura promedio de 26° C en la estufa de cultivo (Terlab BTC-9100). Además, se realizaron mediciones cada 24 hrs. durante un lapso de 120 horas aproximadamente, registrando el crecimiento radial del micelio, utilizando un vernier (Truper, analogico standard y milimetrico, CAL-6MP).

Conjuntamente se evaluó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), utilizando la fórmula de Ezziyani et al. (2004), $PICR = (R1-R2) / R1 \times 100$, donde R1 es radio del patógeno testigo y R2 es el radio del patógeno en enfrentamiento. Para la Evaluación del mejor método de inoculación en plántulas de pimiento morrón bajo condiciones de invernadero, El trabajo se desarrolló en el invernadero de investigación ubicado en las instalaciones de la Universidad Politécnica Bicentenario en los meses de septiembre del 2017 a enero del 2018.

Se realizó la limpieza y desinfección del invernadero, así mismo se desinfectaron las charolas de germinación y herramientas a utilizar con soluciones de hipoclorito. Se utilizó semillas de pimiento morrón (*Capsicum annum*) con porcentaje de germinación de 85 al 90%. El trasplante se realizó a los 24 días después de la germinación, en macetas de 0.5 litros con sustrato Peat moss de shagnum, 551b, OMRI listed previamente estéril por el método de vaporización activa. Las labores culturales se realizaron según el manual de producción de pimiento: fertilización cada 15 días, riego cada tercer día y cuando se requiera.

El experimento se desarrolló bajo un diseño completamente al azar con 9 repeticiones para el hongo *Alternaria* y 12 para *Fusarium* con tres diferentes tratamientos: T1-Inoculación en Sustrato, T2- Inoculación en Tallo, T3-Inoculación en Hoja, y T- testigo, utilizando una suspensión de 1×10^5 ufc/ml respectivamente.

La Evaluación del grado de infección de *Fusarium spp.* y *Alternaria spp.* se realizó a los 30 días posteriores a la inoculación con base a la presencia o ausencia de síntomas evaluando la severidad e incidencia (Barea, 2006) de acuerdo a cada enfermedad, considerando la escala de virulencia para el hongo *Fusarium spp.* (Ploetz et al. 1999) y la Escala de virulencia para el hongo *Alternaria spp.* (Novisel Veitía et. al, 2001). Para el análisis del crecimiento radial se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA), dichos análisis se realizaron con el programa Minitab 17.

Resultados y discusión

De acuerdo a los métodos evaluados se observó que los 5 tratamientos propuestos tienen efecto inhibitorio sobre los hongos *Alternaria spp.* y *Fusarium spp.* en comparación con el Testigo, obteniendo como mejor tratamiento en *Alternaria spp.* para A-1, A-2 y A-3 al T2-25% con un promedio de 33.15% de inhibición radial, para el hongo *Fusarium spp.*, se consideró como mejor tratamiento al T2-25% con un promedio de 29.14% de inhibición radial, anteriormente se ha reportado inhibición para *Fusarium* del 35.83% y para *Alternaria* 33.33% de inhibición, utilizando 5gr de raíz en un medio acuoso (Romero, 2016).

En otras investigaciones se ha observado la potente acción inhibitoria de la afinina, presente en la raíz de chilcuague, en el desarrollo de cultivos in vitro de *Escherichia coli* y otros Fitopatógenos (García-chavez, 1998) como *Sclerotium cepivorum* con una inhibición de casi 80% con 25ug/ml y en *Sclerotium rolfsii* se inhibió casi un 90%, a lo que comenta que existen estudios con distintos microorganismos que muestran una marcada tendencia a la variación considerable de la acción fungística de la afinina, dependiendo del organismo que se evalué (Ramírez et al., 2000).

Según Molina et al., 2004, para el género *Fusarium* con 150 ug/ml se obtendrá una inhibición del 38%, Robles reporta que con 600 y 900 ug/ml mostraron un peso seco superior a 0.15 g pero inferiores a 0.2 gr obtenido con otros tratamientos. (Robles, 2005)

Se pudo observar que el efecto fungistático disminuye al pasar las horas es por ello que se recomienda observar detenidamente los resultados obtenidos a las 72 hrs ya que se observó que en este tiempo el hongo se desarrolló lo suficiente para entrar en contacto con el perímetro del sensidisco y observar si existe o no inhibición, para *Fusarium spp.* se determinó como mejor tratamiento para A-1 al T1-10% con inhibición del 16.70%, A-2 al T1-10% con inhibición del 15.15%, para A-3 al T2-25% con inhibición del 14.83%.

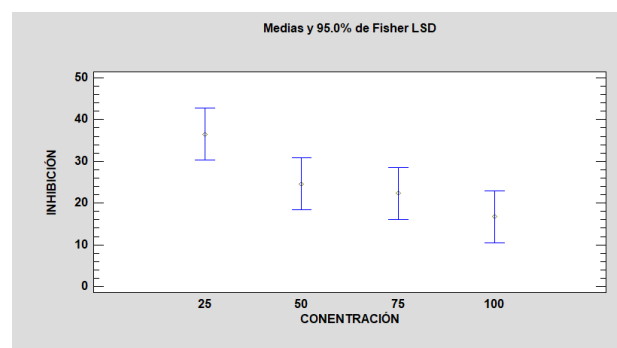


Figura 1 Gráfica de tendencia de medias de inhibición, utilizando distintas concentraciones de chilcuague para hongo *Alternaria*

Fuente: Elaboración Propia

Según los resultados obtenidos para la periodicidad de aplicación en el hongo *Alternaria spp.* se observó con mayor inhibición al A-3 (aplicación diaria) con un promedio de inhibición de 21.97%, en A-1 de 18.79% y en A-2 de 17.55%, para el hongo *Fusarium spp.*

Se obtuvo con mayor inhibición A-2 con un promedio de 16.38% seguido de A-1 con 15.88% y A-3 con 13.46% de inhibición, la acción fungistática de la afinina va a variar según el microorganismo que se evalué (Ramírez *et al.*, 2000).

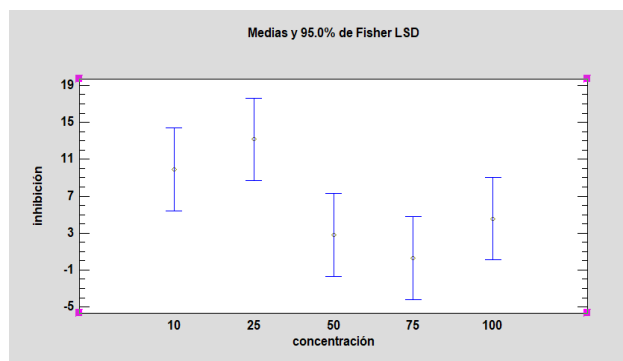


Figura 2 Gráfica de tendencia de medias de inhibición, utilizando distintas concentraciones de chilcoague para hongo *Fusarium*

Fuente: Fuente Propia

En las pruebas de mejor método de inoculación no se mostraron diferencias significativas entre los tratamientos planteados en ambos hongos.

Agradecimientos

Al financiamiento otorgado por Prodep al proyecto **19743-UPBIC-CA-1-2015-14570**.

Conclusiones

El extracto proveniente de *Heliopsis longipes* mostró actividad antifúngica para *Alternaria spp.* y *Fusarium spp.* medida en base al crecimiento radial del micelio, donde se recomienda una aplicación del 25% in vitro para *Fusarium spp.* y 25% para *Alternaria spp.*, observando una diferencia dependiente de la periodicidad de aplicación, para *Fusarium spp.* muestra mayor inhibición en A-3 y para *Alternaria spp.* en A-2, Es posible que actúen otros compuestos bioactivos presentes ya que no se obtuvo un extracto 100% puro de afinina. Para poder comprender la forma de acción de la afinina, se requieren estudios más detallados sobre el mecanismo de acción de este metabolito, del cual existen algunas investigaciones como la de Ramirez et al, en el 2000, Grow y Geoffrey, 1995, y Crombie y Krasinski en 1962 sugieren que debido a que existen evidencias que la posición de los dobles enlaces, juegan un papel importante en la actividad fisiológica e insecticida de las alcaloides.

Perspectivas

El trabajo futuro sobre ésta investigación debe estar enfocado en experimentar las dosis de concentración del extracto de chilcoague en condiciones de invernadero. Además, es necesario determinar la concentración de afinina, utilizando los métodos analíticos adecuados, así como la realización de un análisis costo-beneficio para la obtención del extracto.

Referencias

Barea V. (2006) *Cuantificación de una Enfermedad o medida del grado de desarrollo de patógeno sobre el hospedero*. México

Blanco G.M., Lainez G.P., (2002). *Determinación De La Bioactividad Citotóxica De Extractos De Veinticinco Especies Vegetales Mediante El Bioensayo Con Artemia Salina*. El Salvador.

Boluda C.J., Duque B., Aragón Z., (2005) *Estructura y funciones en las plantas*. Instituto Universitario de Bioorgánica Antonio González. Tenerife.

Chew Y., Vega A., Rodríguez M., Jiménez F. (2008) *Principales enfermedades del chile (Capsicum annum L.)*, Instituto nacional de investigaciones forestales agrícolas y pecuarias. Campo experimental la laguna.

El-Hage Scialabba N., Hattam C.(2003) *Agricultura orgánica, ambiente y seguridad alimentaria*, 280 pp., FAO: Ambiente y Recursos Naturales.

Figueroa M.G, Rodríguez R.,(2010) *Caracterización de Especies de Fusarium Asociadas a la Pudrición de Raíz de Maíz en Guanajuato*, México, vol.28 no.2 , INIFAP.

Forero R., Ortiz E., De León J. C., Gómez L., (2015) *Análisis de la resistencia a Fusarium oxysporum plantas de Passiflora maliformis L.*, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia.

García-Chavez, A. (1998). *Estudio de la actividad de la afinina sobre microorganismos y la homología del gen fabA de Escherichia coli en plantas productoras de alcaloides*. Tesis de maestría, centro de investigación y de estudios avanzados del I.P.N (unidad Irapuato)

González C.A., (2009) *Monografía de la raíz de oro, chilcuague, Heliopsis longipes A. Gray. Medicina tradicional de México y plantas medicinales*, México.

Heller HL., LaForge FB, Sullivan WN. (2014) *Some compounds related to sesamin: Their structures and their synergistic effect with pyrethrum insecticides*. J Org Chem 1942; 7: 185-188.

Hortoinfo. (2014). *El mundo produce 31.167 millones de kilos de pimienta*. URL: <http://www.hortoinfo.es/index.php/noticias/3888-prod-pimiento-almeria-110814>

Infoagro Systems, S.L., *El Cultivo Del Pimiento/ Capitán Haya*, 60, 3º, 28020.

Matsubara H. (2000) *Synergist for insecticides. XXVLL. Synergetic effect of several lignans on pyrethrins and allethrin*. Bull inst chem res kyoto univ 1972; 50: 197-205.

Mendoza Z. C. (1993). *Diagnóstico de enfermedades fungosas*. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. Chapingo, México. P. 90-94.

Mendoza Z.C. (1999). *Enfermedades fungosas de hortalizas y fresa*. In: S. Anaya R y J. Romero N. et al. (eds.). *Hortalizas. Plagas y enfermedades*. Editorial Trillas. Mexico. p. 36-40.

Productores de Hortalizas. (2004). *Plagas de enfermedades de Chile y pimienta*. productores de Hortalizas, pp., 1-11.

Ramírez E., Valdez L, Virgen G., Molina J., (2000), *Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de Heliopsis longipes en dos especies*, Colegio de Postgraduados Texcoco, México, Agrociencia, vol. 34, núm. 2, marzo / abril, 2000, pp. 207-215

Robles R., (2005) *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*., Buenavista, México.

Sandoval. C., Calispa A., (2015) *Buenas Prácticas agrícolas para el Tomate Riñón*, volume Primera Ed. Ecuador.