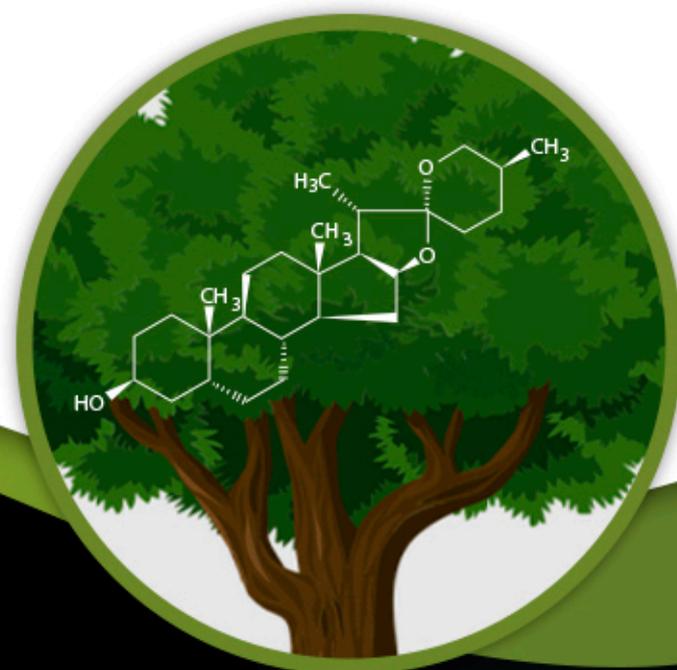


AGENTES ANTIFÚNGICOS PROVENIENTES DE ESPECIES ARBÓREAS PARA EL CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS

M. en C. Carlos Vladimir Muro
Dra. Janet Ma. León Morales
Dra. Soledad García Morales



Agentes antifúngicos provenientes de especies arbóreas para el control de hongos fitopatógenos

Carlos Vladimir Muro Medina

Janet María León Morales

Soledad García Morales

Área: Ciencia y Tecnología

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ)

Camino Arenero 1227, El Bajío, C.P. 45019, Zapopan, Jalisco

Hecho en México

Abril de 2021

Publicación electrónica

ISBN: 978-607-8734-26-9

Se permite la reproducción total o parcial de esta obra siempre que se cite adecuadamente.

Coordinación editorial

Janet Ma. León Morales

Diseño editorial

Karen Elizabeth Pérez Beltrán

Soledad García Morales

AGENTES ANTIFÚNGICOS PROVENIENTES DE ESPECIES ARBÓREAS PARA EL CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS

Carlos Vladimir Muro-Medina^a, Janet María León-Morales^b, Soledad García-Morales^b

^aUnidad de Biotecnología Vegetal, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

^bUnidad de Biotecnología Vegetal, CONACYT-Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. jleon@ciatej.mx, smorales@ciatej.mx

INTRODUCCIÓN

El aguacate es el segundo producto agroalimentario más exportado de México, representando un mercado de 2,742 millones de dólares¹. Existe una gran diversidad de hongos patógenos que causan enfermedades y que afectan la calidad y cantidad de la cosecha en este cultivo, tales como la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), la roña (*Sphaceloma perseae*), la tristeza del aguacate (*Phytophthora cinnamomi*), etc. Para el manejo de estas enfermedades se realizan en conjunto diferentes prácticas culturales y un control químico. Una alternativa al uso de fungicidas sintéticos, es la implementación de un control orgánico.

Actualmente, los extractos vegetales de *Reynutria* sp. y *Larrea tridentata* son usados en el cultivo de aguacate para el manejo de la antracnosis². La gran diversidad de plantas en México nos ofrece una importante fuente de compuestos bioactivos para la obtención de potenciales fungicidas naturales que fortalezcan el control orgánico de las enfermedades en el cultivo de aguacate.

Dentro de las especies vegetales empleadas en la medicina tradicional mexicana destacan las especies arbóreas multipropósito *Enterolobium cyclocarpum*, *Amphipterygium adstringens* y *Prosopis juliflora* por su potencial antimicrobiano. Esta propiedad biológica puede ser usada de guía para la búsqueda de compuestos que inhiban el crecimiento de hongos fitopatógenos.

Enterolobium cyclocarpum (Jacq.) Griseb. es un árbol caducifolio, comúnmente conocido como parota, pertenece a la familia Leguminosae y llega a medir hasta 30 m de altura. Esta especie nativa de México se distribuye en la vertiente del Golfo desde el sur de Tamaulipas hasta Yucatán y en la vertiente del Pacífico desde Sinaloa hasta Chiapas. Su madera es utilizada para leña y construcción, mientras que sus frutos son aprovechados como alimento para el ganado. El exudado y su corteza son los más utilizados en la medicina tradicional (Fig. 1). La corteza se usa en infusiones para tratar el salpullido y el exudado del tronco se emplea como remedio para la bronquitis y el resfriado, mientras que los frutos verdes se utilizan para la diarrea³. En estudios *in vitro*, el extracto etanólico de corteza inhibió el crecimiento del hongo polirresistente *Scytalidium dimidiatum* y a través de un fraccionamiento biodirigido se demostró que las saponinas triterpénicas son las responsables de esta actividad⁴. Pero también se ha reportado la presencia de saponinas triterpénicas en las hojas⁵ y la goma junto con taninos⁶. A partir del extracto acuoso del duramen con efecto insecticida se aisló el d-(+)-pinitol⁷ y se identificaron el D-limoneno, terpineol y eugenol⁸.

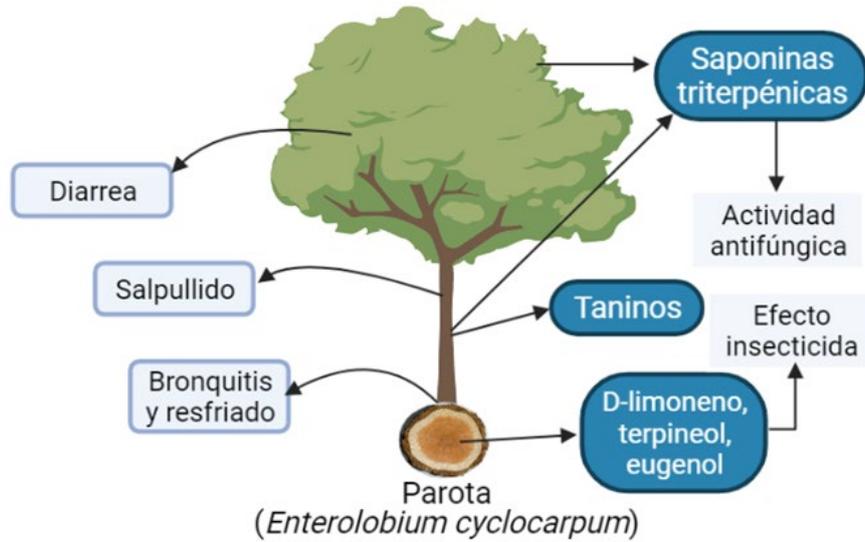


Figura 1. Usos medicinales, actividades biológicas y metabolitos secundarios identificados en *Enterolobium cyclocarpum*.

Por otro lado, *Amphipterygium adstringens* Schtdl. (Anacardiaceae) es un árbol dioico que se encuentra en el bosque tropical caducifolio. Sus nombres comunes son cuachalalate o palo de rosa, su raíz y corteza han tenido diversos usos medicinales (Fig. 2), así como antiinflamatorio, antiséptico, antibiótico, cicatrizante, y para el tratamiento del cáncer estomacal e intestinal⁹. Diversos ensayos biológicos *in vivo* han corroborado el efecto antiinflamatorio y gastroprotector del extracto metanólico de la corteza^{10,11} y se han aislado algunos compuestos en las fracciones activas, así como el ácido 3-hidroxicasticadienónico, el ácido 3-epi-oleanólico y el β -sitosterol¹². Adicionalmente, se ha reportado la actividad anti-*Helicobacter pylori* de una mezcla de ácidos anacárdicos aislados también de la corteza¹³. El extracto metanólico de la corteza también mostró actividad antifúngica contra *Fusarium verticillioides* y *Aspergillus niger*¹⁴. En el extracto del duramen también se ha reportado la presencia de saponinas esteroidales¹⁵.

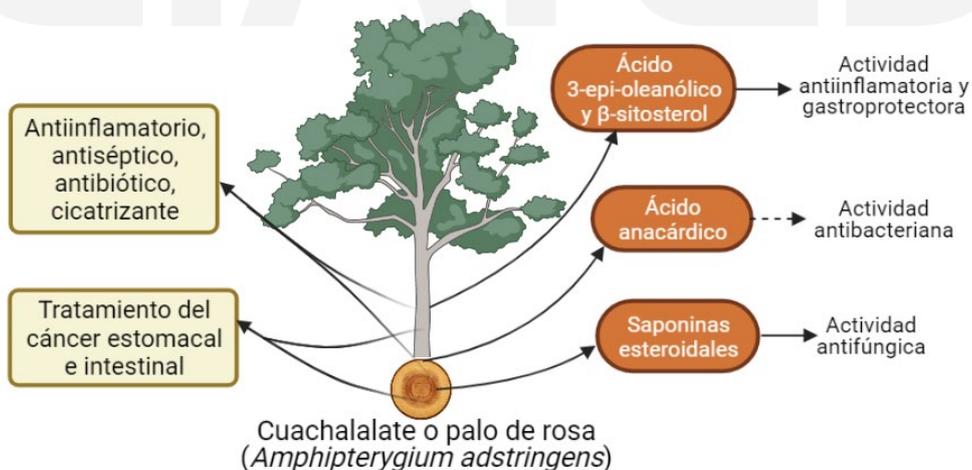


Figura 2. Usos medicinales, actividades biológicas y metabolitos secundarios identificados en *Amphipterygium adstringens*.

El mezquite (*Prosopis juliflora* Sw. DC.) pertenece a la familia Leguminosae y tiene hábito arbóreo bajo condiciones favorables de humedad, pero también puede desarrollarse en condiciones de aridez extrema de forma arbustiva. Todas las partes de este árbol espinoso pueden ser aprovechadas por los animales y el ser humano en algunas comunidades, siendo una especie importante desde el punto de vista ecológico y social (Fig. 3). Sus vainas son utilizadas para la elaboración de harinas para consumo humano debido a su alto contenido de proteína, pero también se utilizan junto con las hojas para alimentar cerdos. El néctar de sus flores es utilizado por algunos apicultores para la producción de miel¹⁶. Pero varias partes de esta especie también han sido utilizadas para curar algunos padecimientos, así como las flores, la corteza, las hojas y la resina para afecciones en los ojos, antihelmíntico, desinfectar heridas y vomitivo. La actividad antimicrobiana de los extractos de esta especie ha sido ampliamente evaluada. Los extractos de hojas del mezquite (MeOH, An y acuosos) han inhibido el crecimiento *in vitro* o *in vivo* de varios hongos fitopatógenos, tales como *Colletotrichum musae*¹⁷, *C. gloeosporioides*¹⁸, *Macrophomina phaseolina* y *Rhizoctonia solani*¹⁹, *Phaeoisariopsis personata* y *Puccinia arachidis*²⁰ y *Fusarium verticillioides*²¹. Los alcaloides de las hojas son los responsables de la actividad antifúngica contra *Alternaria alternata*²², pero también extractos ricos en alcaloides provenientes de vainas²³ y flores²⁴ presentaron actividad antibacteriana contra bacterias gram positivas y negativas. Además de alcaloides piperidínicos, se han identificado taninos en las raíces²⁵ y flavonoides en la corteza²⁶.

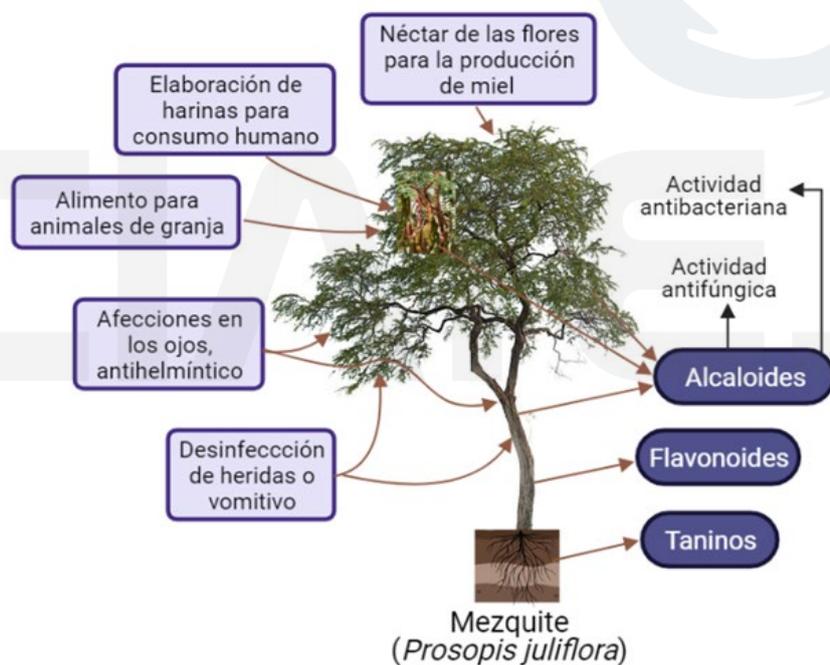


Figura 3. Usos medicinales, actividades biológicas y metabolitos secundarios identificados en *Prosopis juliflora*.

OBJETIVO

Llevar a cabo un estudio de bioprospección de plantas medicinales distribuidas en el Estado de Jalisco para la obtención de compuestos bioactivos que inhiban el crecimiento de *Sphaceloma perseae* Jenk. y hongos aislados de frutos de aguacate.

METODOLOGÍA

Todas las especies contempladas para este proyecto se colectaron en el estado de Jalisco (Fig. 4), guiados por los reportes previos. Se colectaron hojas de *P. juliflora*, corteza de *E. cyclocarpum* y ramas de *A. adstringens*.

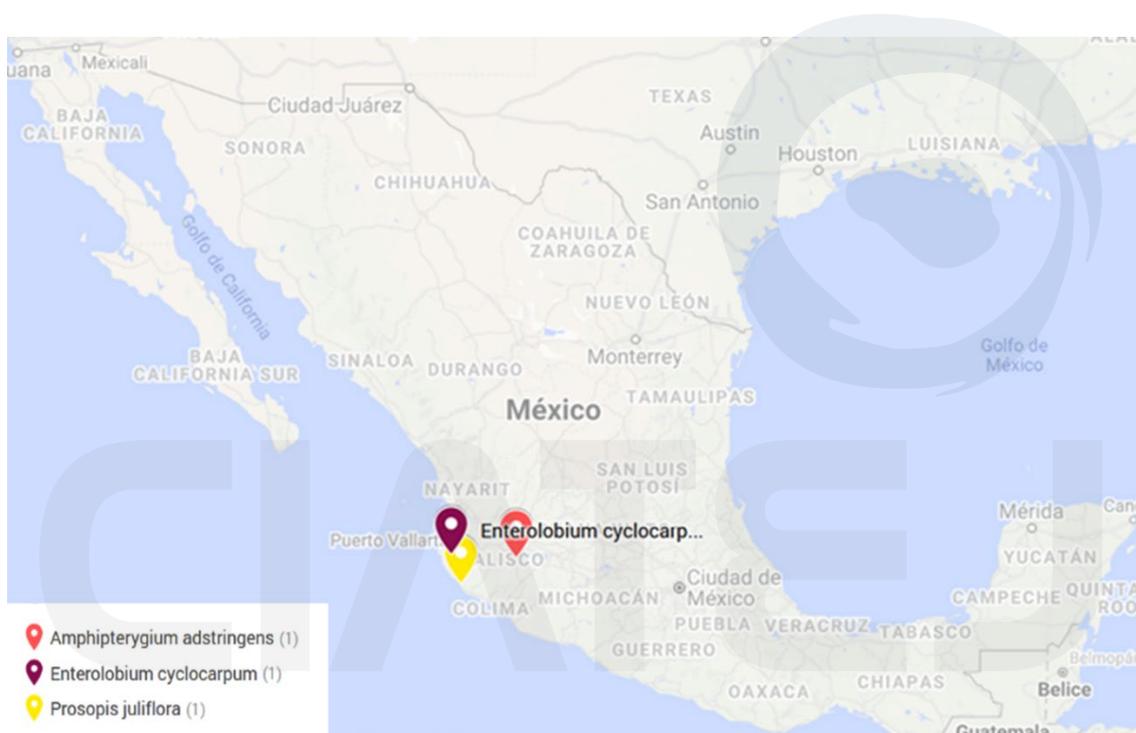


Figura 4. Distribución geográfica de las especies vegetales colectadas en el Estado de Jalisco.

Se obtuvieron extractos acuosos de las dos especies productoras de saponinas (*E. cyclocarpum* y *A. adstringens*) y un extracto etanólico de *P. juliflora* (Fig. 5).

Los hongos se aislaron de frutos de aguacate provenientes de huertas de Urupan, Michoacán, México y se realizó la identificación molecular amplificando la región de los espaciadores internos transcritos de hongos usando los oligonucleótidos ITS1-ITS4. Posteriormente se evaluó la actividad antifúngica contra estos hongos y la cepa ATCC11190 de *S. perseae* por el método de difusión en disco (Fig. 5).

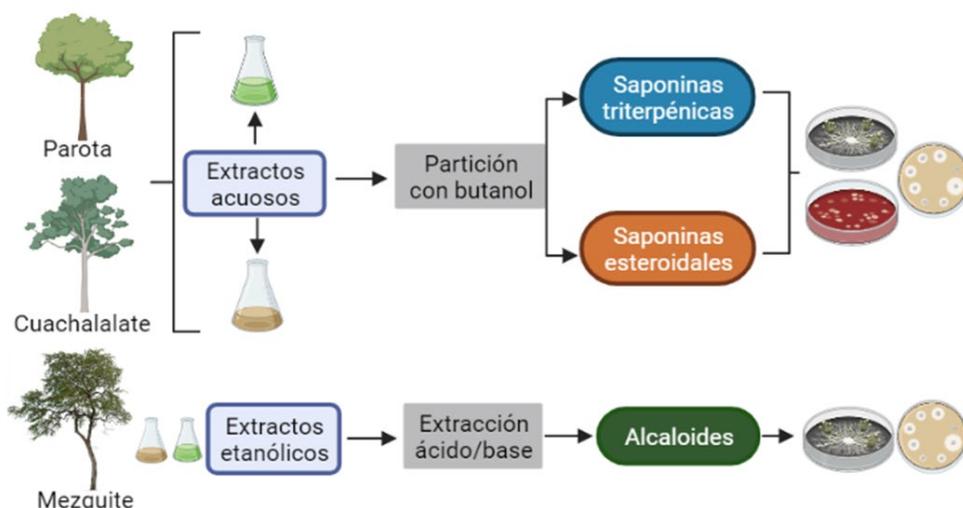


Figura 5. Estrategia metodológica para el aislamiento de compuestos antifúngicos.

RESULTADOS

Los hongos aislados se identificaron como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cytospora* sp. y *Epicoccum sorghinum* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Actividades biológicas y compuestos producidos por las especies vegetales estudiadas y hongos fitopatógenos aislados en este estudio.

Especie	Actividad antimicrobiana	Microorganismos evaluados en este estudio	Compuestos evaluados en este estudio
<i>Amphipterygium adstringens</i> (Cuachalalate)	<i>Helicobacter pylori</i> ¹³ <i>Fusarium verticillioides</i> y <i>Aspergillus niger</i> ¹⁴	<i>Sphaceloma perseae</i> (ATCC11190)	Saponinas esteroidales
<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Parota)	<i>Scytalidium dimidiatum</i> ⁴	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Saponinas triterpénicas
<i>Prosopis juliflora</i> (Mezquite)	<i>Colletotrichum musae</i> ¹⁷ , <i>C. gloeosporioides</i> ¹⁸ , <i>Macrophomina phaseolina</i> y <i>Rhizoctonia solani</i> ¹⁹ <i>Phaeoisariopsis personata</i> y <i>Puccinia arachidis</i> ²⁰ <i>Fusarium verticillioides</i> ²¹ <i>Alternaria alternata</i> ²²	<i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Cytospora</i> sp. <i>Epicoccum sorghinum</i>	Alcaloides piperidínicos

El extracto crudo de hojas de mezquite inhibió el crecimiento de todos los hongos, mientras que el extracto del cuachalalate fue selectivo contra *C. gloeosporioides*. El extracto de la parota sólo inhibió el crecimiento de 4 hongos: *C. cladosporioides*, *C. gloeosporioides*, *E. sorghinum* y *Cytospora* sp. En la figura 6 se muestra una imagen representativa de los halos de inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides* con extractos de cada una de las especies.

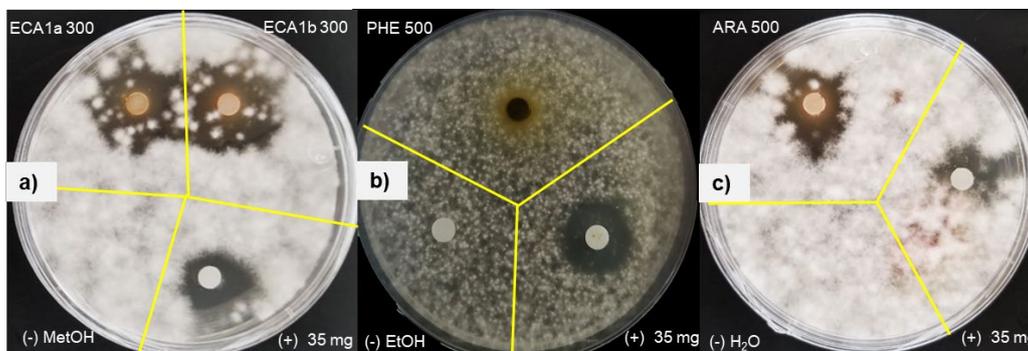


Figura 6. Actividad antifúngica de extractos acuoso de corteza de *Enterolobium cyclocarpum* (a), etanólico de hojas de *Prosopis juliflora* (b) y acuoso de ramas de *Amphipterygium adstringens* (c).

Se evaluó la actividad hemolítica de los extractos acuosos de *E. cyclocarpum* y *A. adstringens* como un método para detectar la presencia de saponinas durante el fraccionamiento químico.

Los extractos de hojas y corteza de las *E. cyclocarpum* causaron hemólisis de los eritrocitos a 100 mg mL^{-1} desde las 24 horas de incubación (Figura 7A y 7B). La actividad hemolítica incrementó con la concentración de los extractos y con el tiempo de incubación, obteniéndose halo de hemólisis más grandes a las 48 h.

Por otro lado, el extracto acuoso de *A. adstringens* sólo presentó actividad hemolítica a una concentración más alta (500 mg mL^{-1}) después de 24 h de incubación, lo cual puede deberse al tipo de saponina (esteroidal) o a la concentración de estos compuestos en el extracto. Con este extracto también se observó un incremento en el halo de hemólisis con el tiempo de incubación (Figura 7C).

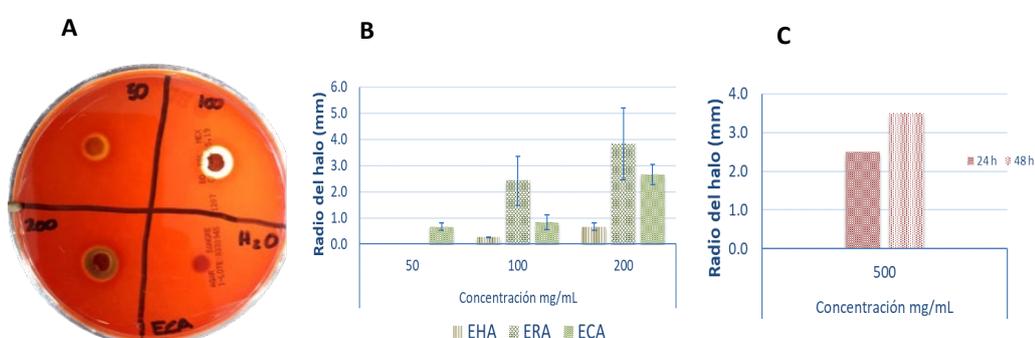


Figura 7. Actividad hemolítica de los extractos acuosos de hojas (EHA) y corteza (ECA) de *E. cyclocarpum*, y ramas (ARA) de *A. adstringens*. A) Halos de hemólisis producidos por ECA, B) Radio del halo de hemólisis (mm) de EHA y ECA después de 24 h de incubación, C) Radio del halo de hemólisis de ARA después de 24 y 48 h.

El aislamiento de los compuestos bioactivos de los extractos que presentaron actividad antifúngica se realizó mediante un fraccionamiento biodirigido, por lo que en cada paso se evaluó la actividad antifúngica y hemolítica de las fracciones.

En las especies vegetales *A. adstringens* y *E. cyclocarpum* se ha reportado la presencia de saponinas esteroidales y triterpénicas, respectivamente. Debido a que sus extractos acuosos presentaron actividad antifúngica y hemolítica, se realizó una partición con butanol para obtener fracciones enriquecidas con saponinas. Con respecto al extracto de *P. juliflora*, se obtuvo la fracción alcaloidal después de una extracción ácido/base.

Estas fracciones también presentaron actividad antifúngica, por lo que actualmente se está realizando la purificación de los compuestos de estas fracciones bioactivas.

CONCLUSIÓN

En las pruebas *in vitro* se obtuvo que los extractos de parota, cuachalalate y mezquite tienen un alto potencial antifúngico y pueden ser considerados como una alternativa para el control biológico de hongos fitopatógenos. En un primer fraccionamiento, las fracciones ricas en saponinas y alcaloides conservan la actividad antifúngica de los extractos. Aún se requieren más estudios a nivel *in vivo* para evaluar la efectividad de los extractos y poder establecer la dosis de aplicación. Y con base en estos resultados, estos extractos podrían ser usados como parte del manejo integrado de enfermedades durante la producción convencional de los cultivos. Hay otros dos puntos que es importante resaltar; el primero de ellos es que se debe tomar en cuenta el método de extracción y procesamientos de los extractos; el segundo punto es la obtención del material vegetal sin alterar la población de árboles y sin dañar severamente el árbol al obtener su corteza u otras partes, así como la fecha y sitio de colecta de este material vegetal debido a las variaciones en el contenido de los compuestos bioactivos dependiendo de los factores ambientales.

AGRADECIMIENTOS

Estos resultados son parte del proyecto **PN2016-2928**: Agentes antifúngicos provenientes de plantas para el control de *Sphaceloma perseae* Jenkins en aguacate, apoyado por el FOINS-CONACYT. Agradecemos las facilidades otorgadas por el Laboratorio Nacional PlanTECC.

REFERENCIAS

1. Atlas Agroalimentario 2019. Servicio de Información *Agroalimentaria* y Pesquera (SIAP).
2. APEAM, 2020. Buscador de plaguicidas recomendados para su uso en el cultivo de aguacate: biorracionales. Available at <https://plaguicidas.apeamac.com/buscador/listar/5/5/> (Accessed 19-10-20).
3. Hernández-Hernández M.L., Velasco-García M.V., López-Upton J., Galán-Larrea R., Ramírez-Herrera C. & Viveros-Viveros H. (2019). Crecimiento y supervivencia de procedencias de *Enterolobium cyclocarpum* en la costa de Oaxaca, México. *Bosque*, 40(2): 173-183.
4. Biabiany M., Roumy V., Hennebelle T., François N., Sendid B., Pottier M. & Bourgeois P. (2013). Antifungal activity of 10 guadeloupean plants. *Phytotherapy Research*, 27(11): 1640-1645.
5. Wang D. L., Sowemimo A., Gu Y. C., Gao S., Liu H. B. & Proksch P. (2015). Enterolacaciamine as a potential O-GlcNAcase activator from the leaves of *Enterolobium cyclocarpum*. *Fitoterapia*, 105: 89-92.
6. Abed El Kader D., Molina E., Colina G., Montero L. & León de Pinto G. (2003). Cationic composition and the tannin content of five gums from Venezuelan *Mimosaceae* species. *Food hydrocolloids*, 17: 251-253.
7. Raya-Gonzalez D., Pamatz-Bolanos T., Rosa E., Martinez-Munoz R. E., Ron-Echeverria O. & Martinez-Pacheco M. M. (2008). D-(+)-pinitol, a component of the heartwood of *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 63(11-12): 922-924.
8. Raya-González D., Ron-Echeverría O. A., Flores-García A., Macías-Rodríguez L. I. & Martínez-Pacheco M. M. (2013). Dissuasive effect of an aqueous extract from *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb on the drywood termite *Incisitermes marginipennis* (Isoptera: Kalotermitidae)(Latreille). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 524-530.
9. Jiménez-Vazquez V., León B., Ramírez R. & Cuevas-Figueroa X. (2017). Análisis morfológico comparativo de las estructuras reproductivas masculinas de los géneros *Orthopterygium* y *Amphipterygium* (Anacardiaceae). *Revista Peruana de Biología*, 24(2): 199-204.
10. Navarrete A., Martínez-Urbe S. & Reyes B. (1998). Gastroprotective activity of the stem bark of *Amphipterygium adstringens* in rats. *Phytotherapy research*, 12: 1-4.
11. Navarrete A., Oliva I., Sánchez-Mendoza M.E., Arrieta J., Cruz-Antonio L. & Castañeda-Hernández G. (2005). Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57: 1629-1636.
12. Arrieta J., Benitez J., Flores E., Castillo C. & Navarrete A. (2003). Purification of gastroprotective triterpenoids from stem bark of *Amphipterygium adstringens*; Role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Medica*, 69: 905-909.
13. Castillo-Juárez I., Rivero-Cruz F., Celis H. & Romero I. (2007). Anti-Helicobacter pylori activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Journal of ethnopharmacology*, 114(1), 72-77.
14. Ruiz-Bustos E., Velazquez C., Garibay-Escobar A., García Z., Plascencia-Jatomea M., Cortez-Rocha M.O. & Robles-Zepeda R.E. (2009). Antibacterial and antifungal activities of some Mexican medicinal plants. *Journal of medicinal food*, 12(6): 1398-1402.
15. Gonzalez E.E. & Delgado J.N. (1962). Phytochemical Investigation of *Amphipteryginm adstringens*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51(8): 786-790.

16. Golubov J., Mandujano M.C. & Eguiarte L.E. (2001). The paradox of mesquites (*Prosopis* spp.): invading species or biodiversity enhancers? *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 69: 23-30.
17. Bazie S., Ayalew A. & Woldetsadik K. (2014). Antifungal activity of some plant extracts against (*Colletotrichum musae*) the cause of postharvest banana anthracnose. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 5(2): 1-4.
18. Deressa T. Lemessa F. & Wakjira M. (2015). Antifungal activity of some invasive alien plant leaf extracts against mango (*Mangifera indica*) anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *International journal of pest management*, 61(2), 99-105.
19. Hussain F., Abid M., Shaukat S. S., Farzana & Akbar M. (2015). Anti-fungal activity of some medicinal plants on different pathogenic fungi. *Pak. J. Bot*, 47(5), 2009-2013.
20. Kishore G. K. & Pande S. (2005). Integrated management of late leaf spot and rust diseases of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) with *Prosopis juliflora* leaf extract and chlorothalonil. *International journal of pest management*, 51(4), 325-332.
21. Thippeswamy S., Mohana D.C., Abhishek R.U. & Manjunath K. (2013). Effect of plant extracts on inhibition of *Fusarium verticillioides* growth and its toxin fumonisin B1 production. *International Journal of Agricultural Technology*, 9(4): 889-900.
22. Raghavendra M. P., Satish S. & Raveesha K.A. (2009). Alkaloid extracts of *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. (Mimosaceae) against *Alternaria alternata*. *Journal of Biopesticides*, 2(1), 56-59.
23. dos Santos E.T., Pereira M.L. A., Da Silva C.F.P., Souza-Neta L.C., Geris R., Martins D. & Figueiredo M.P. (2013). Antibacterial activity of the alkaloid-enriched extract from *Prosopis juliflora* pods and its influence on *in vitro* ruminal digestion. *International journal of molecular sciences*, 14(4): 8496-8516.
24. Singh S. & Verma S.K. (2011). Antibacterial properties of alkaloid rich fractions obtained from various parts of *Prosopis juliflora*. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 2(3): 114-120.
25. Malhotra S. & Misra K. (1981). 3,3'-di-O-methylellagic acid 4-O-rhamnoside from the roots of *Prosopis juliflora*. *Phytochemistry*, 20(8): 2043-2044.
26. Shukla R.V. & Misra K. (1981). Two flavonoid glycosides from the bark of *Prosopis juliflora*. *Phytochemistry*, 20: 339-340.