



"saber de mis hijos  
ará mi grandeza"

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos

Programa de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos

**Especialidad en Almacenamiento y Procesamiento de Granos**

**Efecto de extractos de plantas silvestres en el desarrollo  
de *Fusarium verticillioides***

**TESIS**

**Que para obtener el Grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**Presenta:**

***Fabiola Fimbres López***

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

# CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b>	iv
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	v
<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>OBJETIVOS</b>	5
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	6
Importancia del género <i>Fusarium</i>	6
<i>Fusarium verticillioies</i>	8
Fumonisinias	10
Extractos de plantas como alternativa para el control de <i>Fusarium verticillioides</i>	14
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	19
Obtención de los extractos de plantas	19
Evaluación de actividad antifúngica de los extractos de plantas	22
Crecimiento radial por la técnica de inoculación por pozo	22
Germinación de esporas por inoculación por siembra en placa	22
Producción de biomasa	23

Extracción diferencial del extracto metanólico	23
Análisis estadístico	24
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	25
Extractos crudos	25
Crecimiento radial	25
Germinación de esporas	31
Producción de biomasa	34
Fracciones diferenciales	34
Obtención de los extractos diferenciales	34
Crecimiento radial	37
Germinación de esporas	43
Producción de biomasa	45
<b>CONCLUSIONES</b>	50
<b>RECOMENDACIONES</b>	51
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	52
<b>ANEXOS</b>	62
1. Determinación de fumonisina B <sub>1</sub>	63
2. Cromatogramas	66
3. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i> en medio con extractos en relación al control con metanol.	69
4. Porcentaje de inhibición de germinación de esporas de <i>F. verticillioides</i> en medio con extracto de <i>J. macrocarpa</i> con respecto al control con metanol.	70

5. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *F. verticillioides* en medio con extracto metanólico y la fracción con butanol de *J. macrocarpa* 71
6. Porcentaje de inhibición de germinación de esporas de *F. verticillioides* en medio con extracto metanólico y fracción con butanol de *J. macrocarpa* con respecto al control con metanol 72

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Páginas
I	Velocidad de crecimiento de <i>F. verticillioides</i> en los medios con extractos de plantas y los controles.	30
II	Velocidad de crecimiento radial, velocidad de germinación de esporas y tasa de crecimiento de <i>F. verticillioides</i> en presencia del extracto metanólico de <i>J. macrocarpa</i>	36
III	Velocidad de crecimiento radial, velocidad de germinación de esporas y tasa específica de crecimiento de <i>F. verticillioides</i> en presencia del extracto metanólico de <i>J. macrocarpa</i> y la fracción butanol.	47

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Páginas
1	Macroconidias de <i>Fusarium ssp</i>	9
2	Estructura química de las fumonisinas FB <sub>1</sub>	12
3	Planta <i>Krameria erecta</i> (Cosahui)	20
4	Planta <i>Jacquinia macrocarpa</i> (San Juanico)	21
5	Crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i> en medios con extractos de <i>Krameria erecta</i> .	26
6	Crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i> en medios con extractos de <i>Jacquinia macrocarpa</i> .	27
7	Porcentaje de esporas germinadas de <i>F. verticillioides</i> en medio con extracto de <i>J. macrocarpa</i> con respecto al control con metanol.	32
8	Peso del micelio producido por <i>F. verticillioides</i> en medios con extractos de <i>Jacquinia macrocarpa</i> .	35
9	Crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i> en medios con la fracción de hexano de <i>J. macrocarpa</i> .	38
10	Crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i> en medios con la fracción de acetato de etilo de <i>J. macrocarpa</i>	39
11	Crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i> en medios con extracto metanólico de <i>J. macrocarpa</i> .	40

12	Crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i> en medios con la fracción de butanol de <i>J. macrocarpa</i>	41
13	Crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i> en medios con extracto metanólico y fracción de butanol de <i>J. macrocarpa</i> .	42
14	Cinética de germinación de esporas de <i>F. verticillioides</i> en presencia de extracto metanólico y fracción con butanol de <i>J. macrocarpa</i>	44
15	Peso del micelio producido por <i>F. verticillioides</i> en presencia del extracto metanólico y la fracción con butanol de <i>J. macrocarpa</i> y los controles.	46



## RESUMEN

Los granos son generalmente atacados por diferentes géneros de hongos. En particular, las especies de *Fusarium* han tomado gran interés por presentar alta incidencia en estos productos, sobre todo *F. verticillioides* comúnmente encontrado en maíz, el cual es la base de la alimentación de millones de personas en el mundo. Se sabe que *F. verticillioides* no solo ocasiona deterioro en el producto, provocando pérdidas económicas, sino que también es productor de micotoxinas, dentro de las cuales la fumonisina B<sub>1</sub> es la que frecuentemente se ha encontrado en maíz contaminado con este hongo, ocasionando un riesgo en la salud de humanos y animales que consumen el alimento contaminado. Para el control del hongo es necesario utilizar compuestos químicos (fungicidas), sin embargo, el uso desmedido de estos productos ocasiona diversos problemas que van desde daño al medio ambiente hasta riesgo de toxicidad a los usuarios, además de que estos organismos han generado resistencia a estos compuestos. En la búsqueda de nuevos productos que puedan ayudar a controlarlos organismos patógenos surge como una alternativa el uso de extractos de plantas silvestres. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de extractos metanólicos de las plantas silvestres *Krameria erecta* y *Jacquinia macrocarpa* en el desarrollo de *F. verticillioides* mediante pruebas de crecimiento radial, germinación de esporas y producción de biomasa. De esta evaluación se observó que el extracto de *K. erecta* no presentó actividad contra el hongo mientras que el extracto de *J. macrocarpa* presentó 56.3 % de inhibición del crecimiento radial, inhibió la germinación de esporas en un 49 % y provocó una reducción en la

producción del micelio de *F. verticillioides*. Este extracto fue seleccionado para continuar con su evaluación. Se llevó a cabo una fraccionación diferencial al extracto metanólico de *J. macrocarpa* utilizando como solventes hexano, acetato de etilo y butanol y se evaluó la actividad de cada fracción obtenida, encontrando que la fracción butanol (FB) presentó 66% de inhibición del crecimiento radial, 41% de inhibición de germinación de esporas y además la producción de micelio disminuyó en la presencia de esta fracción. Por lo anterior se concluye que el extracto de *J. macrocarpa* contiene compuestos que afectan el crecimiento de *F. verticillioides* y que dichos compuestos se encuentran en la fracción butanol, por lo que es probable que éstos sean de naturaleza polar.

## INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la alimentación de millones de personas está basada en productos agrícolas, principalmente de granos. Sin embargo, durante la producción y almacenamiento de estos productos se presentan algunos problemas en su deterioro pudiendo ocasionar un efecto dañino a la salud de humanos y animales, siendo el trigo y el maíz los cereales más susceptibles al ataque de insectos y hongos (Tequida-Meneses y col., 2002).

Particularmente, los granos son infectados en el campo por diversos hongos, entre los cuales se encuentran algunas especies de *Fusarium sp.*, siendo una de las más persistentes *F. verticillioides*, el cual es reconocido como un problema agrícola importante ya que es uno de los patógenos predominantes asociados a maíz a nivel mundial (Tequida-Meneses y col., 2002; Suárez-Jiménez y col., 2007). Además de causar daños al grano, producen una variedad de micotoxinas que causan efectos biológicos y toxicológicos en seres humanos y animales (Doko y col., 1996).

Para el control de *F. verticillioides* se utilizan una variedad de fungicidas sintéticos. Sin embargo, su uso indiscriminado ocasiona problemas de contaminación ambiental, toxicidad a los usuarios y presencia de residuos tóxicos en granos y sus productos. También se ha generado resistencia de estos organismos fitopatógenos, así como daño a organismos benéficos (Rani y Murty, 2006; Fokialakis y col., 2006; Abou-Jawdah y col., 2004; Meaza y col., 2003; Ramírez-Chávez y col., 2000; Guerrero-Rodríguez y col., 2007).

Debido a los problemas causados por el uso de productos agroquímicos para el control de estas plagas, existe la necesidad de desarrollar productos naturales que sean eficaces, biodegradables y que no dañen el medio ambiente (Rani y Murty, 2006). Una alternativa económica, eficiente y prometedora es el uso de productos botánicos provenientes de diversos extractos de plantas que tengan la capacidad de inhibir el crecimiento del hongo y ser utilizados para su control (Ramírez-Chávez y col., 2000; Guerrero-Rodríguez y col., 2007).

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de extractos metanólicos de *Krameria erecta* y *Jacquinia macrocarpa* recolectadas en el estado de Sonora sobre el desarrollo de *Fusarium verticillioides*.

### Objetivos específicos

Obtener un extracto metanólico de *Krameria erecta* y *Jacquinia macrocarpa* recolectadas en los alrededores de la región de Los Arrieros, Sonora .

Seleccionar el extracto metanólico que presente actividad antifúngica contra el crecimiento radial y germinación de esporas *Fusarium verticillioides*.

Obtener extractos diferenciales a partir del extracto crudo de la planta seleccionada en el objetivo anterior.

Determinar el efecto de los extractos diferenciales en el crecimiento radial y germinación de esporas de *Fusarium verticillioides*.

## REVISIÓN BILIOGRÁFICA

### Importancia del género *Fusarium*

Los productos agrícolas son frecuentemente atacados por una diversidad de hongos, entre los cuales se encuentran los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium*, que además de deteriorar a los productos, también son productores de micotoxinas. Actualmente, el género *Fusarium* ha tomado mayor interés y es reconocido como un problema agrícola mundial, ya que infecta a una gran diversidad de plantas, principalmente cereales (Doko y col., 1996; Tequida-Meneses y col., 2002).

Las especies del género *Fusarium* infectan un gran número de plantas cultivadas. La presencia de especies fitopatógenas de este género en el suelo es uno de los principales impedimentos para la siembra continua de los campos (Kitagawa y col., 1989). Lo cual limita la siembra de cultivos de importancia para la población de las regiones infestadas, así como la reducción en la producción de alimentos.

Como patógenos de humanos se les responsabiliza de causar queratomycosis o úlceras de la cornea, infecciones cutáneas, meningoencefalitis y micosis subcutánea (Leck y col., 2002; Chade y col., 2003).

Este género comprende un amplio grupo de hongos con distribución mundial y una gran variedad de ellos tienen considerable importancia en alimentos, principalmente en cereales donde las especies más frecuentemente encontradas son *F. proliferatum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides*, las cuales, además de causar daños a los granos, se caracterizan por producir diversos tipos de micotoxinas, tales como fumonisinas, zearalenona y tricotecenos (Gallardo-Reyes y col., 2006; Hernández-Delgado y col., 2007; Sanabria y col., 2002).

Estudios realizados en México han reportado que las especies de *Fusarium* son los hongos predominantes en maíz cosechado y además, la especie predominante en este cereal es *Fusarium verticillioides*. En Tamaulipas, México, se reportó la presencia de especies de *Fusarium* en más del 60 % de los cultivos de maíz blanco y amarillo (Hernández-Delgado y col., 2007). De la misma manera, en el 2003 se reportó que en Sonora el género aislado con mayor frecuencia en grano de maíz fue *Fusarium* (67-70 %) (Cortez-Rocha y col., 2003). De igual forma, Gallardo-Reyes y col. (2006) reportaron que en maíz de la región del Río Sonora y Valle del Mayo (Sonora), se presentó una invasión del 63 y 67 % respectivamente, siendo *F. verticillioides* el de mayor prevalencia en ambos estudios.

## ***Fusarium verticillioides***

*Fusarium verticillioides* es un hongo fitopatógono predominante en maíz y se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial (Marasas, 1984 en: Suárez-Jiménez y col., 2007). Es capaz de infectar varias partes de la planta, causando pudrición de mazorca, tallo, raíz y grano, ocasionando pérdidas en rendimiento y disminución de la calidad del grano. Este hongo puede entrar en la planta de maíz sistemáticamente desde la semilla, a través de heridas o infecciones en la planta (Leslie y Summerell, 2006).

Primeramente aparece como una coloración salmón pálido en el pedicelo de la punta de los granos, seguido de un crecimiento de moho polvoso de color rosa en los granos infectados, que está compuesto por numerosas esporas (Mendoza y col., 2006).

En agar papa dextrosa (PDA), los cultivos inicialmente presentan micelio blanco, pero con el tiempo pueden desarrollar un color violeta. Sin embargo, la pigmentación en el agar varía desde la no pigmentación o naranja grisáceo a gris violeta o violeta oscuro (Leslie y Summerell, 2006).

Sus macroconidias son relativamente largas y delgadas, ligeramente curvadas o rectas, terminan en punta y son de paredes delgadas. Presentan de 3 a 5 septos (Figura 1) (Leslie y Summerell, 2006).

Este hongo requiere de un alto contenido de humedad para desarrollarse. La mínima actividad de agua ( $a_w$ ) para su crecimiento es de 0.87 a 25° C y la





Figura 1. Macroconidias de *Fusarium ssp*

Fuente: <http://sian.inia.gob.ve>

temperatura óptima es de 22.5-27.5°C, mientras que la mínima es de 2.5-5°C y la máxima de 32-37°C (Pitt y Hocking, 1999; Sampson y col., 2002 en Suárez y col., 2005). La germinación de esporas es sensible a la actividad de agua, con un amplio rango de temperatura (25-37°C) y la germinación óptima ocurre a una actividad de agua entre 0.96- 0.98 (Leslie y Summerell, 2006).

Las cepas de *F. verticillioides* también se caracterizan por la producción de varias toxinas y compuestos con acción fitohormonal, entre las cuales se encuentran ácido fusárico, fusarinas (fusarina C), giberelinas, moniliformina, zearalenona, tricotecenos y fumonisinas, siendo estas últimas las más predominantes. (Nelson, 1992; Bacon y Williamson 1992; Sweeney Dobson 1998).

## **Fumonisin**

Las fumonisinas son una familia de micotoxinas que fueron aisladas en África del Sur en 1988 a partir de cultivos de *Fusarium moniliforme* (sinónimo de *Fusarium verticillioides*) (Gelderblom y col., 1988).

Son micotoxinas policétidas producidas por varias especies de *Fusarium*, especialmente *F. verticillioides* (Nelson y col., 1993 en Desjardins y Plattner., 2000) y se caracterizan por tener dos cadenas laterales de ácido tricarbóxico esterificadas a una cadena de aminopentol con uno o más grupos hidroxilos (Figura 2) (Gelderblom y col., 1988). Más de veinte distintas fumonisinas han sido

descritas (Rheeder y col., 2002), pero la fumonisina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y B<sub>3</sub> son mayormente producidas en los alimentos, siendo la B<sub>1</sub> la más comúnmente encontrada de manera natural.

Respecto a la presencia de fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) en México, se ha reportado que dentro de las toxinas producidas por *Fusarium* la fumonisina B<sub>1</sub> es encontrada en mayor número de muestras. Robledo y col., (2001) encontraron fumonisina B<sub>1</sub> en el 100% de las muestras de maíz forrajero proveniente del Estado de Nayarit, con una concentración promedio de 2.541 mg/Kg. Así mismo, en Sonora se han reportado concentraciones alrededor de 1.1 – 3.4 mg/Kg (Cortez-Rocha y col., 2003) y de 454 - 4047 mg/Kg (Sánchez-Rangel y col., 2005) de fumonisina B<sub>1</sub> en muestras de maíz tomadas de plantas comerciales. En ambos estudios se observó que las cepas de *F. verticillioides* frecuentemente aisladas de los cultivos de maíz son las que tienen alto potencial de producción de fumonisina B<sub>1</sub>.

Diferentes estudios *in vivo* han demostrado que el consumo de fumonisinas causa una serie de micotoxicosis incluyendo leucoencefalomalacia en equinos, edema pulmonar en porcinos y cáncer de hígado en ratas (Nelson y col., 1993, en Desjardins y Plattner., 2000). El consumo de maíz contaminado con fumonisinas se ha asociado con la incidencia de cáncer de esófago en humanos en algunas áreas del mundo donde el maíz es la base de la alimentación (Marasas, 1996, Desjardins y Plattner., 2000; Sydenham y col., 1990, en Marasas y col., 2004).

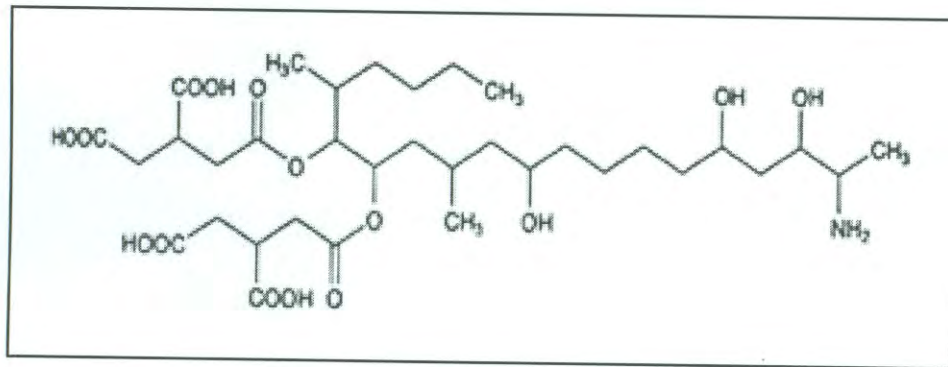


Figura 2. Estructura química de las fumonisinas FB<sub>1</sub>

Fuente: [http://www.ucm.es/info/otri/complutecno/imagenes/tec\\_mtgonzalez1\\_2.jpg](http://www.ucm.es/info/otri/complutecno/imagenes/tec_mtgonzalez1_2.jpg)

Se ha demostrado que la fumonisina B<sub>1</sub> puede causar cáncer de hígado y de riñón en ratas y ratones (Gelderblom y col., 1991 en Marasas y col., 2004). Además de su toxicidad y carcinogenicidad, la fumonisina B<sub>1</sub> tiene efectos en el metabolismo de esfingolípidos ya que inhibe la ceramida sintetasa, la cual cataliza la acilación de esfingonina (Merrill y col., 2001; Merrill y col., 1993; Desai y col. 2002). La inhibición aparentemente proviene de la notable similitud estructural entre las fumonisinas y las bases de cadena larga como esfingonina y esfingosina (Merrill y col., 1993).

Además, ha surgido evidencia de que estas micotoxinas también pueden ser teratogénicas, por lo menos en parte, a través de la interferencia con la utilización de ácido fólico, un suplemento dietético que reduce la incidencia de defectos del tubo nervioso (NTD). El conocimiento sobre fumonisinas como posibles factores de riesgo para los defectos de nacimiento se intercaló a "el Taller en el Papel de Fumonisinas en Defectos del Tubo Nervioso" en Atlanta, Georgia, el 21 de enero de 2003 (Marasas y col., 2004).

Debido al riesgo en la salud de humanos y animales por el consumo de fumonisinas, la FDA (Food and Drug Administration) estableció límites recomendados para su contenido en alimentos destinados al consumo humano y animal. Para productos de maíz molido se estableció un límite de 2 µg/g, y para maíz destinado al consumo de caballos de 5 mg/g (Figuroa-Gómez y col., 2007; Bush y col., 2004).

## **Extractos de plantas como alternativa para el control de *Fusarium verticillioides***

Los productos agrícolas, particularmente los granos, pueden ser infectados por una gran diversidad de organismos, que van desde insectos, bacterias y hongos. Entre los hongos más comunes presentes en estos productos se encuentran *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Doko y col., 1996). Estos últimos, además de ocasionar deterioro en los productos, son capaces de producir micotoxinas de riesgo para la salud de humanos y animales que consumen estos alimentos contaminados.

Por lo anterior, es de suma importancia mantener la inocuidad de los alimentos. Para ello, se han establecido diferentes métodos de control para evitar el desarrollo de éstos organismos.

Dentro de estos métodos se encuentra el uso de plaguicidas, los cuales se pueden clasificar de acuerdo al tipo de organismo que controlan; en éstos se incluyen los fungicidas (control de hongos y levaduras). En México se permite el uso de 428 plaguicidas, de los cuales 125 son fungicidas (CICOPLAFEST, 2004). Estos productos pueden actuar en forma preventiva o en algunos casos terapéuticamente. Sin embargo, en México los fungicidas sintéticos son de uso cotidiano (AMIPFAC, 1993 en: Ramírez-Chávez y col., 2000).

El control, por medio de los fungicidas sintéticos, es un método ampliamente utilizado para reducir el crecimiento de hongos fitopatógenos y con ello disminuir la incidencia de daños y contaminación de granos por micotoxinas (Wilson y Wisniewski, 1989 en: Ramírez-Chávez y col., 2000). Sin embargo, el manejo indiscriminado de los agroquímicos sintéticos ha ocasionado diversos

problemas, como contaminación ambiental, residualidad en productos almacenados, que en consecuencia afectan las exportaciones y presentan un riesgo toxicológico para el personal que los manipula (Rani y Murty, 2006; Ramírez-Legarreta y Jacobo-Cuéllar, 2002). Se ha presentado también un aumento en la incidencia de resistencia de los agentes fitopatógenos al ingrediente activo de algunos fungicidas, lo que conlleva a utilizar altas dosis y aplicaciones continuas, ocasionando grandes pérdidas económicas (Duke, 2003 en: Fokialakis col., 2006). Incluso, el uso de la gran diversidad de estos productos químicos ha ocasionado también daño a organismos benéficos (Anderson y col., 2003).

Debido a los problemas causados por el uso de productos agroquímicos para el control de estas plagas, existe la necesidad de desarrollar productos naturales que sean eficaces, biodegradables, de menor toxicidad para mamíferos y que no dañen al medio ambiente (Rani y Murty, 2006). Una alternativa económica, eficiente y prometedora para el control de hongos, es el uso de fungicidas provenientes de diversos extractos de plantas. (Ramírez-Chávez y col., 2000; Guerrero-Rodríguez y col., 2007).

En el caso de microorganismos fitopatógenos, existe información de una gran cantidad de especies de plantas con propiedad antifúngica. Se ha sugerido que algunos compuestos denominados bioactivos, presentes en los extractos o aceites esenciales de estas plantas, son los responsables de dicha actividad (Ramírez-Chávez y col., 2000). Durante los últimos años se han seleccionado diferentes especies de plantas con actividad antifúngica, y desarrollado productos basados en estas plantas (Rani y Murty, 2006).

Sobre el uso de plantas para el control de hongos fitopatógenos, se han realizado varios estudios donde se reportan que diferentes extractos de plantas tienen diversos efectos sobre estos hongos. En 2004 se reportó que cuatro plantas silvestres de Líbano: *Plumbago maritima* (L.), *Micromeria nervosa*, *Inula viscosa* (L.) Ait y *Origanum syriacum* Sieb. exs. et L., presentaron alta capacidad antifúngica contra *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp. y *Fusarium oxysporum*, presentando un rango de inhibición del micelio de 70-100 %. Además se presentó cerca del 100 % de inhibición en la germinación de esporas (Abou-Jawdah y col., 2004). En estudios realizados en México, se encontró que extractos de *Flourensia cernua* presentaron efectos de inhibición micelial (IM) sobre *Alternaria alternata* (91 % IM de extracto hexánico), *Penicillium digitatum* (96 % IM de extracto etanólico), *Colletotrichum gloeosporioides* (93% IM de extracto etanólico). Sin embargo, no todos los extractos afectaron la esporulación (Guerrero-Rodríguez y col., 2007).

También se han encontrado efectos inhibitorios sobre algunas especies de *Fusarium* sp. Márquez y col. (2007) reportaron que extractos de *Pedilanthus tithymaloides* (fraccionado en diclorometano) mostraron actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum* mayor a 70 % de inhibición para todas las concentraciones probadas y para la fracción en acetato de etilo un rango de 30-67 %. Así mismo, se ha reportado que los extractos (cloroformo/ metanol) de *Tagetes lucida* presentaron 89% de inhibición contra *F. moniliforme* comparado con un control positivo (ketoconazol). Además de presentar actividad fungistática contra este hongo, el mismo extracto presentó 77.5 % de inhibición contra *F.*



*sporotrichum*, 56 y 55 % contra *Aspergillus niger* y *Rhizoctonia solani*, respectivamente (Cespedes y col., 2006).

Algunas plantas de la región de Sonora también han sido estudiadas por diferentes factores. Tequida-Meneses y col. (2002) evaluaron el efecto fungicida de extractos alcohólicos de plantas silvestres de tres regiones de Sonora sobre diversas especies de hongos como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium poae* y *Fusarium moniliforme* observando que *Larrea tridentata* inhibió el crecimiento de seis especies de hongos en un rango de 41.5 % hasta el 100 %. En lo referente a los hongos del género *Fusarium*, *F. verticillioides* fue uno de los hongos más resistentes ya que solo fue inhibido por dos extractos vegetales, *L. tridentata* y *B. glutinosa* (88 y 54% de inhibición respectivamente). Sin embargo, se encontró amplia variación en el grado de inhibición de crecimiento en otros hongos en estudio ya que no todos los hongos fueron inhibidos por los mismos extractos, ni en el mismo grado (Tequida-Meneses y col, 2002). Lo anterior concuerda con lo reportado por Suárez-Jiménez y col., (2007) en donde los resultados muestran que los extractos de *Baccharis glutinosa* y *Larrea tridentata*, en todas las concentraciones, fueron las más efectivas para controlar la germinación de esporas de *F. verticillioides*. En algunos casos, en todas las concentraciones probadas, estos extractos redujeron al máximo el porcentaje de germinación de esporas. De la misma forma para crecimiento radial, los extractos de estas dos plantas en todas las concentraciones probadas fueron las más efectivas para el control del crecimiento de la colonia. Sin embargo, también se reporta que la

producción de fumonisina B1 no fue afectada en ninguno de los tratamientos probados (Suárez-Jiménez y col., 2007).

Estos resultados muestran que *F. verticillioides* es un hongo resistente y difícil de controlar, sin embargo, hay evidencia de que extractos de ciertas plantas pueden tener un efecto fungistático, lo cual indica que su desarrollo puede ser controlado hasta cierto punto. A pesar de que su crecimiento puede ser controlado. Aunque hasta el momento no se ha reportado que extractos de plantas inhiban la producción de fumonisinas, es recomendable continuar investigando los efectos de los extractos ya probados, realizando una fraccionación del extracto crudo para tratar de llegar al compuesto o compuestos activos. Así como también, seguir con la investigación para el desarrollo de un método para el control de la producción de fumonisinas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo la recolección de plantas silvestres *Krameria erecta* (Cosahui) (Figura 3) y *Jacquinia macrocarpa* (San Juanico) (Figura 4) en los alrededores de la región de Los Arrieros, Sonora, ubicada en las coordenadas N 28° 20.538' W 111° 08.911' Altitud 280 pies y N 28° 19.526' W 111° 08.828' Altitud 277 pies respectivamente.

### Obtención de los extractos de plantas

Las hojas y tallos de las plantas Cosahui (*K. erecta*) y San Juanico (*J. macrocarpa*) fueron secadas a la sombra por dos semanas y molidas a un tamaño de partícula 0.5-1.0 mm. Los extractos se prepararon mezclando 600 g de cada polvo de planta con 9.4 L de metanol al 70% (marca Fermont) con agitación frecuente, durante diez días. Pasado este tiempo, los extractos fueron filtrados a través de un papel filtro Whatman No. 1 y después se llevó a cabo una destilación por medio de un rotavapor (Yamato RE300) a 45°C para la recuperación del solvente utilizado. Los extractos fueron almacenados en oscuridad a temperatura ambiente (Suárez-Jiménez y col., 2007).

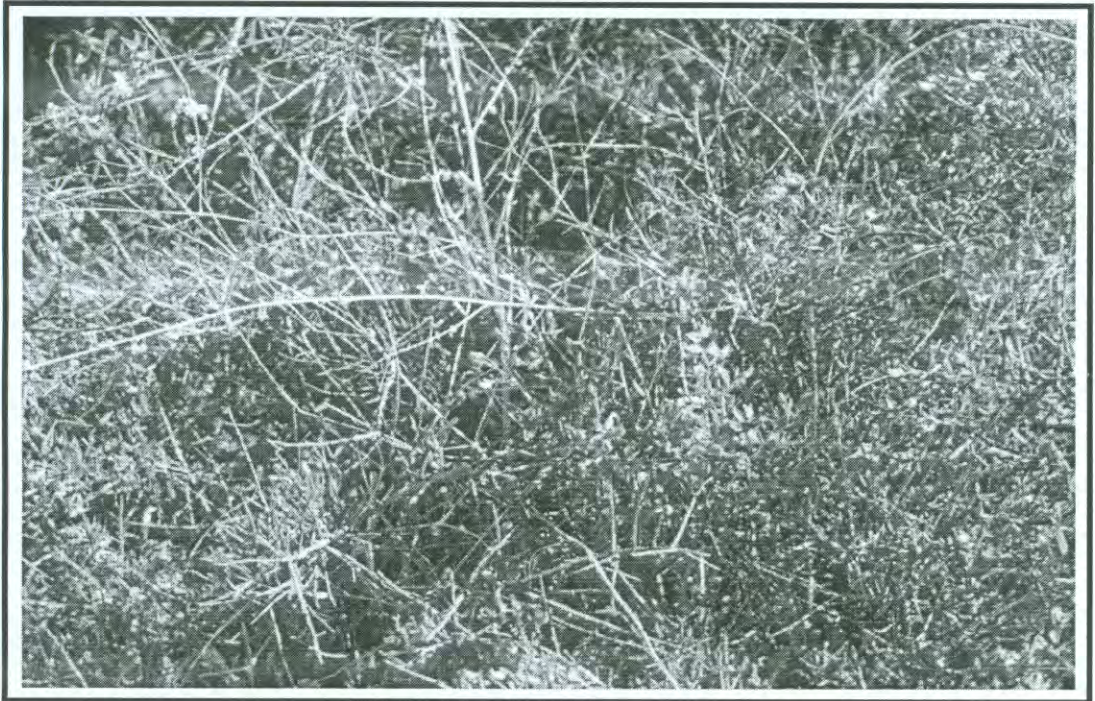


Figura 3. Planta *Krameria erecta* (Cosahui)

Fuente: Plant Image Collection Photo by W. L. Wagner.

<http://persoon.si.edu/PlantImages/>



Figura 4. Planta *Jacquinia macrocarpa* (San Juanico)

## Evaluación de actividad antifúngica de los extractos de plantas

### **Crecimiento radial por la técnica de inoculación por pozo**

Se prepararon medios de cultivo de agar papa dextrosa (PDA) con 500, 1000 y 2000 mg/L de cada uno de los extractos metanólicos. Se utilizaron tratamientos control con PDA (CPDA) y PDA con metanol (CMeOH). Con una pipeta Pasteur estéril se realizó un pozo de 0.6 cm en el centro de la placa de Petri y de él se depositó el hongo a una concentración de  $1 \times 10^5$  esporas/ml y se incubó a 25° C con ciclos de 12 h luz/oscuridad. El diámetro de la colonia se midió cada 24 h, hasta que el control alcanzó el límite del borde de la placa (Suárez-Jiménez y col., 2007).

### **Germinación de esporas por inoculación por siembra en placa**

Con los datos obtenidos de la prueba de crecimiento radial; se llevó a cabo un análisis Probit con el programa estadístico NCSS97 (NCSS Inc., USA) para obtener la concentración media inhibitoria (CMI). Se preparó el medio PDA con el extracto metanólico seleccionado a una concentración de 1882 mg/L (CMI) y se inoculó con esporas de *F. verticillioides* a  $1 \times 10^4$  esporas/ml, incubándose a 25°C con ciclos de 12 hs luz/oscuridad. El número de esporas germinadas por placa se determinó cada 4 h contando 200 esporas al azar (germinadas y no germinadas), utilizando un microscopio óptico (Olympus CX31). Una espora se consideró germinada cuando la

longitud del túbulo germinal alcanzó la mitad del diámetro total de la espora (Plascencia-Jatomea y col., 2003).

### **Producción de biomasa**

La producción de biomasa fue cuantificada con el peso seco del micelio producido. Para ello se preparó el medio PDA con 1882 mg/L de extracto metanólico y se inoculó con una concentración de  $1 \times 10^5$  esporas/ml incubándose a 25°C con ciclos de luz/oscuridad, tomando muestras cada 24 h. Se tomó el agar con la biomasa producida y se colocó dentro de un vaso de vidrio conteniendo 200 ml de agua destilada, se calentó hasta la completa disolución del agar. La solución se filtró con vacío en un papel filtro Wathman No.4, previamente pesado, lavando con agua destilada. El papel filtro con el micelio se secó a 105°C por dos horas y el peso de la colonia seca se expresó en  $\text{mg}/\text{cm}^2$  (Suárez-Jiménez y col., 2007).

### **Extracción diferencial del extracto metanólico**

Se tomaron 20 g del extracto metanólico, se le añadió 1 L de agua destilada y se agitó por 20 minutos. A esta solución se le agregó 1 L de hexano (marca J. T. Baker) y se agitó por 20 min, después se colocó en un embudo de separación y se dejó toda la noche. Posteriormente se llevó a cabo la separación de las capas, la capa de hexano fue recuperada y almacenada. El mismo procedimiento fue realizado para obtener las

fracciones en acetato de etilo (marca J. T. Baker) y butanol (marca Fermont). Ya obtenidas las fracciones se llevó a cabo la destilación para la recuperación de los solventes y obtención de los extractos diferenciales utilizando un rotavapor Yamato RE300.

### **Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza para determinar la diferencia estadística entre los tratamientos con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) utilizando el paquete estadístico InfoStat.



## RESULTADOS Y DUSCUSIÓN

### Extractos crudos

#### **Crecimiento Radial**

Para la determinación del porcentaje de inhibición de crecimiento radial, se utilizó el control con metanol, debido a que durante el ensayo se observó que éste presentó efecto inhibitorio.

La cinética de crecimiento radial de *Fusarium verticillioides* en el medio con el extracto de *K. erecta* (C) se muestra en la figura 5, en ésta se observa que el extracto a 2000 mg/L (C2000) presentó un radio menor que los controles, logrando un mayor porcentaje de inhibición de 25% (24 h) (Anexo 3). Sin embargo este efecto fue disminuyendo con el tiempo. En este mismo extracto, a las concentraciones de 500 mg/L y 1000 mg/L se observa que el radio de la colonia es mayor que en el control con metanol (Figura 5). Estos resultados indican que el extracto de *K. erecta* no presentó efecto contra el crecimiento de *F. verticillioides*. Sin embargo, en diversos estudios se indica que los extractos de plantas actúan en forma distinta con diferentes hongos, es decir, un mismo extracto puede ser efectivo para controlar una especie de hongo y no presentar efecto inhibitorio en otro hongo. (Fokialakis y col., 2006; Hernández y col., 2007; Tequida-Meneses y col., 2002). Por lo que este extracto puede presentar efecto negativo a otros hongos fitopatógenos.

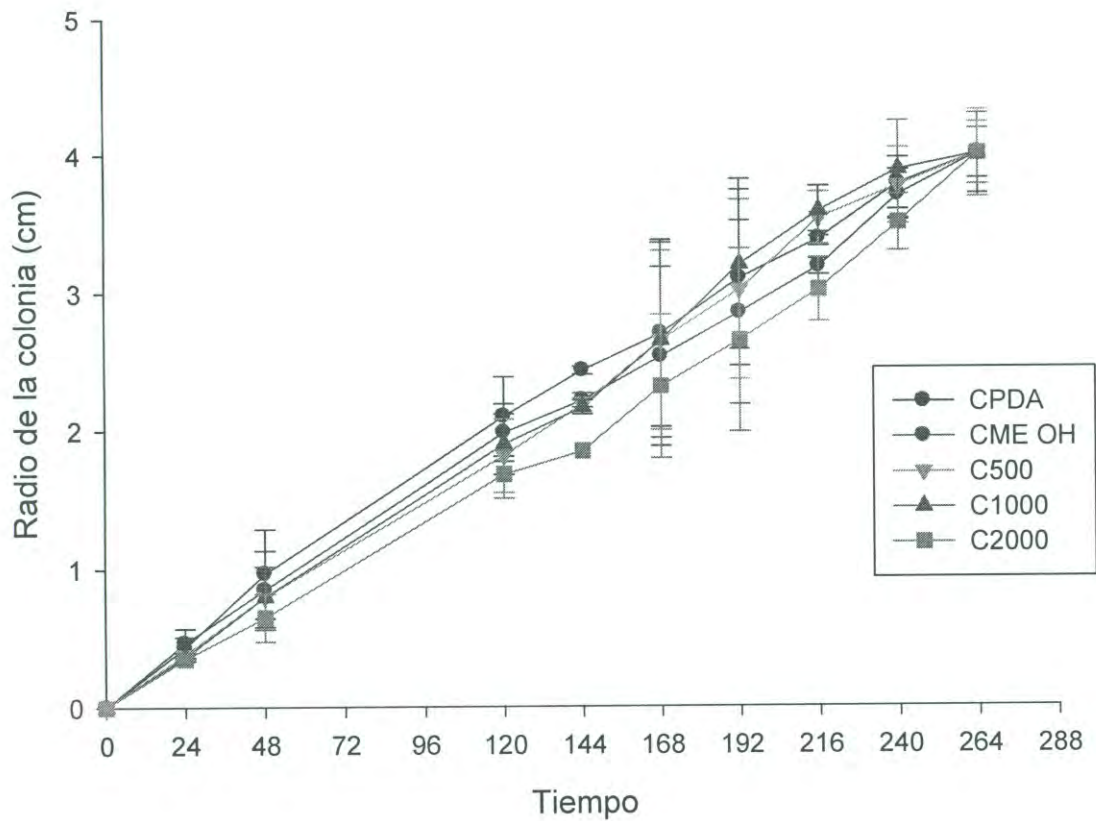


Figura 5. Crecimiento radial de *F. verticillioides* en medios con extractos de *Krameria erecta*. CPDA = Control con agar papa dextrosa, CMeOH = Control con metanol, C = *K. erecta*, 500 = 500 mg/L, 1000 = 1000 mg/L, 2000 = 2000 mg/L.

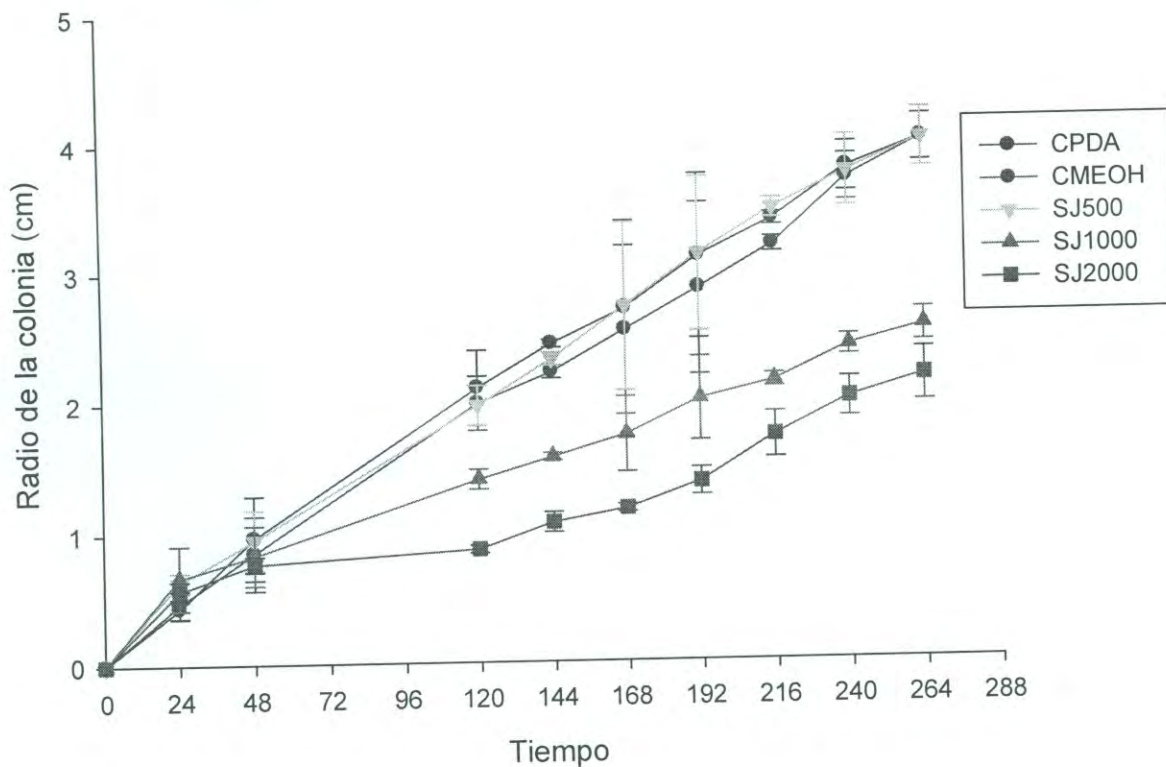


Figura 6. Crecimiento radial de *F. verticillioides* en medios con extractos de *Jacquinia macrocarpa*. CPDA = Control con agar papa dextrosa, CMeOH = Control con metanol, SJ = *J. macrocarpa*, 500 = 500 mg/L, 1000 = 1000 mg/L, 2000 = 2000 mg/L.

Por otra parte, el extracto de *J. macrocarpa* (SJ) a concentraciones de 1000 mg/L (SJ1000) y 2000 mg/L (SJ2000) tuvo un efecto negativo en el crecimiento radial de *F. verticillioides* (Figura 6) ya que el radio de la colonia fue menor que en los controles. En la figura 6 también se observa que el crecimiento del hongo en el medio con 500 mg/L de extracto es mayor que en los controles, esto puede deberse a que a bajas concentraciones los compuestos presentes en el extracto favorecen el crecimiento del hongo y que al ir aumentado la concentración de éstos se vuelven tóxicos afectando su crecimiento radial. SJ1000 presentó un rango de inhibición de 29.4-36.3%, teniendo el mayor porcentaje de inhibición a las 264 h. El extracto a 2000 mg/L presentó la mayor inhibición desde las 48 hasta 264 h, obteniéndose un 56.3% a las 120 h (Anexo 3), con esto se observa que a mayor concentración del extracto mayor efecto inhibitorio. Se observa también (Anexo 3) que a partir de las 168 h el extracto de *J. macrocarpa* (1000 y 2000 mg/L) presentan un porcentaje de inhibición significativamente diferente ( $p \leq 0.05$ ) en comparación con el extracto de *K. erecta*, además de presentar diferencia entre estas dos concentraciones.

No se han reportado efectos antimicrobianos de extractos de *J. macrocarpa*, sin embargo, existen reportes de extractos de plantas recolectadas en el estado de Sonora que presentan efecto inhibitorio contra hongos fitopatógenos. Ruiz-Bustos y col. (2009) reportan que el extracto metanólico de *Jatropha cuneata* (Sangregado) presentó actividad antifúngica contra *F. verticillioides* mostrando 42 % de inhibición del crecimiento radial. Por otra parte, otro estudio reporta que el extracto metanólico de *Bacharis glutinosa* presenta 57.8 % de inhibición del crecimiento radial (Rosas-Burgos y col., 2009), lo cual

concuera con los resultados obtenidos en este estudio. El efecto inhibitorio se puede deber a la presencia de metabolitos secundarios producidos (por ejemplo alcaloides y fenoles) por las plantas como defensa ante el ataque microbiano, en este caso hongos, nombrados por algunos autores como compuestos antifúngicos (Hernández-Lauzardo y col., 2007; Montes-Belmont y col., 2000).

A partir de los resultados obtenidos del porcentaje de crecimiento radial, se pudieron obtener datos sobre la velocidad de crecimiento de *F. verticillioides* en los diferentes tratamientos utilizados (Tabla 1). En donde se observa que el tratamiento en el que se obtuvo menor velocidad de crecimiento fue en SJ2000 (2010  $\mu\text{m/h}$ ), seguido por SJ1000 (2350  $\mu\text{m/h}$ ), correspondiendo esto con los resultados de los porcentajes de inhibición del crecimiento radial, ya que estos dos tratamientos inhibieron el crecimiento desde las 48 hasta las 264 h. Además se puede apreciar que la velocidad de crecimiento de los controles (4320  $\mu\text{m/h}$  en PDA y 4280  $\mu\text{m/h}$  en MeOH) es el doble que en el extracto. Lo cual nos indica que el extracto contiene compuestos con actividad antifúngica que pudieran afectar la fisiología del hongo provocando que éste crezca a menor velocidad.

En el caso de los tratamientos con extracto de *K. erecta*, se observa que la velocidad de crecimiento es mayor a los controles utilizados. Probablemente, debido a que los compuestos presentes en este extracto favorecen el crecimiento de *F. verticillioides*. Montes-Belmont y col (2000) reportan que el resultado de la interacción de extractos de plantas con hongos puede ser desde inhibitoria hasta provocar estimulación biológica, esto último es lo que posiblemente puede estar ocurriendo en este caso.

Tabla I. Velocidad de crecimiento de *F. verticillioides* en los medios con extractos de plantas y los controles.

Tratamientos	Velocidad de Crecimiento ( $\mu\text{m/h}$ )	R <sup>2</sup>
CPDA	4320	0.947
CMeOH	4280	0.964
C500	4600	0.968
C1000	4690	0.962
C2000	4430	0.982
SJ500	4270	0.966
<b>SJ1000</b>	<b>2350</b>	<b>0.974</b>
<b>SJ2000</b>	<b>2010</b>	<b>0.975</b>

CPDA = Control PDA, CMeOH = Control con metanol, C = *Krameria erecta*,

SJ = *Jacquinia macrocarpa*, 500 = 500 mg/L, 1000 = 1000 mg/L, 2000 = 2000 mg/L

Con los datos obtenidos con esta prueba, se llevó a cabo un análisis Probit para obtener la concentración media inhibitoria (CMI), y con ésta realizar las pruebas de germinación de esporas y producción de biomasa. Se decidió continuar solo con el extracto de *J. macrocarpa* (SJ) ya que de acuerdo a los resultados obtenidos éste fue el que presentó la mejor actividad contra *F. verticillioides*.

### **Germinación de esporas**

La concentración utilizada para realizar la prueba de germinación de esporas fue de 1882 mg/L, siendo esta la CMI, determinada en la sección anterior.

En la figura 7 se observa que el porcentaje de esporas germinadas en el medio con el extracto de *J. macrocarpa* es menor que en los controles. También se observa que a partir de las 14 h hay un incremento en la germinación. El mayor porcentaje de inhibición de germinación de esporas se presenta a las 12 h siendo este de 49 % (Anexo 4), dicha inhibición disminuye con el tiempo. Este comportamiento puede deberse a que el extracto solo afecta en las primeras fases de este proceso ya que probablemente el hongo desarrolle cierta resistencia o adaptación al compuesto presente en el medio. Se ha reportado que algunos hongos como *Aspergillus flavus* y *Fusarium verticillioides* posiblemente tengan mecanismos enzimáticos que impidan la acción de los metabolitos secundarios producidos por las plantas y en consecuencia pueden resistir a una gran variedad de ellos (Trione, 1981, citado por: Montes-Belmont y col., 2000).

El efecto de extractos de plantas en el proceso de germinación de esporas ya ha sido evaluado previamente. Sin embargo, la inhibición de la germinación de

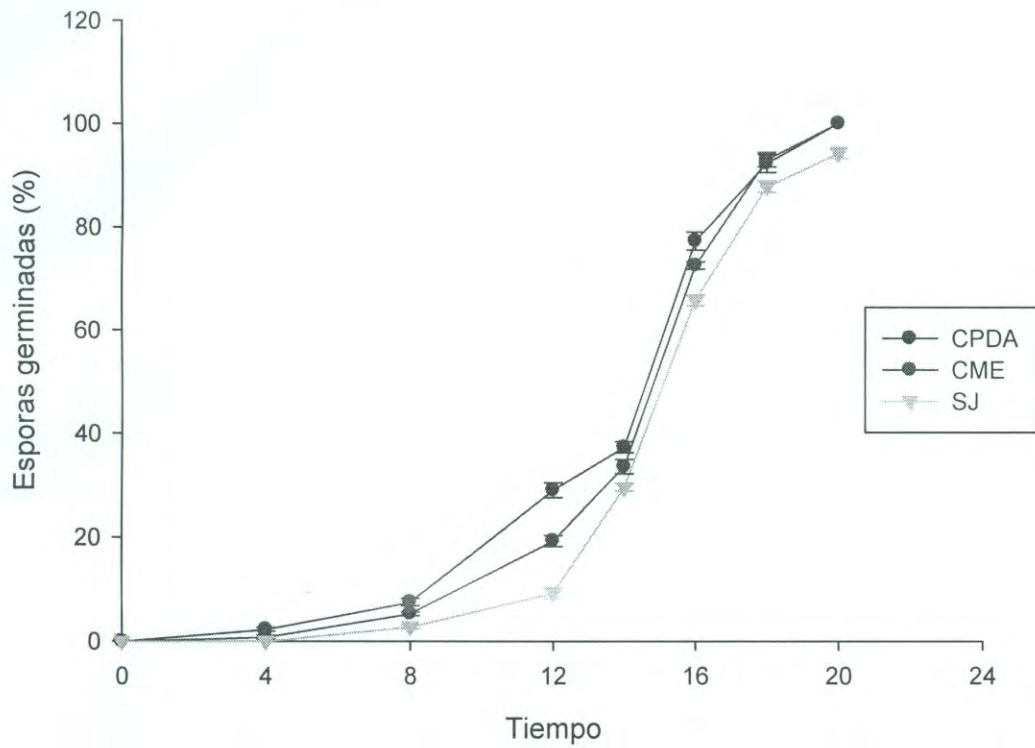


Figura 7. Porcentaje de esporas germinadas de *F. verticillioides* en medio con extracto de *J. macrocarpa* con respecto al control con metanol. CPDA = control PDA, CME = Control metanol, SJ = *J. macrocarpa*



esporas varía ampliamente entre plantas. Los extractos metanólicos de cuatro plantas recolectadas en la región de Hermosillo, Sonora, fueron evaluadas contra *F. verticillioides*. En este estudio se encontró que el extracto de *Ambrosia confertiflora* inhibió la germinación de esporas en un rango de 68-88%, siendo esta inhibición mayor a los resultados de nuestro estudio. Sin embargo, los extractos de *Baccharis glutinosa* y *Larrea tridentata* aplicados al 5.6%, 11.1%, 13.9% y 16.7% p/p, fueron los más efectivos, con un rango de inhibición del 88-100% (Suárez-Jiménez y col., 2007). Estos resultados son similares a los obtenidos por Abou-Jawdah (2004), en donde se encontró que el efecto sobre la germinación varió entre las plantas estudiadas. Ya que de 9 plantas evaluadas contra *F. oxysporum*, solo cuatro de ellas presentaron altos porcentajes de inhibición de germinación de esporas (90-100%). Hernández-Albíter y col., (2007) obtuvieron resultados similares al estudiar el efecto de 40 plantas sobre la germinación de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides*, reportando, que el efecto de los extractos sobre la germinación varía según la planta, incluso hay diferencias de acuerdo al lugar de recolección de las mismas (Hernández-Albíter y col., 2007). Esto se debe a que no todas las plantas poseen los mismos compuestos que afectan el crecimiento de los hongos, ni en las mismas concentraciones. Ya que se ha encontrado una gran variedad de compuestos con actividad antimicrobiana, entre los que destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos, teniendo mecanismos de acción variables (Cowan, 1999 citado por: Hernández-Lauzardo y col., 2007)

## **Producción de biomasa**

La prueba de producción de biomasa se llevó a cabo con la CMI (1882 mg/L) calculada del extracto metanólico de *J. macrocarpa*.

En la figura 8, se muestran los valores de la biomasa producida por *F. verticillioides*, en la cual se observa que en el medio con *J. macrocarpa* el micelio producido por el hongo es menor que en los controles. Lo que nos indica que el extracto también afecta el crecimiento apical del hongo. Resultados similares fueron reportados por Suárez-Jiménez y col. (2007) en donde los extractos de *B. glutinosa* y *L. trindetata* inhibieron la producción de micelio de *F. verticillioides*.

El efecto inhibitorio del extracto metanólico de *J. macrocarpa* se puede observar en la tabla 2, en donde se observa que la velocidad de crecimiento, la velocidad de germinación y la tasa específica de crecimiento de *F. verticillioides* son afectadas por la presencia del extracto. Lo cual nos indica que el extracto metanólico de *J. macrocarpa* presenta compuestos que son efectivos para controlar el desarrollo del hongo en las tres fases evaluadas.

## **Fracciones diferenciales**

### **Obtención de los extractos diferenciales**

Se obtuvieron tres fracciones diferenciales a partir del extracto metanólico de *J. macrocarpa*: la fracción de hexano (FH), fracción de acetato de etilo (FAE) y la fracción de butanol (FB). Se llevó a cabo la prueba de crecimiento radial con el extracto metanólico y cada una de las fracciones a tres concentraciones (100, 500 y 1000 mg/L).

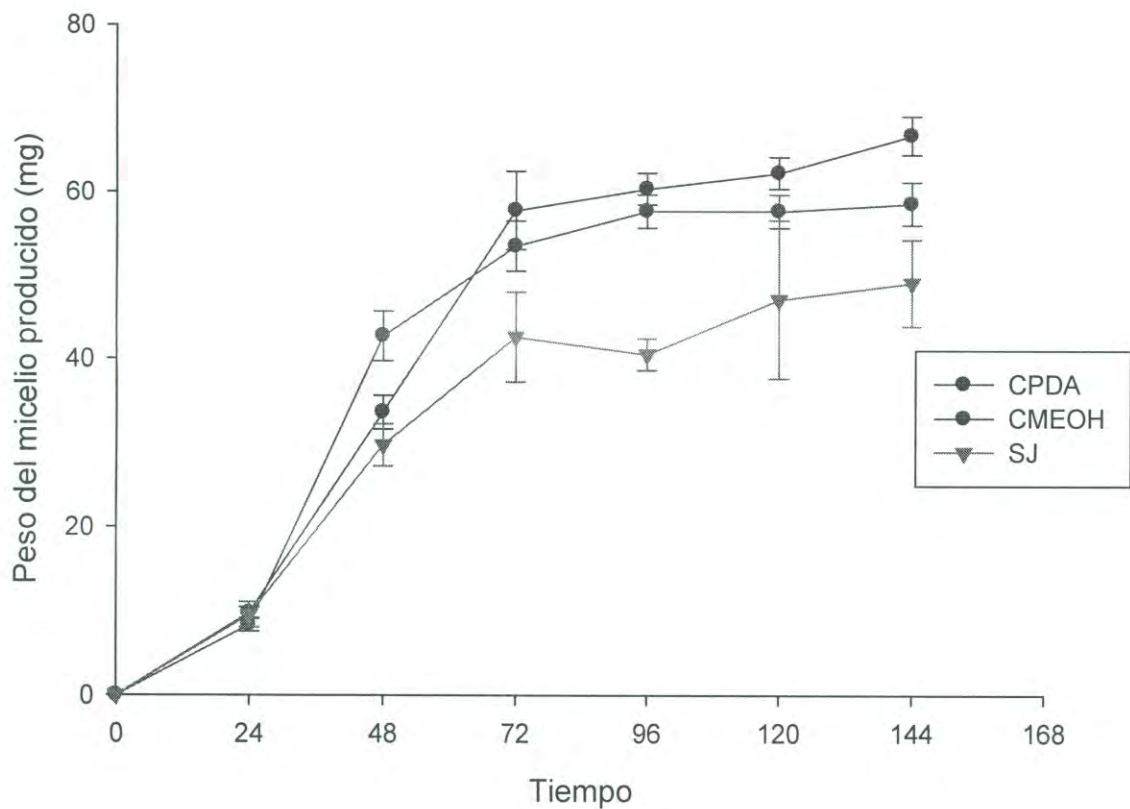


Figura 8. Peso del micelio producido por *F. verticillioides* en medios con extractos de *Jacquinia macrocarpa*. CPDA = Control con agar papa dextrosa, CMeOH = Control con metanol, SJ = *J. macrocarpa*.

Tabla II. Velocidad de crecimiento radial, velocidad de germinación de esporas y tasa de crecimiento de *F. verticillioides* en presencia del extracto metanólico de *J. macrocarpa*.

TRAT	Vel. Crecimiento ( $\mu\text{m/h}$ )	R <sup>2</sup>	Vel. Germinación	R <sup>2</sup>	Tasa esp. de crecimiento	R <sup>2</sup>
CPDA	184	0.9883	6.7807	0.9033	0.4456	0.8065
CMeOH	182	0.9778	6.9027	0.8739	0.3533	0.6823
SJ	66	0.9172	6.6067	0.8400	0.2956	0.8004

CPDA = Control PDA, CMeOH = Control con metanol, SJ = *Jacquinia macrocarpa*,

## Crecimiento radial

Se utilizaron los controles con los solventes usados para cada fracción, con excepción de la fracción butanol, ya que durante la prueba se observó que este inhibe completamente el crecimiento de *F. verticillioides*. Por lo anterior se decidió utilizar metanol como solvente para esta fracción, y por lo tanto, utilizar el control con metanol para obtener el porcentaje de inhibición de crecimiento radial.

Los resultados obtenidos de esta prueba indican que las fracciones FH y FAE en todas las concentraciones, no presentan inhibición contra el crecimiento de *F. verticillioides*, incluso se observó mayor crecimiento que en los controles (Figura 9 y 10). Esto puede deberse a que los compuestos extraídos en esta fracción favorecen el crecimiento del hongo. Esto ha sido reportado como efecto estimulante de los compuestos aleloquímicos ya que sus efectos no son solo inhibitorios sino que también pueden estimular algunas fases del crecimiento de los hongos, como la germinación de esporas (Montes-Belmont y García-Licona, 1997; citado por Velázquez-Gurrola, 2006).

La FB junto con el EM fueron los que presentaron un efecto negativo contra este hongo en todas las concentraciones. Se observa que a mayor concentración (1000 mg/L), se presenta mayor efecto inhibitorio (Figura 11 y Figura 12). A las 144 se presentó un porcentaje de inhibición del crecimiento radial de 62 % para FB a 1000 mg/L (FB3) y de 63 % para EM a 1000 mg/L (EM3), se observó también que no existe diferencia significativa entre estos dos extractos (48, 96, 120 y 144 h) (Anexo 5). En la figura 13 se puede observar que el comportamiento del hongo durante su crecimiento, en presencia de la FB y el EM, es similar en cada una de las concentraciones correspondientes. Esto nos indica que los compuestos que

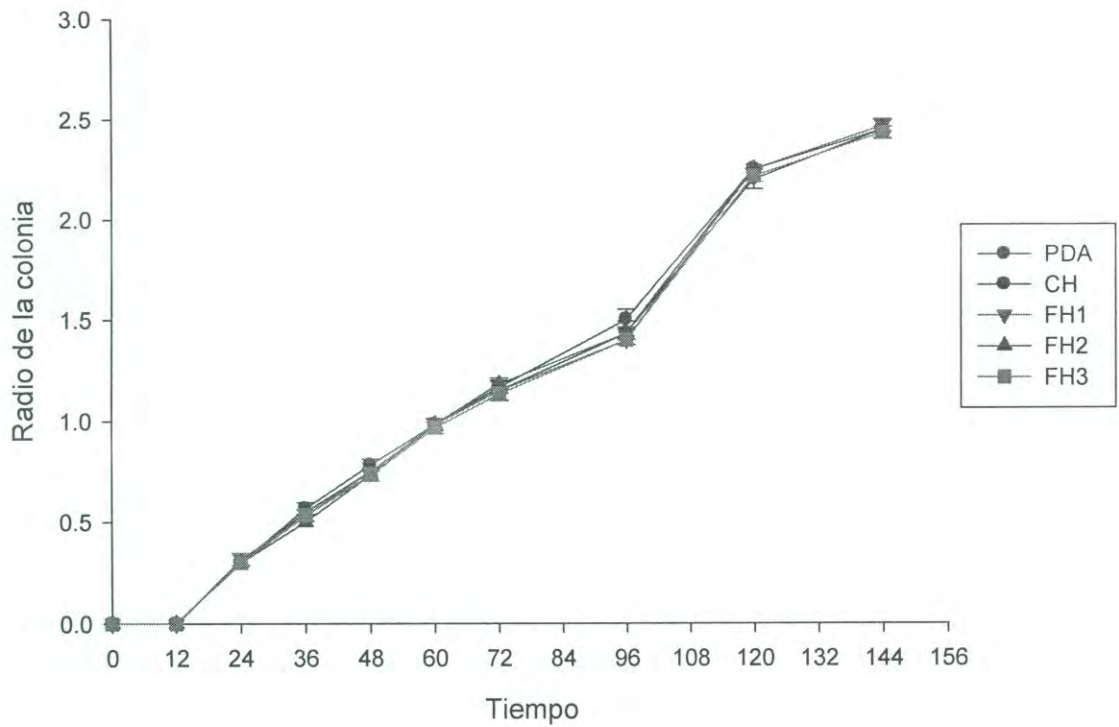


Figura 9. Crecimiento radial de *F. verticillioides* en medios con la fracción de hexano de *J. macrocarpa*. PDA = Control PDA, CH = Control hexano, FH1 = Fracción de hexano, 1 = 100 mg/L, 2 = 500mg/L, 3 = 1000 mg/L

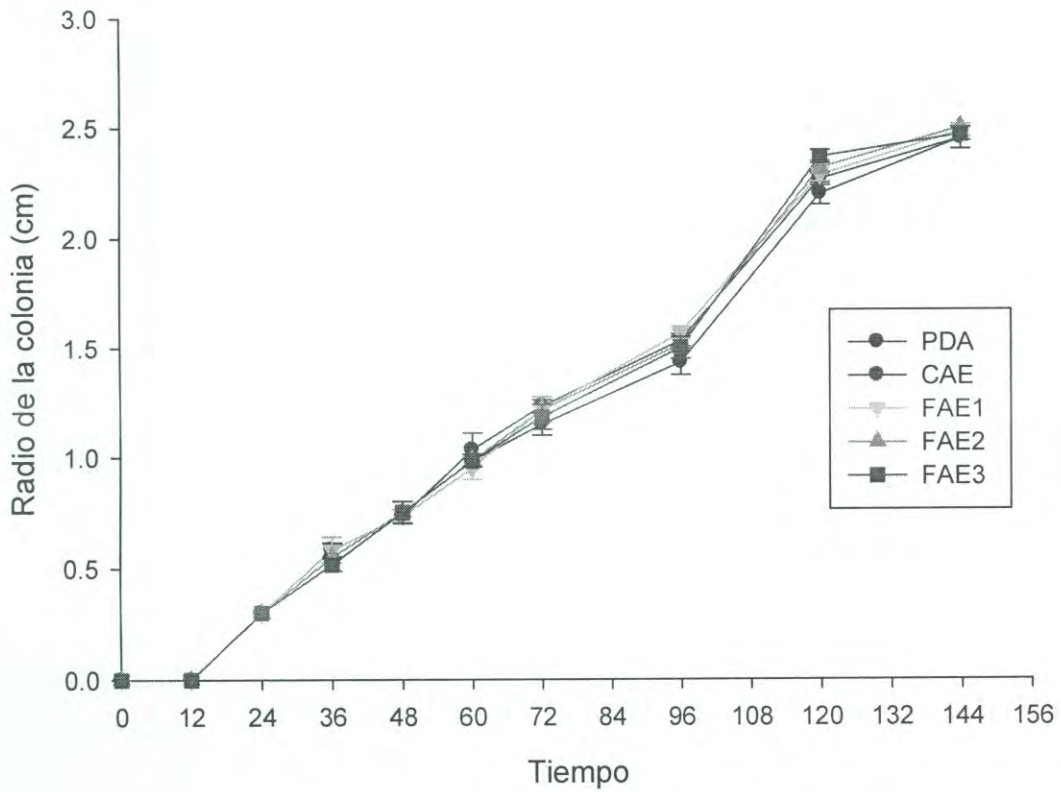


Figura 10. Crecimiento radial de *F. verticillioides* en medios con la fracción de acetato de etilo de *J. macrocarpa*. PDA = Control PDA, CAE = Control acetato de etilo, FAE= Fracción de acetato de etilo, 1 = 100 mg/L, 2 = 500mg/L, 3 = 1000 mg/L

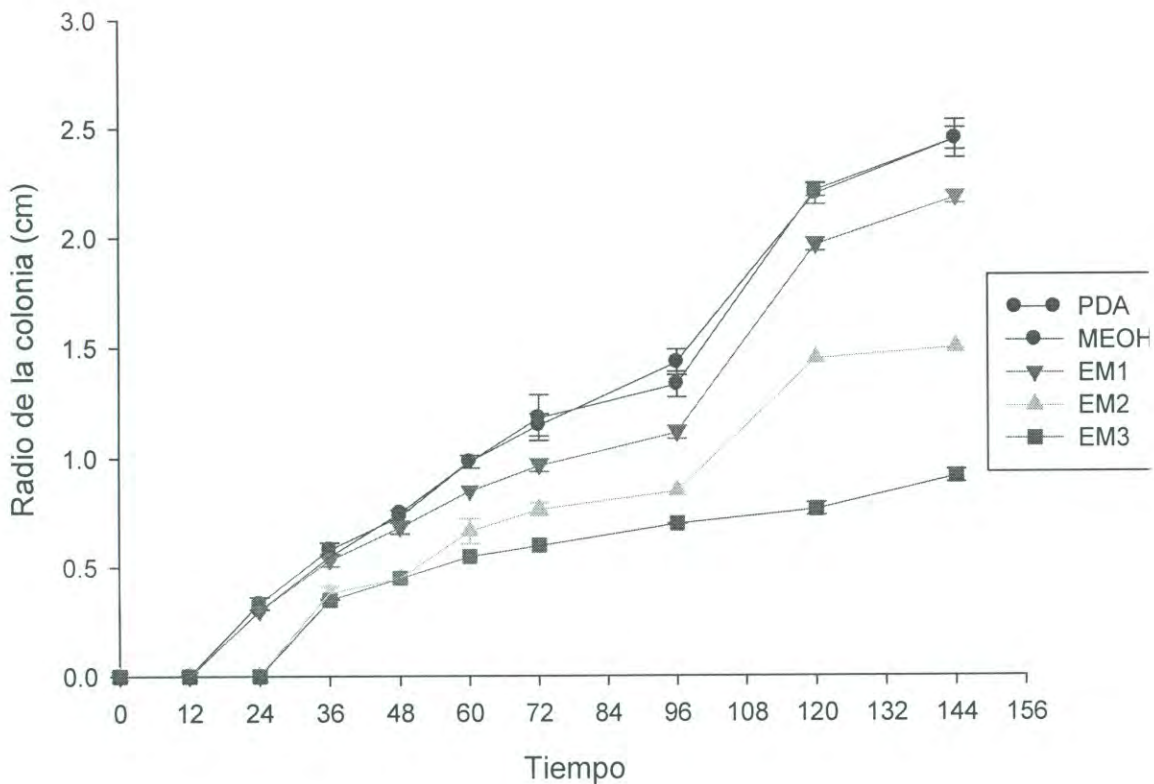


Figura 11. Crecimiento radial de *F. verticillioides* en medios con extracto metanólico de *J. macrocarpa*. PDA = Control PDA, MEOH = Control metanol, EM = Extracto metanólico, 1 = 100 mg/L, 2 = 500mg/L, 3 = 1000 mg/L



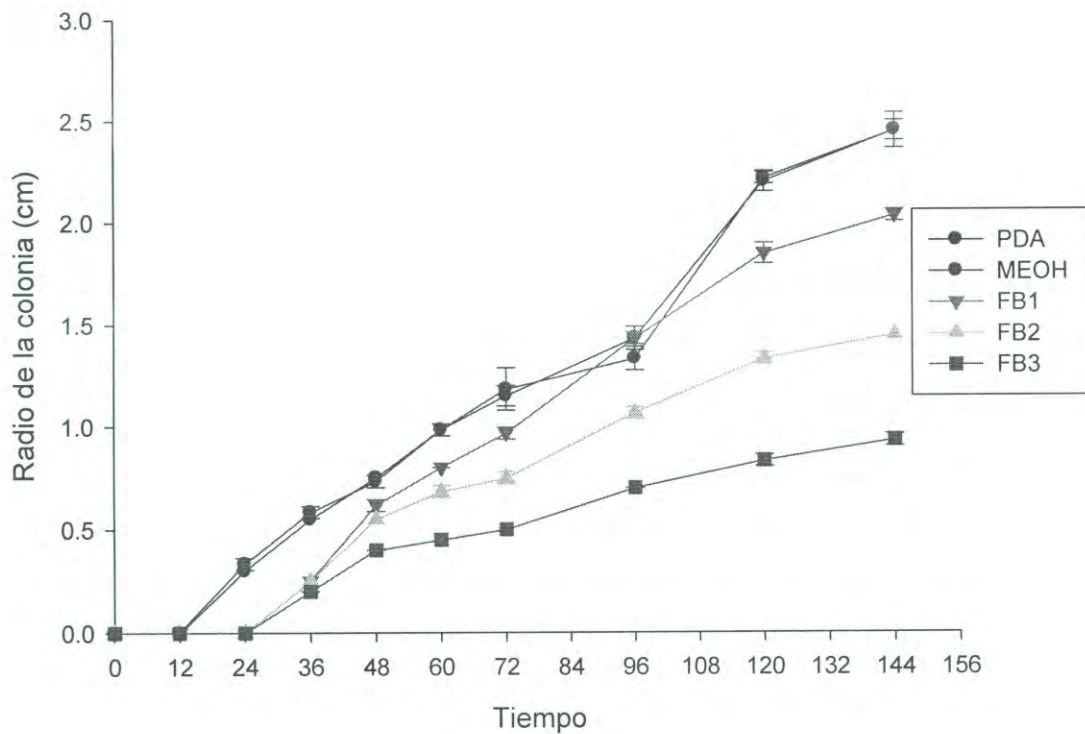


Figura 12. Crecimiento radial de *F. verticillioides* en medios con la fracción de butanol de *J. macrocarpa*. PDA = Control PDA, MEOH = Control metanol EM = Extracto metanólico, FB = Fracción de butanol, 1 = 100 mg/L, 2 = 500mg/L, 3 = 1000 mg/L

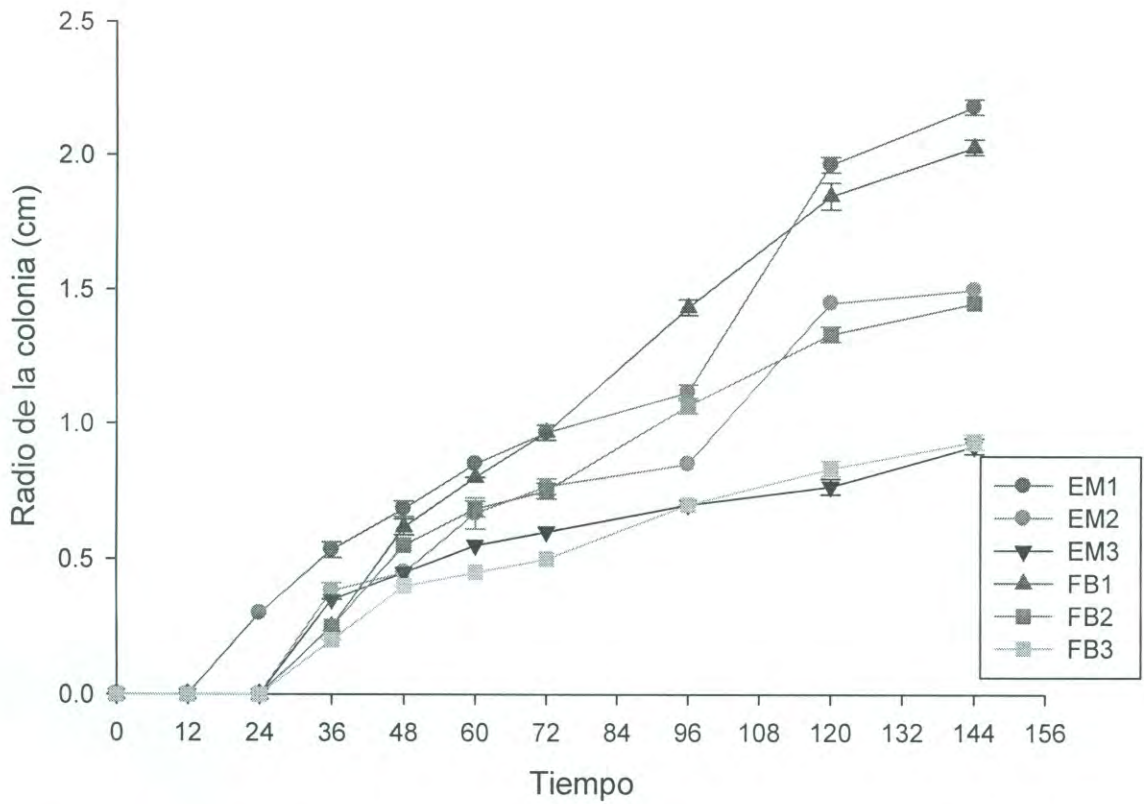


Figura13. Crecimiento radial de *F. verticillioides* en medios con extracto metanólico y fracción de butanol de *J. macrocarpa*. EM = Extracto metanólico, FB = Fracción de butanol, 1 = 100 mg/L, 2 = 500mg/L, 3 = 1000 mg/L

afectan el desarrollo del hongo se encuentran en la FB, ya que éste es afectado de la misma forma en presencia de los dos extractos. Por lo tanto, dichos compuestos pueden ser de naturaleza polar, como flavonoides, fenoles, alcaloides, entre otros. Los mecanismos de acción de estos compuestos varían y pueden ser desde inhibición enzimática por oxidación de compuestos, rompimiento de la membrana hasta efecto a nivel de ADN (Cowan, 1999 citado por Hernández-Lauzardo y col., 2007).

### **Germinación de esporas**

Con los resultados obtenidos de la prueba de crecimiento radial se realizó el análisis Probit, en este se obtuvo la CMI del EM (1408 mg/L) y de la FB (1883 mg/L). La prueba de germinación de esporas se llevó a cabo con estas concentraciones, incluyéndose los controles (PDA y MeOH).

Con los resultados de dicha prueba se obtuvo la cinética de germinación de esporas (Figura 14). En ella se puede observar que el EM y la FB retardan el proceso de germinación de esporas con respecto a los controles. También se observa que el extracto crudo y la fracción presentan el mismo comportamiento, es decir, retardan de manera similar la germinación. Lo que indica que los compuestos que afectan este proceso se encuentran en la FB. Esto concuerda con los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento radial.

A las 12 h se presenta la mayor inhibición con 40 % para el EM y 41 % para la FB (Anexo 6). También se observa que el porcentaje de inhibición disminuye

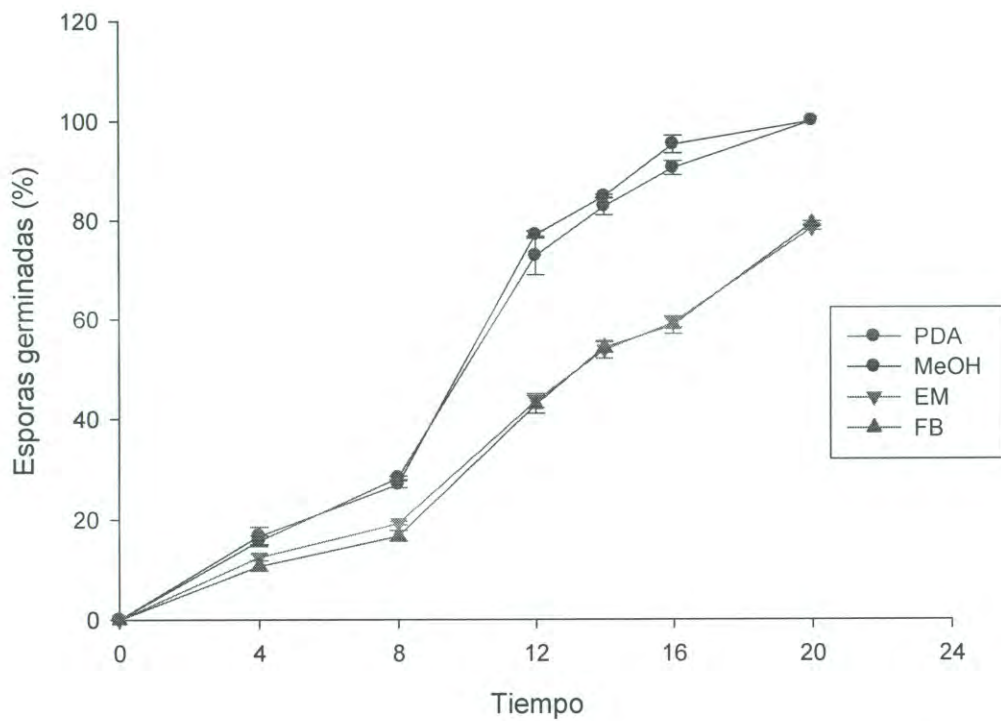


Figura 14. Cinética de germinación de esporas de *F. verticillioides* en presencia de extracto metanólico y fracción con butanol de *J. macrocarpa*. PDA = Control PDA, MEOH = Control metanol, EM = Extracto metanólico, FB = Fracción butanol

con el tiempo, este mismo comportamiento se presentó en la primera etapa, en donde de igual forma, la mayor inhibición se presenta a las 12 h.

### **Producción de biomasa**

Al igual que en la prueba de germinación de esporas, este análisis se realizó con la CMI resultado del análisis Probit, siendo estas 1408 mg/L para el EM y 1883 mg/L para la FB.

Los resultados de dicha prueba muestran que la producción de micelio de *F. verticillioides* en presencia de los extractos (EM y FB) es menor que el producido en los controles (Figura 15). Tanto el EM como la FB presentan diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) con respecto a los controles (excepto la FB a las 96 h, esto puede deberse a un error durante la manipulación de la muestra). Además, entre el extracto y la fracción solo hay diferencia significativa a las 96 h y 144 h. Lo que nos confirma que los compuestos activos están presentes en la FB, ya que estos resultados concuerdan con las pruebas anteriores.

En la tabla 3 se muestra el efecto que presenta el EM y la FB de *J. macrocarpa* (CMI, EM: 1408 mg/L y FB: 1882 mg/L) en los tres estados de desarrollo evaluados. En ella se observa que la velocidad de crecimiento y de germinación de esporas disminuyen, así como la tasa específica de crecimiento es menor con respecto a los controles, es decir, tanto el EM como la FB afectan estas tres etapas del desarrollo del hongo. Por lo que se puede decir que los compuestos activos pueden afectar en varias formas al hongo. Resultados similares fueron reportados por Suárez-Jiménez y col. (2007), en donde los

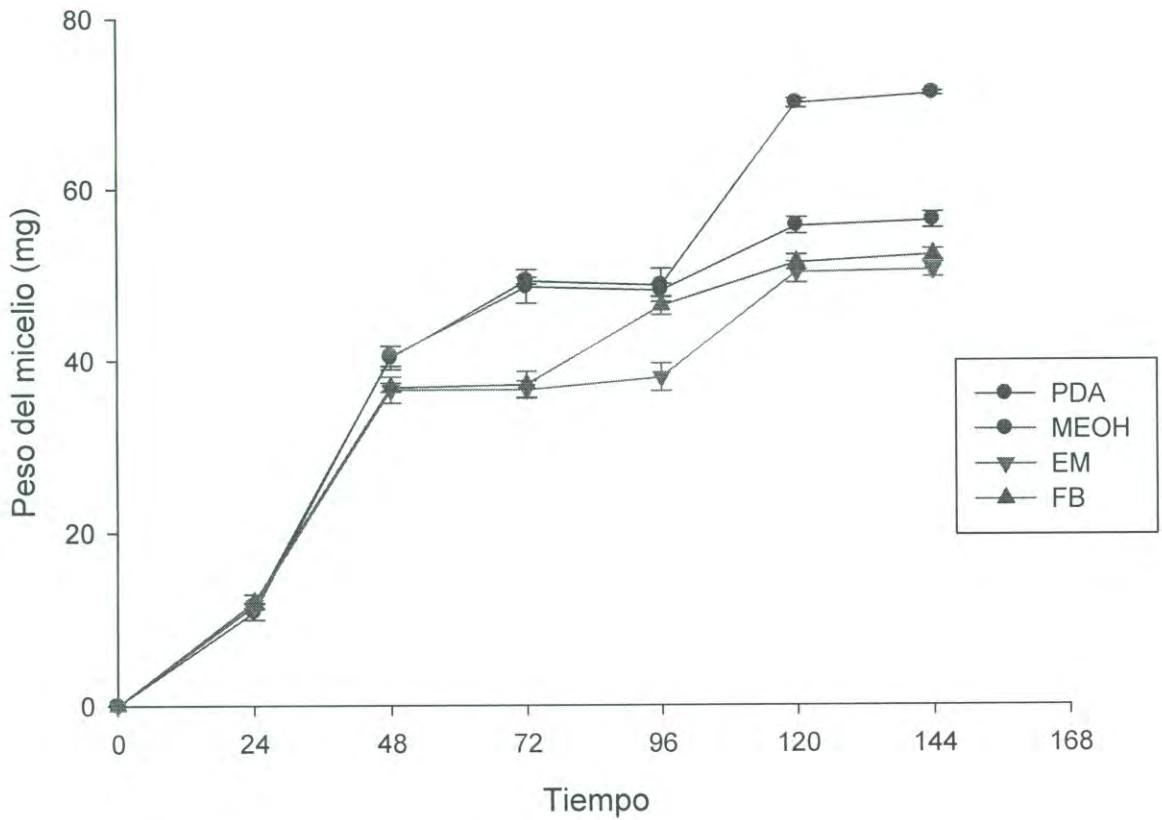


Figura 15. Peso del micelio producido por *F. verticillioides* en presencia del extracto metanólico y la fracción con butanol de *J. macrocarpa* y los controles. PDA = Control PDA, MEOH = Control metanol, EM = Extracto metanólico, FB = Fracción butanol

Tabla III. Velocidad de crecimiento radial, velocidad de germinación de esporas y tasa específica de crecimiento de *F. verticillioides* en presencia del extracto metanólico de *J. macrocarpa* y la fracción butanol.

TRAT	Vel. Crecimiento ( $\mu\text{m/h}$ )	R <sup>2</sup>	Vel. Germinación	R <sup>2</sup>	Tasa esp. de crecimiento	R <sup>2</sup>
CPDA	184	0.9883	5.9689	0.9054	0.4598	0.8865
CMeOH	182	0.9778	5.8684	0.9333	0.3238	0.7388
EM	68	0.8914	4.3143	0.9792	0.2817	0.7996
FB	50	0.8781	4.5122	0.9739	0.3021	0.8240

CPDA = Control PDA, CMeOH = Control metanol, EM = Extracto metanólico, FB = Fracción butanol

extractos de *Baccharis glutinosa* y *Larrea tridentata* fueron efectivos para controlar la germinación de esporas, el crecimiento radial y la producción de biomasa.

Los resultados obtenidos en esta segunda etapa indican que la FB es la que presentó actividad antifúngica contra *F. verticillioides* y que dicha actividad es similar al extracto crudo (EM). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Gómez y col. (2007), en donde se evaluó la actividad del extracto crudo (extracto metanólico) de *Fagara monophylla* y de la fracción obtenida con butanol. Ambos extractos presentaron actividad antifúngica contra *Aspergillus flavus*, *Penicillium digitatum*, y *Candida albicans*. En este mismo estudio, se llevaron a cabo pruebas fitoquímicas al extracto butanólico encontrando la presencia de alcaloides, los cuales son productos derivados de las plantas que han mostrado propiedades antifúngicas (Gómez y col., 2007). Se ha reportado que el mecanismo de acción de los alcaloides podría deberse a que éstos se intercalan con el ADN (Cowan, 1999 citado por Hernández-Lauzardo y col., 2007). Posiblemente este tipo de compuestos pueden ser los que están presentes en el extracto de *J. macrocarpa*. Sin embargo, se ha evidenciado que la actividad de los extractos de plantas varía entre cada especie de hongo, es decir, el efecto fungistático es selectivo el cual depende de la especie de planta y el patógeno (Hernández-Lauzardo y col., 2007). Resultados de algunos estudios muestran que una misma especie de hongo puede ser afectada por compuestos de diferente naturaleza. En este estudio los compuestos presentes en la fracción con butanol (naturaleza polar) fueron los que afectaron el desarrollo de *F. verticillioides*. En cambio, Rosas-Burgos y col. (2009) reportan que el efecto que presentó el extracto de *B. glutinosa* contra *F.*



*verticillioides* se debe a que los mayores compuestos antifúngicos son no polares. En otro estudio se aislaron e identificaron tres compuestos con actividad antifúngica contra *F. verticillioides*, los cuales fueron vanillin, 4-hidroxi-3-metoxicinnamaldehído y pinosresinol, obtenidos del extracto de la semilla de *Melia azedarach* (Carpinella y col., 2008). Con esta información podemos decir que existe una gran variedad de compuestos que presentan actividad antifúngica y que estos varían de acuerdo a la planta afectando en forma diferente a cada especie de hongo.

## CONCLUSIONES

El extracto de *Krameria erecta* no tiene actividad antifúngica contra *Fusarium verticillioides*.

*Jacquinia macrocarpa* presenta actividad fungistática, con una inhibición del crecimiento radial de 56.3% (2000 mg/L), 49% de inhibición de la germinación de esporas (1883 mg/L) y provoca una reducción en la producción de micelio.

De la fraccionación diferencial la fracción butanol fue la única que presentó efecto contra *F. verticillioides*, misma que ocasionó 66% de inhibición de crecimiento radial (a una concentración del extracto de 1,000mg/L) e inhibió la germinación de esporas en un 41% (1,883mg/L).

Se concluye que los compuestos activos que afectan el desarrollo de *F. verticillioides* se encuentran en la fracción extraída con butanol y pueden ser de naturaleza polar.

Res. T. 1,317

## RECOMENDACIONES

En base al estudio realizado se proponen las siguientes recomendaciones y sugerencias para futuras investigaciones:

1. Evaluar el efecto de la planta *Krameria erecta* en otros hongos fitopatógenos.
2. Determinar el efecto del extracto de *Jacquinia macrocarpa* en la producción de fumonisina B<sub>1</sub>.
3. Realizar las fraccionaciones necesarias a la fracción butanol para la identificación de los compuestos que afectan el crecimiento de *F. verticillioides*.
4. Evaluar el efecto del extracto de *J. macrocarpa in vivo* o *in situ* para determinar su efectividad en condiciones de campo.
5. Llevar a cabo un estudio para su posible uso práctico dentro de un sistema de control integral.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aba-Alkhail, A. A. 2005. Antifungal activity of some extracts against some plant pathogenic fungi. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8 (3): 413-417
- Abou-Jawdah, Y., Wardan, R., Sobh, H., y Salameh, A. 2004. Antifungal activities of extracts from selected Lebanese wild plants against plant pathogenic fungi. *Phytopathology Mediterranea*, 43: 377-386
- Anderson, B. S., Hunt, J. W., Phillips, B. M., Nicely, P.A., Vlaming, V. de, Connor, V., Richard, N. y Tjeerdema, R. S. 2003. Integral assessment of the impacts of agricultural drainwater in the Salinas River (California, USA): *Environmental Pollution*, 124:523-532
- Bush B. J., Carson, M. L. Cubeta, M. A., Hagler W. M., y Payne G. A. 2004. Infection and Fumonisin Production by *Fusarium verticillioides* in developing maize kernels. *Phytopathology*, 94(1):88-93
- Carpinella, M. C., Giorda, Laura. M., Ferrayoli, C. G., y Palacios, S. M. 2008. Antifungal effects of different organic extracts from *Melia azedarach* L. on phytopathogenic fungi and their isolate active components. *Food Chemistry*, 111(9):2506-2511
- Céspedes, C. L., Avila J. G., Martínez, A., Serrato, B., Calderón-Mugica, J. C., y Salgado-Garciglia, R. 2006. Antifungal and antibacterial activities of Mexican Tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 54: 3521-3527

- Chade, M. E., Mereles, B. E., Medvedeff, M. G., y Vedoya, M. C. 2003. Micosis subcutánea postraumática por *Fusarium solani*. Revista Iberoamericana de Micología, 20: 29-30
- Cortez-Rocha, M. O., Ramírez-Astudillo, W. R.; Sánchez-Mariñez, R. I.; Rosas-Burgos, E. C.; Wong-Corral, F. J.; Borboa-Flores, J.; Castellón-Campaña, L. G. y Tequida-Meneses, M. 2003. Fumonisin and fungal species in corn from Sonora, México. Bull. Environmental Contamination Toxicology, 70: 668–673
- Doko, M. B., Canet C., Brown N., Sydenham, E. W., Mpuchane, S., y Siame, B. A. 1996. Natural co-occurrence of fumonisins and zearalenone in cereals and cereal-based foods from Eastern and Southern Africa. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44(10): 3240-3243
- Desai, K., Sullards, M. C., Allegood, J., Wang, E., Schmelz, E. M., Hartl, M., Humpf, H. U., Liotta, D. C., Peng, Q., y Merrill, A. H. 2002. Fumonisin and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis. Biochim. Biophys. Acta—Mol. Cell Biology Lipids, 1585:188-192. Citado por: Bluhm B. H. y Woloshuk C. P. 2005. Amylopectin induces fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* during colonization of maize kernels. The American Phytopathological Society, 18(12): 1333-1339
- Desjardins, A. E., y Plattner, R. D. 2000. Fumonisin B1-Nonproducing strains of *Fusarium verticillioides* cause maize (*Zea mays*) ear infection and ear rot Journal Agriculture Food Chemistry, 48, 5773-5780
- Figueroa-Gómez, R. M.; Reynoso, M. M. y Reyes-Velázquez, W. P. 2007. Control del crecimiento y producción de fumonisinas por *Fusarium verticillioides* usando

butilhidroxianisol bajo diferentes condiciones de actividad de agua. *Scientia-CUCBA*, 9(1):23—30.

Fokialakis, N., Cantrell, C. L., Duke, S. O., Skaltsounis, A. L., y Wedge, D. E., 2006. Antifungal activity of thiophenes from *Echinops ritro*. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 54: 1651-1655

Gallardo-Reyes, E. D.; Ibarra-Moreno, G. M.; Sánchez-Mariñez, R. I.; Cuamea-Cruz, G.; Molina-Gil D.; Parra-Vergara, N. V.; Rosas-Burgos, E. C. y Cortez-Rocha, M. O. 2006. Microbiota del Maíz (*Zea Mays L.*) Recién Cosechado y Producción de Fumonisina B1 por Cepas de *Fusarium verticilliodes* (Sacc.) Nirenb. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1): 27-34

Gelderblom, W.C.A., Jaskiewicz, K., Marasas, W.F.O., Thiel, P. G., Horak, M. J., Vleggaar, R. y Kriek, N.P.J. 1988 Fumonisin—novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied Environmental Microbiology*, 54: 806—1811

Gelderblom, W.C.A., Kriek, N.P.J., Marasas, W.F.O. y Thiel, P. G. 1991. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1, in rats. *Carcinogenesis*, 12: 1247—1251. Gómez, Y., Gil, K., González, E. y Farías L. M. 2007. Actividad antifúngica de extractos del árbol *Fagara monophylla* (Rutaceae) en Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 55(3-4):767-775

Gómez, Y., Gil, K., González, E., y Farías L. M. 2007. Actividad antifúngica de extractos del árbol *Fagara monophylla* (Rutaceae) en Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 55(3-4):767-775

- Guerrero-Rodríguez, E, Solís-Gaona, S., Hernández-Castillo, F. D., Flore-Olivas, A., Sandoval-López, V., y Jasso-Cantú, D. 2007. Actividad biológica in vitro de extractos de *Fluorensia cernua* D. C. en patógenos de postcosecha: *Alternaria alternata* (fr.:Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. Revista Mexicana de Fitopatología, 25 (1): 48-53.
- Hernández-Albíter, R. C., Barrera-Necha, L. L., Bautista-Baños, S. y Bravo-Luna, L. 2007. Antifungal potential of crude plant extracts on conidial germination of two isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. y Sacc. Revista Mexicana de Fitopatología, 25(2):180-185
- Hernández-Delgado, S, Reyes-López, M. Á., García-Olivares, J. G., y Mayek-Pérez, N. 2007. Incidencia de Hongos Potencialmente Toxígenos en Maíz (*Zea mays* L.) almacenado y Cultivado en el Norte de Tamaulipas, México. Revista Mexicana de Fitopatología, 25 (2): 127-133
- Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S. y Velazquez-Del Valle, M. G. 2007. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. Revista Fitotecnia Mexicana. 30(2):119-123
- Kitagawa, T., Sakamoto, Y., Furumi, K., y Ogura, H. 1989. Novel enzyme immunoassays for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. cucumerinum and for general detection of various *Fusarium* species. Phytopathology, 79(2):162-165. Citado por: Sanabria A. N; Guadarrama A., y Romero, H. 2002. Caracterización de especies de *Fusarium* mediante patrones electroforéticos de proteínas. Revista Facultad Agronomía (Maracay), 28:161-173

- Leck, A. K., Thomas, P. A., Hagan, M., Kaliyamurthy, J., Ackuaku, E., John, M., Newman, M. J., Codjoe, F. S., Opintan, J. A., Kalavathy, C. M., Jesudasan, C. A. N., y Johnson, G. J. 2002. Aetiology of suppurative corneal ulcers in Ghana and South India, and epidemiology of fungal keratitis. *British Journal of Ophthalmology*, 86:1211-1215.
- Leslie, J. F., y Summerell, B. A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Ed. Blackwell Publishing. 1<sup>st</sup> edition. USA. páginas
- Marasas, W. F. O., Nelson, P. E., y Toussoun, T. A. 1984. *Toxigenic Fusarium species: identity and mycotoxicology*. The Pennsylvania State University Press. University Park, Pennsylvania, USA. 328 p.
- Marasas, W. F. O. Fumonisin: worldwide occurrence and impact. In *Fumonisin in Food*; Jackson, L. S., DeVries, J.W., Bullerman, L. B., Eds.; Plenum Press: New York, 1996; pp 1-17.
- Marasas, W. F. O, Riley, R. T., Hendricks, K. A., Stevens, V. L., Sadler, T. W., Waes, J. G., Missmer, S. A., Cabrera, J., Torres, O., Gelderblom, W. C. A., Allegood, J., Martínez, C., Maddox, J., Miller, J. D. Starr, L., Sullards, M. C., Roman, A. V., Voss, K. A., Wang, E., y Merrill, Jr. A. H., 2004. Fumonisin Disrupts Sphingolipid Metabolism, Folate Transport, and Neural Tube Development in Embryo Culture and in vivo: A Potential Risk Factor for Human Neural Tube Defects among Populations Consuming Fumonisin-Contaminated Maize. *American Society for Nutritional Sciences*, 711-716
- Márquez-Vizcaino, R. L., De la Rosa-Torres, C. y Mercado-Pérez, A., 2007. Actividad antifúngica del extracto total en etanol de las hojas frescas de *Pedilanthus tithymaloides* L Poit (Ultimorrial). *Scientia et Technica*, 33: 155-159



- Meazza, G., Dayan F. E., y Wedge, D. E. 2003. Activity of Quinones on *Colletotrichum* Species. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 51: 3824-3828
- Mendoza-Elos, M., Andrio-Enriquez, E., López-Bénitez, A., Rodríguez-Guerra, R., Latournerie-Moreno, L. y Rodriguez-Herrera S. A. Tasa de infección de la pudrición del tallo en maíz causada por *Fusarium moniliforme*. *Agronomía Mesoamericana*, 17 (1): 19-24
- Merrill, A. H., Jr., Sullards, M. C., Wang, E., Voss, K. A. y Riley, R. T. 2001. Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environmental Health Perspective* 109: 283–289.
- Merrill Jr. A. H., Van Echten G., Wang, E. y Sandhoff K. 1993. Fumonisin B1 Inhibits Sphingosine (Sphinganine) N-Acyltransferase and the Novo Sphingolipid Biosynthesis in Cultured Neurons *in situ*. *The Journal of Biological Chemistry*, 268 (36):27299-27306.
- Montes-Belmont, R., Cruz-Cruz, V., Martínez-Martínez G., Sandoval-García, G., García-Licona, R., Zilch-Domínguez, S., Bravo-Luna, L., Bermúdez-Torres, K., Flores-Moctezuma, H. E. y Carvajal-Moreno, M. 2000. Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo en investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 18(2):125-131
- Nelson, P. E.; Desjardins, A. E.; y Plattner, R. D. 1993. Fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. *Annual Review Phytopathology*. 31, 233-252.
- Pitt, J. I., y Hocking A. D. 1999. *Fungi and Food Spoilage*. 2<sup>nd</sup> ed. Aspen Publishers. Inc. Gaithersburg, M. D. páginas

- Plascencia-Jatomea, M., Viniegra, G., Olayo, R., Castillo-Ortega, M. M., y Shirai, K. 2003. Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. *Macromolecular Bioscience*, 3: 582-586.
- Ramírez-Chávez, E., Lucas-Valdez, L., Virgen-Calleros, G., y Molina-Torres J. 2000. Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotium*. *Agrociencia*, 34 (2): 207-215.
- Ramírez-Legarreta, M. R. y Jacobo-Cuéllar, J. L. 2002. Impacto ambiental del uso de plaguicidas en huertos de manzano del noroeste de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20:169-173
- Rani, S. A., y Murty, S. U. 2006. Antifungal potential of flower head extract of *Spilanthes acmella* Linn. *African Journal of Biomedical Research*, (9): 67 -69
- Rheeder, J. P., Marasas, W. F. O., y Vismer, H. F. 2002. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied Environmental Microbiology*, 68:2101-2105
- Robledo, M. L., Marin, S. y Ramos, A. J. 2001. Contaminación natural con micotoxinas en maíz forrajero y granos de café verde en el Estado de Nayarit (México). *Revista Iberoamericana de Micología*, 18: 141-144
- Sanabria de A, N.; Guadarrama, A., y Romero, H. 2002. Caracterización de especies de *Fusarium* mediante patrones electroforéticos de proteínas. *Revista de la Facultad de Agronomía, (Maracay)* 28:161-173.2002
- Sánchez-Rangel, D., Sanjuan-Badillo, A., y Plasencia, J.,. 2005. Fumonisin Production by *Fusarium verticillioides* Strains Isolated from Maize in Mexico and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53: 8565-8571

- Suárez-Jimenez, G. M., Cortez-Rocha, M. O., Rosas-Burgos, E. C., Burgos-Hernández, A., Plasencia-Jatomea, M. y Cinco-Moroyoqui, F. J. 2007. Antifungal activity of plant methanolic extracts against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. and fumonisin B1 production. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25( 2): 134-142.
- Sydenham, E. W., Thiel, P. G., Marasas, W.F.O., Shephard, G. S., Van Schalkwyk, D. J., y Koch, K. R. 1990. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, southern Africa. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 38: 1900–1903
- Tequida-Meneses, M., Cortez-Rocha, M., Rosas-Burgos, E. C., López-Sandoval, S., y Corrales-Maldonado, C. 2002. Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 19: 84-88.
- Velázquez-Gurrola, A., Angulo-Escalante, J. S., García-Estrada, R. S., Carrillo-Fasio, J. A. y Guerrero-Ontiveros, C. A. 2006. Extractos de semilla de *Moringa oleifera* Lam. para el control de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:fr) Vuill. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24:2: 81-87

## ANEXOS

## ANEXO 1

### Determinación de fumonisinas

Se seleccionó el extracto más efectivo contra el crecimiento del hongo y se estudiaron sus posibles efectos en la producción de fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) por *F. verticillioides* en maíz y utilizando la CMI.

Para la producción de FB<sub>1</sub> se colocaron 50 g de maíz molido en matraces Erlenmeyer de 500 ml. Se ajustó la humedad a 40% y se esterilizó dos días consecutivos en autoclave por 15 min, a 121°C. Al maíz esterilizado se le agregó el extracto seleccionado a la CMI, a un control se le agregó metanol y otro fue tratado con agua. Cada matraz fue inoculado con  $1 \times 10^7$  esporas de *F. verticillioides* y fueron incubados por 30 días a 25° C con ciclos de 12 h de luz/oscuridad. Se utilizaron dos réplicas por cada tratamiento (Castella y col., 1999 en Suárez-Jiménez y col., 2007).

Completado el periodo de incubación, los cultivos fueron secados a 50° C durante una noche. La FB<sub>1</sub> fue extraída con 150 mL de acetonitrilo:agua (1:1 v/v) con agitación mecánica durante 30 min y filtrada a través de papel filtro Whatman No. 4.

La determinación de FB<sub>1</sub> se realizó utilizando cromatografía líquida de alta presión. Primeramente se purificaron 2 ml del extracto obtenido diluidos con 8 ml de acetonitrilo:agua (1:1 v/v) utilizando una columna de intercambio iónico (SAX) Bond Elut (3ml de capacidad con 500 mg de adsorbente C<sub>18</sub>), la cual se acondiciono previamente con 5 mL de metanol seguido de 5 ml de metanol:agua (3:1). Posteriormente se vertió el extracto a la columna. La columna se lavo con 8

mL de metanol:agua (3:1) seguido de 3 mL de metanol. Las fumonisinas se eluyeron con 15 mL de metanol:ácido acético 1% a un flujo no mayor de 1 ml/min. Se colectó el eluato y se evaporó hasta sequedad (Shepard y col., 1990 citado por Suárez-Jimenez y col., 2007).

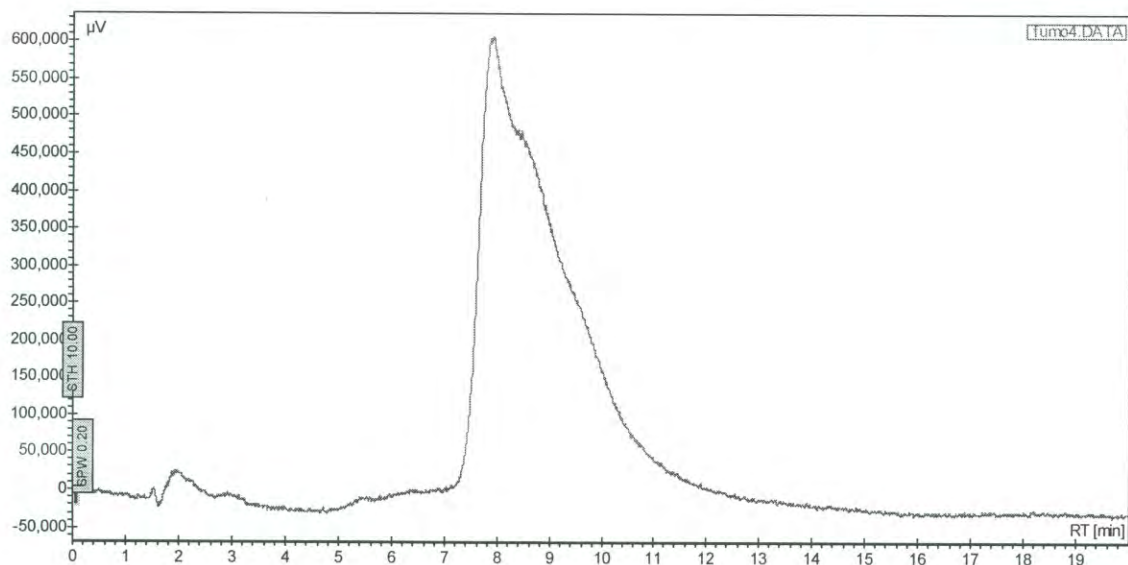
El eluato evaporado se disolvió con acetonitrilo-agua (1:1). Para el análisis cromatográfico se transfirieron 50  $\mu$ L de este vial y se le añadieron 200  $\mu$ L de la solución  $\sigma$ -phtaldehido (OPA). Se agitó por 20 seg y se inyectó en el sistema cromatográfico (Bomba Varian modelo 9012 con flujo de 1.5 ml/min, equipado con reservorio cerrado de inyección de 20  $\mu$ L, columna analítica de acero inoxidable de 150 x 4.6 mm, fase reversa C<sub>18</sub>).

Se utilizo como fase móvil una solución de metanol-fosfato de sodio dihidrogenado 0.1 M (75:25), ajustado el pH a 3.35 con ácido-orto-fosfórico. El derivado fluorescente se detectó utilizando un detector de fluorescencia (Varian modelo 9070) a una longitud de onda de excitación de 335 nm y 440 nm de emisión.

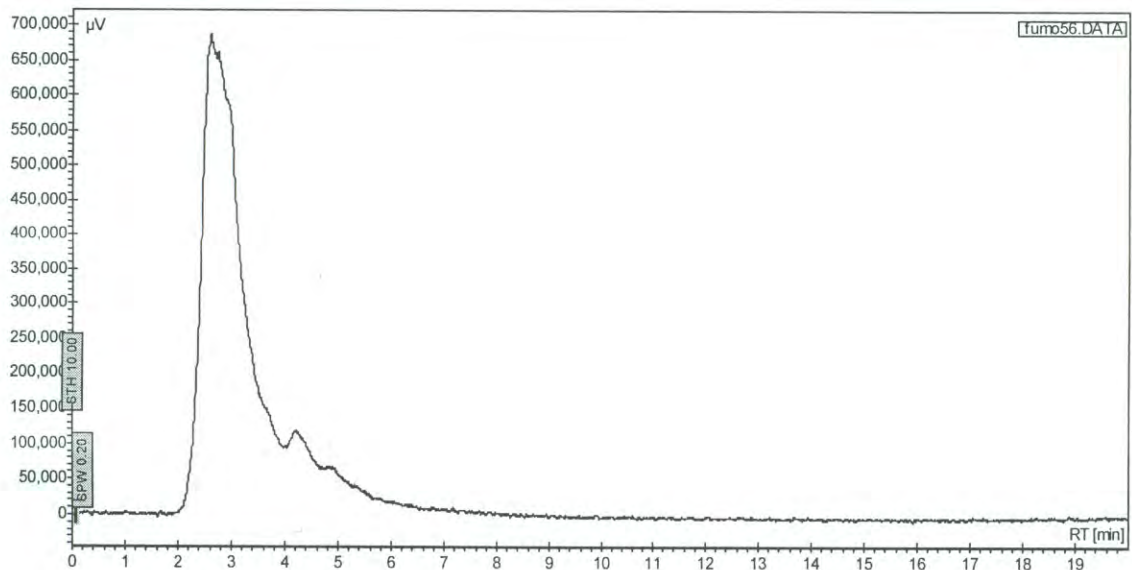
La cuantificación de FB<sub>1</sub> se realizó por medición de las áreas de los picos y por comparación de la curva estándar obtenida a partir de una solución estándar de FB<sub>1</sub>. La curva de calibración se preparó a partir de una solución patrón e FB<sub>1</sub> preparada disolviendo 1 mg de estándar de FB<sub>1</sub> en 1 mL de acetonitrilo:agua (1:1 v/v). De la solución patrón se tomaron 5, 15, 25, 35 y 45  $\mu$ L y se diluyeron con OPA hasta 250  $\mu$ L para su derivatización. Después 5  $\mu$ L de cada una de las concentraciones conocidas (0.02, 0.06, 0.1, 0.14 y 0.18 mg/ml) se inyectaron al sistema HPLC obteniéndose los datos para construir la curva de calibración (Thakur y Smith, 1996 citados por: Gallardo-Reyes y col., 2006).

No se obtuvieron resultados de esta determinación ya que en ninguno de los tratamientos se detectó la presencia de fumonisina B<sub>1</sub>. Los cromatogramas no presentan ningún pico en el tiempo en el que aparece el pico para FB<sub>1</sub> de acuerdo a la curva estándar. Esto probablemente se daba a que la cepa utilizada no tenga la capacidad de producir la micotoxina. Lo cual pudo deberse a la gran manipulación que esta cepa tiene en el laboratorio y que solo es mantenida en medios de cultivo enriquecidos y no en su sustrato natural (maíz). Por lo que se recomienda utilizar maíz como medio de cultivo para *F. verticillioides* y que estos cultivos se renueven de forma periódica.

## ANEXO 2

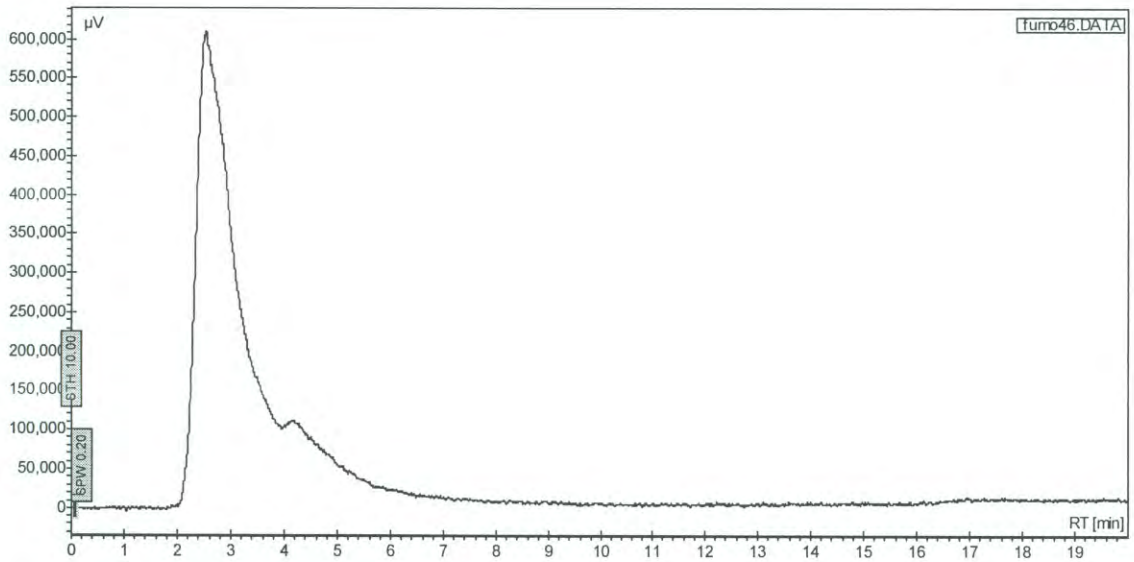


Cromatograma de la solución estándar de FB<sub>1</sub>

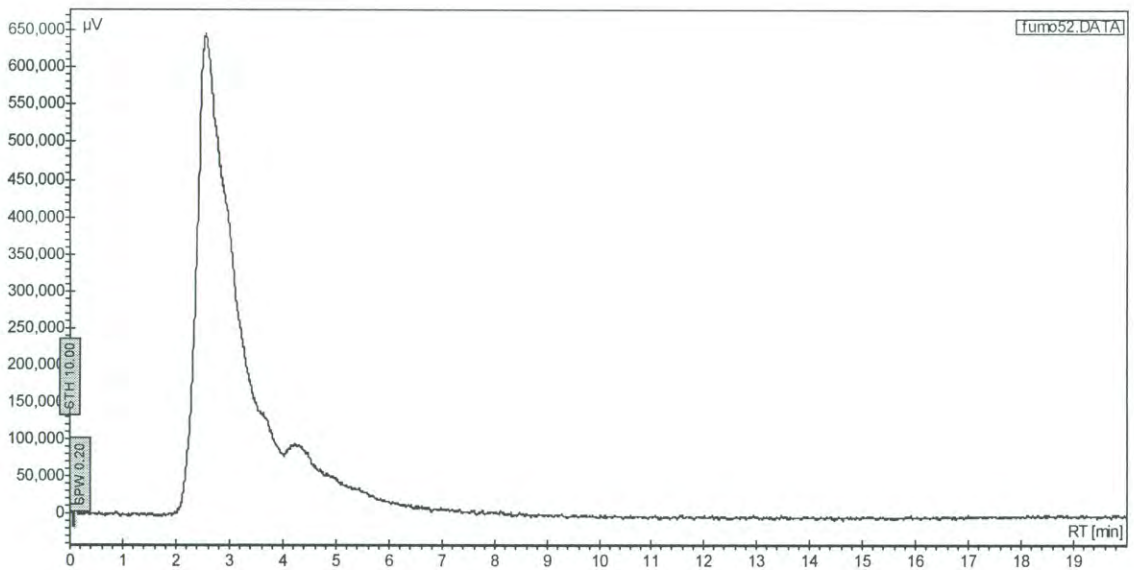


Cromatograma obtenido a partir de la muestra control MeOH:agua (1:9)

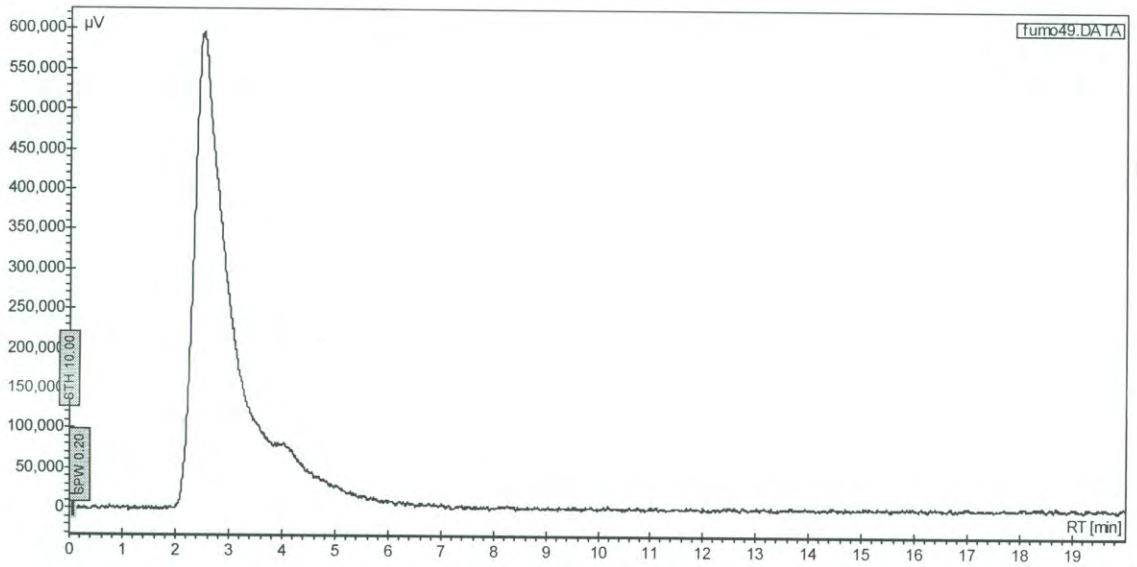




Cromatograma de la muestra control MeOH:agua (4:6)



Cromatograma de la muestra con el extracto metanólico de *J. macrocarpa*



Cromatograma de la muestra con la FB de *J. macrocarpa*

### ANEXO 3

Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de *F. verticillioides* en medio con extractos en relación al control con metanol.

Tiempo (h)	C500	C1000	C2000	SJ500	SJ1000	SJ2000
24	17.9±6.2 <sup>b</sup>	21.4±6.2 <sup>b</sup>	25.0±0 <sup>b</sup>	0.0±0 <sup>a</sup>	0.0±0 <sup>a</sup>	0.0±0 <sup>a</sup>
48	5.9±5.9 <sup>a</sup>	5.9±5.9 <sup>a</sup>	23.5±0 <sup>b</sup>	0.0±0 <sup>a</sup>	2.0±3.4 <sup>a</sup>	9.8±6.8 <sup>a</sup>
120	8.4±9.5 <sup>a</sup>	5.3±7.8 <sup>a</sup>	15.1±11.6 <sup>ab</sup>	2.0±2.1 <sup>a</sup>	29.4±2.5 <sup>b</sup>	<b>56.3±1.5<sup>c</sup></b>
144	2.0±1.7 <sup>a</sup>	5.5±9.6 <sup>ab</sup>	16.5±6.8 <sup>bc</sup>	0.0±0 <sup>a</sup>	29.3±3.4 <sup>c</sup>	51.9±3.4 <sup>d</sup>
168	0.0±0 <sup>a</sup>	0.4±0.8 <sup>a</sup>	8.6±5.0 <sup>a</sup>	0.0±0 <sup>a</sup>	31.6±8.0 <sup>b</sup>	53.9±1.1 <sup>c</sup>
192	0.0±0 <sup>a</sup>	0.0±0 <sup>a</sup>	7.0±4.6 <sup>a</sup>	0.0±0 <sup>a</sup>	29.8±6.3 <sup>b</sup>	52.0±3.7 <sup>c</sup>
216	0.0±0 <sup>a</sup>	0.0±0 <sup>a</sup>	5.2±0.9 <sup>a</sup>	0.0±0 <sup>a</sup>	33.0±4.0 <sup>b</sup>	46.1±5.5 <sup>c</sup>
240	0.5±0.8 <sup>a</sup>	0.0±0 <sup>a</sup>	5.4±1.4 <sup>a</sup>	0.0±0 <sup>a</sup>	35.1±3.6 <sup>b</sup>	45.9±4.1 <sup>c</sup>
264	0.0±0 <sup>a</sup>	0.0±0 <sup>a</sup>	0.0±0 <sup>a</sup>	0.0±0 <sup>a</sup>	<b>36.3±1.3<sup>b</sup></b>	45.8±5.1 <sup>c</sup>

C = *Krameria erecta*, SJ = *Jacquinia macrocarpa*, 500 = 500 mg/L, 1000 = 1000 mg/L, 2000 = 2000 mg/L. Valores expresados como el promedio de tres réplicas. Diferentes superíndices indican diferentes grupos estadísticos. Prueba de Tukey  $p < 0.05$ .

## ANEXO 4

Porcentaje de inhibición de germinación de esporas de *F. verticillioides* en medio con extracto de *J. macrocarpa* con respecto al control con metanol.

Tiempo (h)	% Inhibición de germinación de esporas
4	100±0
8	38±1.1
<b>12</b>	<b>49±1.8</b>
14	12±0.7
16	9±1.8
18	6±1.1
20	6±1.1

Valores expresados como la media de dos réplicas

## ANEXO 5

Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *F. verticillioides* en medio con extracto metanólico y la fracción con butanol de *J. macrocarpa*.

Tiempo	FB1	FB2	FB3	EM1	EM2	EM3
24	100±0	100±0	100±0	10±0	100±0	100±0
36	57±0 <sup>c</sup>	57±0 <sup>c</sup>	66±0 <sup>c</sup>	9±4.9 <sup>a</sup>	34±4.9 <sup>b</sup>	40±0 <sup>b</sup>
48	16±3.9 <sup>b</sup>	25±0 <sup>c</sup>	45±0 <sup>d</sup>	7±3.9 <sup>a</sup>	39±0 <sup>d</sup>	39±0 <sup>d</sup>
60	19±0 <sup>c</sup>	31±2.9 <sup>d</sup>	54±0 <sup>f</sup>	14±0 <sup>bc</sup>	32±5.9 <sup>d</sup>	44±0 <sup>e</sup>
72	18±2.4 <sup>b</sup>	30±2.4 <sup>c</sup>	58±0 <sup>e</sup>	18±2.4 <sup>b</sup>	35±2.4 <sup>c</sup>	49±0 <sup>d</sup>
96	0±0 <sup>a</sup>	20±2.2 <sup>d</sup>	48±0 <sup>f</sup>	16±2.2 <sup>d</sup>	36±0 <sup>e</sup>	48±0 <sup>f</sup>
120	17±2.3 <sup>c</sup>	40±1.3 <sup>e</sup>	62±1.3 <sup>f</sup>	11±1.3 <sup>b</sup>	35±0 <sup>d</sup>	65±1.3 <sup>f</sup>
144	17±1.2 <sup>c</sup>	41±0 <sup>d</sup>	62±1.2 <sup>e</sup>	11±1.2 <sup>b</sup>	39±0 <sup>d</sup>	63±1.2 <sup>e</sup>

FB: Fracción de butanol, EM: Extracto metanólico, 1: 100 mg/L, 2: 500 mg/L, 3: 1000 mg/L. Valores expresados como el promedio de tres replicas. Diferentes superíndices indican diferentes grupos estadísticos. Prueba de Tukey  $p < 0.05$

## ANEXO 6

Porcentaje de inhibición de germinación de esporas de *F. verticillioides* en medio con extracto metanólico y fracción con butanol de *J. macrocarpa* con respecto al control con metanol.

Tiempo	EM	FB
4	21±4.5 <sup>a</sup>	32±6.7 <sup>a</sup>
8	32±1.3 <sup>a</sup>	41±3.8 <sup>a</sup>
<b>12</b>	<b>40±1.9<sup>a</sup></b>	<b>41±2.4<sup>a</sup></b>
14	35±2.1 <sup>a</sup>	34±1.3 <sup>a</sup>
16	35±1.2 <sup>a</sup>	35±2 <sup>a</sup>
20	22±0.4 <sup>a</sup>	21±0.4 <sup>a</sup>

EM: Extracto metanólico, FB: Fracción butanol. Valores expresados como el promedio de dos replicas. Diferentes superíndices indican diferentes grupos estadísticos. Prueba de Tukey  $p < 0.05$