

Polvos, extractos y fracciones de hojas de *Cestrum nocturnum* L. y su actividad antifúngica en dos aislamientos de *Fusarium* spp.

Powders, extracts and fractions of leaves of *Cestrum nocturnum* L. and their antifungal activity over two isolations of *Fusarium* spp.

Silvia BAUTISTA BAÑOS ¹, Laura Leticia BARRERA NECHA¹, Ana Niurka HERNÁNDEZ LAUZARDO¹, Miguel Gerardo VELÁZQUEZ DEL VALLE¹, Irán ALIA TEJACAL² y Dagoberto GUILLÉN SÁNCHEZ³

¹Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional. Carr. Yautepec-Jojutla Km. 8.5 San Isidro, Yautepec, Morelos, México CP 62731; ²Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad Núm. 1001. 62209, Chamilpa, Cuernavaca, Morelos y ³Campus Oriente, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Nicolás Bravo s/n. Parque Industrial Cuautla, Xalostoc, Morelos, México CP 91690. E-mails: sbautis@ipn.mx  Autor para correspondencia

Recibido: 05/02/2008 Fin de primer arbitraje: 01/04/2008 Primera revisión recibida: 17/04/2008
Fin de segundo arbitraje: 02/06/2008 Segunda revisión recibida: 04/07/2008 Aceptado: 10/07/2008

RESUMEN

Una de las principales causas de pérdidas postcosecha de frutas y hortalizas es la pudrición causada por *Fusarium* spp. Una de las posibles alternativas en el control de estas enfermedades es la utilización de especies botánicas con propiedades fungicidas ya sea en polvos o extractos. El género *Cestrum* se compone de una diversidad de especies con diferentes usos en la medicina tradicional, asociándose también con actividad insecticida y fungicida. Los objetivos de esta investigación fueron obtener extractos acuosos, etanólicos, metanólicos, clorofórmicos, diclorometánicos y acetónicos de *C. nocturnum* y evaluar su actividad antifúngica. Las fracciones obtenidas por cromatografía en columna (CC) fueron evaluadas sobre la germinación de dos aislamientos de *Fusarium* obtenidos de frutos de papaya y ciruela mexicana (*Spondias purpurea*). Asimismo, se evaluó el potencial fungicida de polvos de *C. nocturnum* en concentraciones de 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 g mL⁻¹ y de extractos de *C. nocturnum* en concentraciones de 12, 25 y 50 mg mL⁻¹ en estos dos aislamientos. Las variables estudiadas fueron crecimiento micelial, esporulación y germinación conidial, así como la tasa de crecimiento. Los resultados mostraron que hubo diferencias importantes en la cantidad y número de mezclas de componentes obtenidos en función del disolvente utilizado, tiempo de extracción (24 y 48 h), esterilizado y no esterilizado, y aislamiento evaluado. El mayor número de mezclas de componentes obtenidos (16) fue con los extractos acetónicos. Éste a su vez mostró el mayor número de zonas de inhibición de la germinación por CCF y fracciones de CC en los aislamientos de *Fusarium*. Los polvos de *C. nocturnum* estimularon la formación de conidios y germinación en ambos aislamientos, sin embargo, inhibieron el crecimiento micelial en el aislamiento de ciruela mexicana. En ambos aislamientos únicamente el extracto metanólico a 12 mg mL⁻¹ de *C. nocturnum* inhibió tanto el crecimiento micelial como la esporulación. En relación a la tasa de crecimiento, ésta fue mayor en el aislamiento de ciruela mexicana.

Palabras clave: huele de noche, biofungicidas, papaya, ciruela mexicana.

ABSTRACT

One of the main causes that originate considerable postharvest losses during handling and storage of fruits and vegetables is the infection by *Fusarium*. One possible alternative to control postharvest disease originated by fungi in fruits and vegetables is the application of powders and extracts from botanical species with fungicidal properties. The genus *Cestrum* is composed by a great diversity of botanical species with different applications in the traditional medicine, associated with pesticidal and fungicidal activities. The objectives of this research were to obtain aqueous, ethanolic, metanolic, chlorophormic, dichloromethanic and acetonic extracts, evaluating their antifungal activity. Fractions obtained by column chromatography (CC) were evaluated on germination of two isolations of *Fusarium* from fruits of papaya and red mombin. The fungicidal potential of powders of *C. nocturnum* at concentrations each 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 g mL⁻¹ and aqueous, methanol, acetone, dichloromethane, chloroform-methanol-water, and ethanol extracts at concentrations each of 12, 25 y 50 mg mL⁻¹ were also evaluated on this two isolations. The parameters evaluated were: mycelial growth, sporulation, germination and also rate of growth. Results showed significative differences in the amount and number mixture of compounds obtained depending on dissolvent applied, time of extraction (24 and 48 h), sterilized and non-sterilized and type of isolation. The greatest number of mixture of compounds (16) was obtained with the acetonic extract. This also

showed the greatest number of inhibitory zone of germination in TLC and fractions of CC on *Fusarium*. The fungicidal activity was different in relation to isolate and treatment applied. Powders stimulated sporulation and germination in both isolates; however, they did inhibit micelial growth in red mombin isolate. For both isolates, only the methanol extract of *C. nocturnum* at 25 mg mL⁻¹ inhibited micelial growth and sporulation. Rate of growth was higher in red mombin isolate.

Key words: Night blooming jessamine, biofungicides, papaya, red mombin

INTRODUCCIÓN

Por su naturaleza biodegradable y utilizados en dosis apropiadas, los polvos y extractos botánicos pueden ser una alternativa al uso de fungicidas sintéticos (Hernández *et al.*, 2005). La especie vegetal *Cestrum nocturnum* L. es conocida como huelle de noche, dama de noche y jazmín nocturno (Martínez, 1990; 1994). Su fragancia fuerte y dulce ha hecho que esta planta sea utilizada para fines ornamentales (Bunezgo *et al.*, 1997). Sin embargo, también es utilizada con fines medicinales. Uno de los principales usos reportados para *C. nocturnum* es que disminuye cefaleas, presión alta y taquicardia. Se menciona también que dentro de su efecto medicinal contrarresta los espasmos, erupciones cutáneas y la epilepsia. Existen reportes donde se menciona el potencial fungicida de polvos y extractos de esta especie. Grainge y Ahmed (1988) clasifican a esta planta dentro del grupo de las plantas con efecto fungicida. Por su parte, Bravo *et al.*, (2000) reportan que de 97 especies botánicas *C. nocturnum* sobresalió por su efecto fungicida contra *Fusarium moniliforme* Sheldon. Igualmente Hernández (2004) y Rodríguez (2004) mencionan la actividad fungicida de *C. nocturnum* sobre los hongos *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc., y *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.).

Se sabe que el género *Fusarium* Link ex Gray es de distribución cosmopolita en todos los tipos de climas y posee un amplio ámbito de hospedantes (Nelson *et al.*, 1983). El hongo penetra la cutícula del fruto por medio de enzimas y permanece latente hasta que el fruto comienza a madurar y entonces se desarrolla rápidamente. Entre los frutos que se ven más afectados por este microorganismo se encuentra la papaya, melón, sandía, pera, aguacate, manzana y plátano entre otros (Snowdon, 1990). Los objetivos de este trabajo fueron: 1.- Obtener mezclas de componentes y fracciones de extractos de *C. nocturnum* por cromatografía en capa fina y cromatografía en columna y 2.- Evaluar el potencial fungicida de polvos y extractos vegetales de esta especie botánica en diferentes aspectos del desarrollo *in vitro* de dos aislamientos de *Fusarium*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de *Fusarium* spp.

Uno de los aislamientos del hongo *Fusarium* spp se obtuvo de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) provenientes del estado de Guerrero, México y el segundo de frutos de ciruela mexicana (*Spondias purpurea* L.) de la localidad de Tepoztlan, Morelos, México. Se tomaron porciones del fruto enfermo previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1% y se depositaron en cajas de Petri que contenían medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). Se incubaron por 7 días a una temperatura de 25 ± 2 °C hasta el desarrollo del micelio y conidios. Los hongos aislados se identificaron a nivel de género siguiendo las claves de Barnett y Hunter (1972). Con la finalidad de conservar la patogenicidad de los aislamientos de *Fusarium*, éstas se inocularon en sus respectivos hospederos (frutos), volviéndose a sembrar en cajas de Petri con PDA. Los hongos aislados se mantuvieron como cultivos vivos en tubos con PDA en el laboratorio de Fitopatología Poscosecha del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos.

Obtención de hojas de *C. nocturnum*

Las hojas de “huelle de noche” se colectaron en el municipio de Yautepec, Morelos, con número de *voucher specimen* 2746 (MO). Una vez hecha la recolección se transportaron al laboratorio de fitopatología postcosecha del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Se desecharon todas aquellas con daños o síntoma de plagas o enfermedades y se almacenaron por un periodo corto de tiempo (12 h máximo) a una temperatura de 4 °C.

Preparación de polvos y extractos de *C. nocturnum*

Las hojas de “huelle de noche” se lavaron con agua corriente, posteriormente se enjuagaron con agua destilada y se pusieron a secar en una charola sobre papel secante a temperatura ambiente (27 ± 2 °C) por un lapso de dos a tres días; una vez secas las hojas se molieron en una picadora comercial

(Moulinex); el polvo se almacenó por 7 días aproximadamente en frascos color ámbar para su uso posterior. Para la preparación de los extractos se hizo el mismo procedimiento de lavado y desinfección de las hojas, se dejaron secar a temperatura ambiente por dos horas aproximadamente, se partieron en trozos pequeños, se pesaron 200 g del material vegetativo y se colocaron en matraces agregando 400 mL de disolvente. Los disolventes utilizados fueron seleccionados de acuerdo a Eloff (1998): agua, metanol, acetona, diclorometano, cloroformo-metanol-agua y etanol. Las mezclas de plantas y extractos se dejaron reposar por 48 h. Los tratamientos sujetos a esterilización se colocaron en una autoclave (AESA, Mod. CV 250) durante 15 min. a una presión de 15 lb/pul² a 121 °C. Posteriormente los extractos esterilizados y no esterilizados se filtraron a través de un embudo de filtración rápida para separar la parte vegetativa de la solución la cual posteriormente se concentró en un rotavapor (Büchi Waterbath B-490) a presión reducida. Las temperaturas empleadas para cada disolvente fueron: 56.2 °C para la acetona, 61.0 °C para el cloroformo-metanol-agua, 65.0 °C para el metanol, 78.5 °C para el etanol y 40.0 °C para el diclorometano.

Cantidad de extracto obtenido

Una vez eliminado el disolvente se procedió a vaciar el extracto concentrado en frascos ámbar y se calculó el extracto obtenido por diferencia de peso. Los extractos se almacenaron (5 días aproximadamente) en un cuarto frío a una temperatura de 4 °C hasta su uso posterior.

Bioautografía

Para la preparación del inóculo se cosecharon las esporas a partir de cultivos de diez días en cajas de Petri. La superficie de cada caja de Petri se raspó con una aguja de disección estéril, agregando a cada caja 10 mL de agua destilada estéril. La suspensión se filtró a través de un embudo y una gasa estéril, se ajustó con agua destilada estéril a una concentración de 3×10^5 esporas mL⁻¹. Para detectar la actividad biológica directamente sobre la placa de CCF, éstas fueron inoculadas con una suspensión de esporas (3×10^5) de *Fusarium*. Alícuotas de 25-50 mL de la suspensión de conidios fueron preparados con caldo de papa dextrosa. Cada placa fue asperjada con 50 mL de la suspensión de conidios. Las placas fueron colocadas en cámaras húmedas de 23 x 18 cm e incubadas en una cámara de incubación (Figursa,

Mod. IBTF) a una temperatura de $28 \pm 1^\circ$ C. Se observó si hubo zonas de inhibición del crecimiento micelial después de cuatro días de tratamiento, por comparación visual entre los tratamientos y el control que se aplicó con el fungicida Tiabendazol (SIGMA).

Cromatografía en Capa Fina Bidimensional (CCF)

Diez microlitros de cada extracto vegetal se corrieron en cromatografía en capa delgada bidimensional (AL TLC 20 x 20 cm Sílica Gel 60 F₂₅₄). Primero se utilizó como eluyente metanol/diclorometano (1:9 v/v) y luego se giró la placa 90° y se utilizó entonces como eluyente acetato de etilo en hexano (1:1 v/v). Se observaron en una cámara de luz ultravioleta, Mineralight Lamp, mod. UVGL-58 a 360 nm, determinando visualmente los componentes (manchas) del extracto. Una placa de referencia fue hecha para cada extracto, la cual se reveló con una solución de ácido sulfúrico en etanol 1:19 v/v y se calentó en una parrilla eléctrica (CIMAREC) a 100 °C. Se determinó el frente de referencia (Rf) aplicando la siguiente fórmula $Rf = \text{Distancia recorrida por el componente} / \text{Distancia recorrida por el disolvente}$.

Obtención de Fracciones por (CC)

Para separar las fracciones con actividad antifúngica del extracto acetónico de 24 h esterilizado, se pesaron 4 g del extracto en una balanza electrónica (OHAUS, Mod. Scout), adsorbiéndolo en 2-3 g de Silica gel (60:230 Merck) y el producto total fue pasado por una columna empacada con 200 g de Silica gel. La fase móvil se inició con diclorometano al 100%; se realizaron cambios de gradientes de concentración agregando metanol, hasta que éste fue del 100%. Las fracciones en volúmenes de 50 mL se concentraron en el rotavapor a $65 \pm 5^\circ$ C y posteriormente se colocaron en viales de vidrio a temperatura ambiente (27° C). Las fracciones se aplicaron nuevamente en los cromatofolios para observar zonas de inhibición del hongo, comparadas con el control, los cuales fueron asperjados con la suspensión de esporas de ambos aislamientos de *Fusarium* e incubadas de la misma manera que se mencionó anteriormente.

Tratamientos con polvos de *C. nocturnum*

Las concentraciones de polvos de hongo de noche utilizadas fueron: 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 g mL⁻¹. Cada una de las concentraciones de polvos se mezcló

con medio nutritivo PDA y se esterilizaron en una autoclave durante 15 min. y posteriormente se vaciaron en cajas Petri de 100 mm de diámetro. Se realizaron 6 repeticiones por cada tratamiento, el testigo fue únicamente con PDA. Una vez que se enfriaron las placas de agar se procedió a sembrar un disco (5 mm de diámetro aprox.) del inóculo de *Fusarium* en el centro de las cajas Petri que contenían los tratamientos. Las cajas se sellaron, se etiquetaron y se incubaron a una temperatura de 25 ± 2 °C por 7 días.

Tratamientos con extractos de *C. nocturnum*

Primer experimento: a cajas Petri con medio PDA se les agregó por separado cada uno de los siguientes extractos: acuoso, metanólico o acetónico, siendo los controles PDA, metanol y acetona. Segundo experimento: los extractos evaluados fueron diclorometano, cloroformo-metanol-agua (CMA) y etanólico, y como testigos PDA, diclorometano, CMA y etanol. En ambos experimentos las concentraciones de los extractos y disolventes puros fueron: 12, 25 y 50 mg mL⁻¹ para cada tratamiento se realizaron 6 repeticiones y fueron probados para los dos aislamientos de *Fusarium*.

Variables de respuesta

a) Crecimiento micelial de la colonia: se evaluó midiendo diariamente el crecimiento del micelio desde el centro de la caja hasta la zona marginal de la colonia con ayuda de un vernier (Plastic Caliper). Esto se realizó hasta que el micelio del hongo alcanzó la orilla de las cajas de Petri. Se llevó a cabo un análisis de regresión para obtener la tasa de crecimiento. Para evaluar el crecimiento micelial de los dos aislamientos de *Fusarium* spp se realizaron 6 repeticiones por cada tratamiento (polvos o extractos). Los valores de crecimiento micelial se expresaron en mm.

b) Esporulación: para obtener la suspensión de esporas, la superficie de cada caja Petri utilizada en la evaluación del crecimiento micelial se raspó con una aguja de disección estéril, agregando a cada caja 10 mL de agua destilada estéril. La suspensión se filtró a través de un embudo de filtración rápida y una gasa estéril. Para inhibir la germinación de los conidios se le agregó a la suspensión de esporas unas gotas de safranina-lactofenol. El conteo se realizó en una cámara de Neubauer, se contaron 5 campos del cuadro central de la cámara con la ayuda de un

microscopio compuesto (Nikkon ALPHAPHOT-2 YS-2) con el objetivo de 40X y con un contador manual de cuatro dígitos (Marca Compass). Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento y se tomaron lecturas por duplicado.

c) Porcentaje de germinación en discos de PDA: Para realizar esta evaluación se colocaron tres discos de PDA (10 mm de diámetro), en un portaobjetos (25x75mm) a los cuales se les agregó 50µL de la suspensión de esporas de cada tratamiento antes obtenida. En cajas Petri estériles los portaobjetos se incubaron durante 7 h. Las cajas se sellaron y al término del periodo de incubación a los discos de PDA se les agregó gotas de safranina-lactofenol. El conteo de la germinación se realizó en dos campos por disco de PDA, tomando en cuenta el total de esporas germinadas y no germinadas en ese campo. Esto también se llevó a cabo con ayuda del microscopio óptico con el objetivo de 40X y con un contador manual de cuatro dígitos. Para evaluar la germinación se utilizaron 2 cajas por tratamiento, de cada disco se realizaron 3 lecturas, obteniéndose un promedio.

Análisis estadístico

Los experimentos tuvieron un arreglo completamente al azar. Con los datos relacionados con crecimiento micelial, germinación y esporulación se realizaron los análisis de varianza con el programa Sigma Stat versión 2.0. Se obtuvieron medias y tasas de crecimiento. La separación de medias se llevó a cabo mediante la prueba de Diferencia mínima significativa (DMS) ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

Cuantificación de extractos

En las Figura 1 se muestran los resultados obtenidos con la cantidad de extracto obtenido por los diferentes disolventes aplicados a hojas de *C. nocturnum* durante 24 y 48 h, esterilizado y no esterilizado. Se encontró una mayor cantidad de extracto con agua (99,7-123,1 g) a 24 y 48 h, seguido por el etanol (61,6-99,5 g) a 24 y 48 h, en los tratamientos esterilizados y no esterilizados. Con diclorometano, se obtuvo menor cantidad de extracto en ambos (7,6 g), esterilizado y no esterilizado, a las 24 y 48 h de extracción. Asimismo, con acetona a las 48 h, independientemente de si fue esterilizado o no, el extracto obtenido fue menor (3,8 g) en

comparación con los demás disolventes utilizados. En la mezcla de CMA, a las 48 h no esterilizado, se obtuvieron 147,9 g y la menor cantidad en el tratamiento de 24 h no esterilizado (45,6 g).

Número de manchas extraídas por CCF

El número de manchas observadas varió de acuerdo al disolvente utilizado, tiempo de extracción y esterilizado o no. Los resultados obtenidos utilizando primeramente como eluyente la mezcla metanol: diclorometano (1:9) y posteriormente acetato de etilo: hexano (1:1) se presentan en la Figura 2. encontrando que el mayor número de manchas se obtuvieron con los extractos de acetona (16) y metanol (8) en el tratamiento de 24 h esterilizado; y el menor número se obtuvo con el agua (2), no hubo ningún componente con la mezcla CMA. Con los extractos de etanol y diclorometano se observaron seis y siete manchas respectivamente. Resultados similares a las 24 h, se observaron con el extracto acuoso esterilizado a las 48 h de extracción (2); en general con éste tiempo, se obtuvo un bajo número de manchas, a excepción del extracto acetónico (11). En el tratamiento de 24 h no esterilizado, el número de manchas separadas solo aumentó con el extracto de diclorometano (6), y en el caso del extracto acetónico disminuyó a solo dos manchas, en los restantes extractos, el número de manchas fue similar. Al revelar las placas de los extractos en el tratamiento de 48 h no esterilizado, se observaron nueve manchas con el extracto metanólico, distinguiéndose un incremento en comparación con los tiempos de extracción anteriores. Al igual que el tratamiento de 48 h y esterilizado, con el extracto de CMA se observaron solo dos manchas.

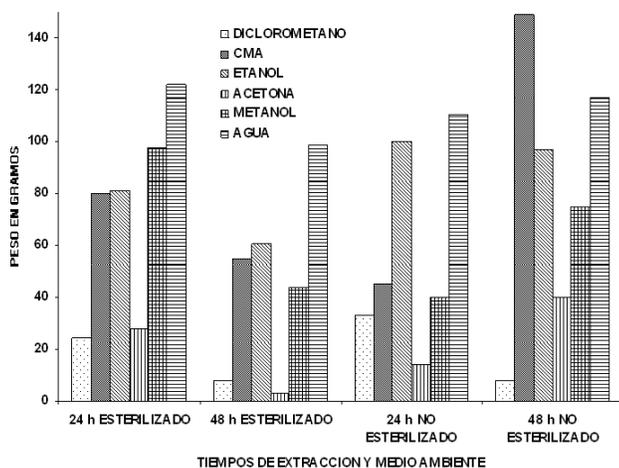


Figura 1. Cantidad de extractos de *Cestrum nocturnum* a las 24 y 28 h de extracción, esterilizado y no esterilizado.

Diversidad de extractos con actividad antifúngica

En la Figura 3, se puede observar que en relación al aislamiento de *Fusarium* de frutos de papaya, con el extracto de diclorometano se obtuvo una mezcla de componentes (manchas) inhibitorios, con excepción de las 48 h de extracción esterilizado, donde no hubo presencia de éstos. Con el extracto de CMA no se observaron componentes inhibitorios en ninguno de los tratamientos. El número de manchas o mezclas inhibitorias con el extracto etanólico fue de uno (Rf = 0,89), en los tratamientos esterilizado y no esterilizado, en ambos tiempos de extracción (24 y 48 h). En general, con el extracto acetónico, independientemente del tiempo de extracción, esterilizado o no, se observó el mayor número de mezclas de componentes activos (cinco a seis). Con el extracto metanólico el número varió de uno a dos (Rf = 0,20; 0,72). Con el extracto acuoso se observaron dos manchas inhibitorias (Rf = 0,25; 0,60 a las 24 y 48 h, esterilizado). Con el aislamiento de *Fusarium* de ciruela, con los extractos de diclorometano y MCA, no se observaron mezclas de componentes en ningún periodo de incubación. A las 48 h de extracción y esterilizado, el único extracto en el que se observaron zonas inhibitorias fue con el extracto acetónico (2). Después de 24 h de extracción y no esterilizado, tanto en el extracto acetónico como el metanólico se observó una zona inhibitoria. A las 24 h y esterilizado en el extracto etanólico, acetónico, metanólico y acuoso se observó una mancha. Con un tiempo de extracción de 48 h se observaron seis manchas (Rf = 0,40; 0,47; 0,50; 0,57; 0,62; 0,69) con el extracto acetónico y no esterilizado y una mancha (Rf = 0,73) con el extracto metanólico. Como se observa los

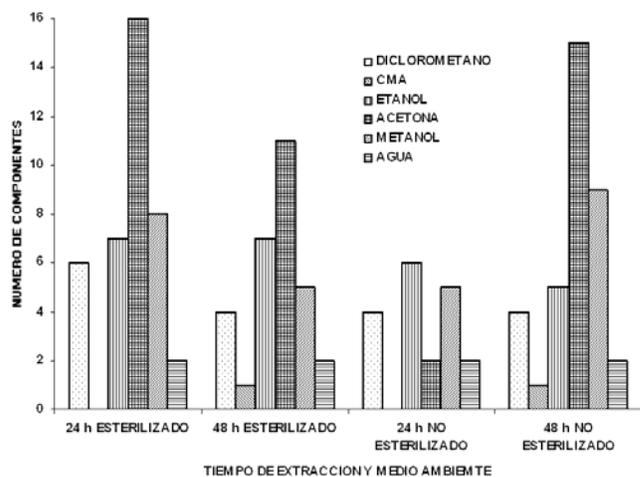


Figura 2. Número de mezclas de componentes del extracto de *Cestrum nocturnum* por CCF a las 24 y 48 h de extracción, esterilizado y no esterilizado.

valores de los Rf obtenidos para los componentes de los extractos son diferentes.

Obtención de Fracciones por Cromatografía en Columna

En total, se colectaron 55 fracciones del extracto acetónico de 24 h de extracción esterilizado

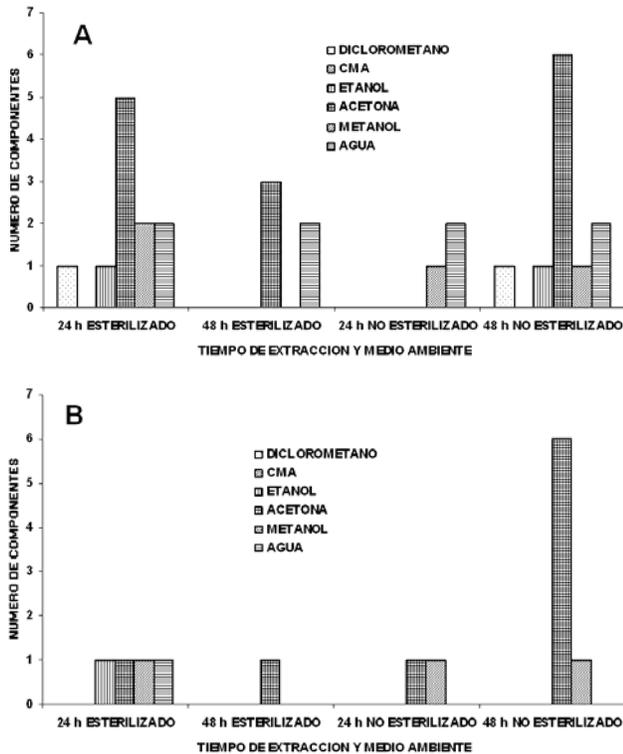


Figura 3. Número de mezclas de componentes con acción inhibitoria observados en CCF después de la aspersión con *Fusarium* A) papaya (*Carica papaya*) B) ciruela mexicana (*Spondias purpurea*) y la aplicación de los diferentes extractos después de cuatro días de incubación.

(datos no mostrados). Al terminar el periodo de incubación de cuatro días, se observó que las fracciones 6, 7, 51 y 55 inhibieron el aislamiento de *Fusarium* de papaya. Para el aislamiento de *Fusarium* de ciruela, las fracciones que inhibieron su desarrollo fueron la 42, 46 y 51.

Tratamientos con polvos de hojas de *C. nocturnum*

Se obtuvieron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en el desarrollo del micelio de *Fusarium* aislado de papaya y ciruela mexicana (Cuadro 1). En el aislamiento de papaya, el menor crecimiento micelial se observó en el tratamiento testigo (36,5 mm), mientras que en los tratamientos con las diferentes concentraciones de polvos, el crecimiento fue mayor independientemente de la concentración aplicada. En cuanto al aislamiento de ciruela mexicana, el mayor crecimiento micelial fue en el tratamiento con PDA sólo, y la mayor inhibición en el tratamiento de 0,5 g mL⁻¹ (38,0 mm). La tasa de crecimiento micelial fue diferente entre los dos aislamientos evaluados. Para el aislamiento de papaya ésta varió de 5,9 a 6,3 mm d⁻¹, mientras que en el aislamiento de ciruela mexicana varió de 7,1 a 7,8 mm d⁻¹ durante los 15 y 10 días de incubación respectivamente. La esporulación en ambos aislamientos, el mayor número de conidios se manifestó en todos los tratamientos con polvos en comparación con el tratamiento testigo (PDA). En ambos aislamientos, en el tratamiento de 2,0 g mL⁻¹ de *Cestrum* se produjo el mayor número de conidios (1,3 x 10⁸ y 1,2 x 10⁸ respectivamente). En el porcentaje de germinación se observó en ambos aislamientos que éste fue mayor en todos los tratamientos aplicados con respecto al testigo. Entre los tratamientos aplicados el porcentaje de germinación fue similar en ambos aislamientos.

Cuadro 1. Crecimiento micelial, esporulación y germinación de *Fusarium* spp. aislado de papaya (*Carica papaya*) y ciruela mexicana (*Spondias purpurea*) incubadas en medio PDA y/o diferentes concentraciones de polvos no esterilizados de hojas de *Cestrum nocturnum*.

Polvos g mL ⁻¹	<i>Fusarium</i> (Papaya)			<i>Fusarium</i> (Ciruela Mexicana)		
	Crecimiento micelial (mm)	Esporulación (esporas/mL)	Germinación (%)	Crecimiento micelial (mm)	Esporulación (esporas/mL)	Germinación (%)
0,5	48,6 a* (6,3) ¹	6,1 x 10 ⁷ c*	67,0 a*	38,0 c* (7,1) ²	6,7 x 10 ⁷ d*	68,0 a*
1,0	49,5 a (5,9)	4,7 x 10 ⁷ c	67,0 a	42,4 b (7,5)	8,2 x 10 ⁷ c	68,0 a
1,5	51,0 a (6,0)	8,4 x 10 ⁷ b	67,0 a	42,4 b (7,1)	1,1 x 10 ⁸ b	68,0 a
2,0	49,8 a (5,9)	1,3 x 10 ⁸ a	67,0 a	42,8 b (7,8)	1,2 x 10 ⁸ a	68,0 a
PDA	36,5 b (6,0)	3,7 x 10 ⁶ d	36,0 b	55,9 a (7,6)	8,8 x 10 ⁶ e	42,0 b

*Letras iguales indican similitud estadística con la prueba DMS ($p \leq 0,05$).

Valores entre paréntesis indican la tasa de crecimiento (mm d⁻¹) durante el período de incubación de 15¹ y 10² días.

Tratamientos con extractos acuosos, metanólicos y acetónicos de hojas de *C. nocturnum*

Se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en el crecimiento micelial en la mayoría de las concentraciones de los extractos utilizados excepto en el aislamiento de *Fusarium* de papaya e incubada en los extractos acuosos (Cuadro 2). El menor crecimiento micelial en este aislamiento se observó en el tratamiento donde el hongo se incubó con medio PDA y metanol al 1,0% (4,2 mm). En *Fusarium* aislado de ciruela mexicana, el crecimiento micelial en los extractos acuosos en concentraciones de 12 y 25 mg mL⁻¹ (32,4 y 33,0 mm respectivamente) fue similar con el testigo con PDA (32,2 mm). Para esta cepa la mayor inhibición en el crecimiento micelial se presentó en los extractos metanólicos y acetónicos a 50 mg mL⁻¹ (7,6 y 16,3 mm respectivamente), sin embargo, el crecimiento en los testigos metanol y acetona a 50 mg mL⁻¹ fue aún menor (5,3 y 2,5 mm

respectivamente). En relación a la tasa de crecimiento de ambos aislamientos, en general, ésta fue mayor en el aislamiento de *Fusarium* de ciruela mexicana. En ambos aislamientos, en casi todos los tratamientos, la menor velocidad de crecimiento coincidió con la mayor inhibición en el crecimiento. La esporulación fue significativamente diferente entre tratamientos ($p \leq 0,05$) en los dos aislamientos estudiados. En el aislamiento de *Fusarium* obtenido de papaya la esporulación menor se observó con el extracto metanólico a 50 mg mL⁻¹ ($2,6 \times 10^6$) y con los testigos metanol y acetona a 50 y 25 mg mL⁻¹ ($2,8 \times 10^5$ y $9,1 \times 10^5$ respectivamente). Para el aislamiento de *Fusarium* de ciruela mexicana, los tratamientos con menor esporulación fue en los extractos acetónicos en sus tres concentraciones. La germinación fue mayor del 60 % en la mayoría de los tratamientos probados con ambos aislamientos, sin embargo, en el aislamiento de *Fusarium* de papaya, se tuvo un porcentaje de germinación menor en los extractos

Cuadro 2. Crecimiento micelial, esporulación y germinación de *Fusarium* spp. aislado de papaya (*Carica papaya*) y ciruela mexicana (*Spondias purpurea*) incubadas en medio PDA con diferentes concentraciones de extractos acuosos, metanólicos y acetónicos no esterilizados de hojas de *Cestrum nocturnum*.

Extractos mg mL ⁻¹	<i>Fusarium</i> spp. (Papaya)			<i>Fusarium</i> spp. (Ciruela Mexicana)		
	Crecimiento micelial (mm)	Esporulación (esporas/ mL)	Germinación (%)	Crecimiento micelial (mm)	Esporulación (esporas/ mL)	Germinación (%)
Acuoso:						
12	31,0 a* (4.9) ¹	$1,2 \times 10^7$ b*	47,0 c*	32,4 ab* (8.6) ²	$3,31 \times 10^6$ b*	77,1 ab*
25	27,7 a (4.2)	$1,5 \times 10^7$ a	47,0 c	33,0 ab (9.0)	$3,6 \times 10^6$ b	65,3 bc
50	26,4 a (4.4)	$1,2 \times 10^7$ b	9,0 d	31,0 b (9.2)	$4,3 \times 10^6$ a	50,2 c
Metanólico:						
12	20,4 b (4.7)	$4,6 \times 10^6$ d	71,0 ab	22,3 d (6.0)	$2,5 \times 10^6$ c	80,0 ab
25	16,2 e (3.2)	$1,9 \times 10^6$ e	82,0 a	22,1 d (5.9)	$2,5 \times 10^6$ c	82,0 ab
50	5,0 e (1.4)	$2,6 \times 10^6$ f	81,0 ab	7,6 f (2.8)	$1,1 \times 10^6$ fg	83,0 a
Acetónico:						
12	16,5 bcd (3.5)	$2,2 \times 10^6$ e	67,0 ab	25,1 cd (7.0)	$9,6 \times 10^5$ g	83,0 a
25	14,8 cde (3.2)	$5,6 \times 10^6$ c	69,0 ab	22,8 cd (6.5)	$1,4 \times 10^5$ ef	83,0 a
50	11,5 cde (3.7)	$4,3 \times 10^6$ d	77,0 ab	16,3 e (3.7)	$9,2 \times 10^5$ g	83,0 a
Testigos:						
Metanol:						
12	18,9 bc (4.5)	$3,9 \times 10^6$ d	19,0 d	26,9 c (7.7)	$2,8 \times 10^6$ c	82,0 ab
25	10,8 e (2.7)	$2,0 \times 10^6$ e	86,0 a	16,7 e (4.3)	$2,5 \times 10^6$ c	82,0 ab
50	4,2 f (1.7)	$2,8 \times 10^5$ f	86,0 a	5,3 fg (1.8)	$1,2 \times 10^6$ fg	82,0 ab
Acetona:						
12	17,9 bc (4.7)	$9,1 \times 10^5$ f	70,0 ab	27,1 c (7.8)	$1,9 \times 10^6$ d	82,0 a
25	10,1 e (2.6)	$2,4 \times 10^6$ e	73,0 ab	18,6 e (5.8)	$1,7 \times 10^6$ de	82,0 ab
50	11,0 e (3.9)	$2,5 \times 10^6$ e	69,0 ab	2,5 g (1.5)	$1,2 \times 10^6$ fg	81,0 ab
PDA	28,8 a (5.3)	$4,6 \times 10^6$ d	63,0 b	35,2 a (9.5)	$1,9 \times 10^6$ d	69,0 ab

* Letras iguales indican similitud estadística con la prueba DMS ($p \leq 0,05$).

Valores entre paréntesis indican la tasa de crecimiento (mm d⁻¹) durante el período de incubación de 15¹ y 10² días.

acuosos en sus tres concentraciones, siendo el más bajo a la concentración de 50 mg mL⁻¹ (9,0 %).

Tratamientos con extractos de diclorometano, CMA y etanólicos de hojas de *C. nocturnum*

Para ambos aislamientos, se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos en relación al crecimiento micelial y esporulación (Cuadro 3). En el medio PDA con el extracto etanólico a la concentración de 50 mg mL⁻¹ (2,0 mm) y en el testigo (0,0 mm) con este mismo disolvente se presentó la mayor inhibición en el crecimiento micelial. En *Fusarium* de ciruela mexicana, el extracto etanólico, la concentración de 25 mg mL⁻¹ fue igualmente inhibitoria que el testigo

(2,1 y 1,4 mm respectivamente). En este mismo aislamiento, también en la mezcla PDA y extracto de diclorometano se observó que el desarrollo micelial a la concentración de 50 mg mL⁻¹ (13,7 mm) fue mayor que en el testigo con diclorometano solo. En general, la tasa de crecimiento fue mayor en *Fusarium* aislado de ciruela mexicana en comparación con el de papaya. La tasa de crecimiento para ésta última varió de 0 a 6,3 mm d⁻¹, mientras que en la de ciruela fue de 0 a 12,6 mm d⁻¹. En el aislamiento de papaya, la esporulación fue menor entre los tratamientos con extracto etanólico a 12 y 25 mg mL⁻¹ (3,5 x 10⁵, 2,3 x 10⁵ respectivamente) pero similar al testigo con etanol, mientras que en el aislamiento de ciruela mexicana, la menor esporulación se observó con este mismo disolvente

Cuadro 3. Crecimiento micelial, esporulación y germinación de *Fusarium* spp. aislado de papaya (*Carica papaya*) y ciruela mexicana (*Spondias purpurea*) incubadas en medio PDA con diferentes concentraciones de extractos de diclorometano, cloroformo-metanol-agua (CMA) y etanólicos no esterilizados de hojas de *Cestrum nocturnum*.

Extractos mg mL ⁻¹	<i>Fusarium</i> spp. (Papaya)			<i>Fusarium</i> spp. (Ciruela mexicana)		
	Crecimiento micelial (mm)	Esporulación (esporas/mL)	Germinación (%)	Crecimiento micelial (mm)	Esporulación (esporas/mL)	Germinación (%)
Diclorometano:						
12	25,0 a* (6.3) ¹	4,7 x 10 ⁶ b*	70,0 a*	22,1 bcde* (12.0) ²	3,1 x 10 ⁶ hg	83,0 a*
25	20,7 abc (3.6)	4,3 x 10 ⁶ bc	72,0 a	22,0 bcde (11.2)	4,3 x 10 ⁶ ef	83,0 a
50	6,2 ef (1.6)	3,1 x 10 ⁶ cde	70,0 a	13,7 h (7.0)	6,4 x 10 ⁶ b	83,0 a
CMA:						
12	24,7 a (4.9)	3,9 x 10 ⁶ bcd	76,0 a	27,0 b (12.6)	3,5 x 10 ⁶ hg	83,0 a
25	23,0 ab (4.9)	6,4 x 10 ⁶ a	72,0 a	22,5 bcde (10.0)	2,2 x 10 ⁶ i	82,0 a
50	24,0 a (5.7)	6,3 x 10 ⁶ a	80,0 a	19,9 def (10.1)	2,9 x 10 ⁶ hi	82,2 a
Etanólico:						
12	17,5 bc (4.7)	3,5 x 10 ⁵ h	83,0 a	16,1 gh 8.3	1,2 x 10 ⁶ j	83,0 a
25	11,3 de (2.8)	2,3 x 10 ⁵ h	83,0 a	2,1 j (1.7)	3,3 x 10 ⁵ k	83,0 a
50	2,0 fg (0.3)	1,1 x 10 ⁵ h	83,0 a	0,0 j	1,4 x 10 ⁵ k	83,0 a
Testigos:						
Diclorometano:						
12	21,8 ab (5.3)	3,3 x 10 ⁶ cde	70,0 a	24,1 bcd (11.6)	3,8 x 10 ⁶ fg	83,0 a
25	20,6 abc (5.4)	1,6 x 10 ⁶ fg	69,0 a	24,7 bc (12.0)	4,9 x 10 ⁶ de	83,0 a
50	22,6 ab (6.0)	1,1 x 10 ⁶ hg	67,0 a	7,1 i (3.5)	5,8 x 10 ⁵ jk	83,0 a
CMA:						
12	23,2 ab (5.8)	3,1 x 10 ⁶ ed	77,0 a	25,5 b (12.0)	5,9 x 10 ⁶ bc	83,0 a
25	25,3 a (6.2)	3,1 x 10 ⁶ ed	70,9 a	20,3 cdef (10.0)	5,2 x 10 ⁶ cd	83,0 a
50	15,6 cd (2.9)	2,6 x 10 ⁶ ef	72,0 a	19,2 efg (9.5)	9,5 x 10 ⁶ a	83,0 a
Etanol:						
12	22,1 ab (6.1)	1,1 x 10 ⁶ hg	83,0 a	14,8 gh (7.4)	1,2 x 10 ⁶ j	83,0 a
25	15,6 cd (4.3)	4,6 x 10 ⁵ hg	83,0 a	1,4 j (1.4)	4,1 x 10 ⁵ k	83,0 a
50	0,0 g	7,5 x 10 ⁴ h	83,0 a	0,0 j	1,7 x 10 ⁵ k	83,0 a
PDA	28,8 a (5.3)	4,1 x 10 ⁶ bc	63,0 b	35,2 a (9.5)	1,9 x 10 ⁶ i	69,0 b

*Letras iguales indican similitud estadística con la prueba DMS ($p \leq 0,05$).

Valores entre paréntesis indican la tasa de crecimiento (mm d⁻¹) durante el período de incubación 15¹ y 10² días.

pero a las concentraciones de 25 y 50 mg mL⁻¹ (3,3 x 10⁵ y 1,4 x 10⁵ respectivamente) aunque al igual que el aislamiento anterior fue similar a los testigos con este disolvente. En relación a la germinación, tanto en el aislamiento de papaya como en el de ciruela mexicana no hubo diferencias significativas entre tratamientos. En general, en ambos aislamientos la germinación entre tratamientos con los extractos fue mayor del 70%.

DISCUSIÓN

En la presente investigación se evaluó el potencial fungicida de extractos y fracciones de *C. nocturnum* sobre dos aislamientos de *Fusarium* (papaya y ciruela) obtenidos con disolventes de diferente polaridad mediante CCF y cromatografía en columna. La mayor cantidad de extracto se obtuvo con el agua debido probablemente a la baja volatilidad del agua, efecto contrario se observó con la acetona donde se obtuvo la menor cantidad de extracto ya que éste posee una alta volatilidad. Asimismo, se observó que en los extractos esterilizados independientemente del disolvente utilizado, a mayor tiempo de extracción (48 h) se obtuvo menor cantidad de extracto indicando que existe un tiempo de saturación del extracto en el disolvente. Por otro lado, se observó que el número de manchas extraídas mediante CCF varió según el disolvente utilizado, el tiempo de extracción y el tratamiento esterilizado o sin esterilizar. La CCF permite separar mezclas complejas que contienen un gran número de componentes, algunos de ellos difíciles de separar debido a que tienen propiedades similares. En esta investigación, se utilizó como primera fase móvil la mezcla metanol: diclorometano y posteriormente acetato de etilo: hexano como segunda fase móvil la cual presentó características diferentes de selectividad. Sin embargo, con el extracto acetónico se observó mayor número de manchas independientemente del tiempo de extracción y si se esterilizó o no. En el extracto acetónico de 24 h de extracción esterilizado se observó el mayor número de manchas (16) y también la mayor actividad antifúngica, por lo que la cromatografía en columna se llevó a cabo con este extracto. Por otro lado, la CC del extracto acetónico de *C. nocturnum* permitió separar 7 fracciones que inhibieron la germinación de conidios de ambos aislamientos de *Fusarium*. A la fecha, no existen estudios detallados sobre la composición química de algún compuesto antifúngico de las hojas de *C. nocturnum*. La literatura menciona la identificación

en las hojas de esta especie botánica de varias saponinas esteroidales llamadas nocturnosidas (aislada de extractos metanólicos), espirostanol, furostanol, seudofurostanol, dos glicósidos de pregnanos, dos glicósidos de colestanos y un glicósido de pregnano ácido carboxílico- γ -lactona (Mimaki *et al.*, 2001, 2002). Por el método de Bioautografía se separaron las manchas inhibitorias presentes en los diferentes extractos por adsorción química sobre la superficie de la placa cromatográfica y poniendo directamente en contacto la suspensión de conidios de *Fusarium*. Mediante este ensayo se pudieron observar zonas claras de halos de inhibición, obteniéndose siete fracciones que inhibieron la germinación en ambas cepas estudiadas.

En esta investigación también se evaluó la actividad fungicida de polvos y extractos de la especie botánica *C. nocturnum* en el desarrollo *in vitro* de *Fusarium*. En general, la respuesta a los polvos y extractos fue diferente en cada aislamiento. Al parecer en el aislamiento de ciruela mexicana, la respuesta fungicida a los polvos se manifestó más en el desarrollo micelial que en la esporulación o germinación ya que en el aislamiento de ciruela mexicana se observó que todos los tratamientos inhibieron su crecimiento. Coincidiendo parcialmente con estos resultados, con lo reportado por Bravo-Luna *et al.* (1997) quienes mencionan la inhibición *Fusarium moniliforme* con polvos de esta especie botánica hasta en un 68%. Sin embargo en este estudio, la esporulación y germinación de ambos aislamientos no se inhibió por efecto de los polvos, observándose una considerable estimulación en estas dos variables evaluadas. Una posible explicación es que los hongos en su mayoría cuando se someten a un estrés promueven la formación de más esporas ya que éstas se consideran estructuras de 'sobrevivencia' del hongo, de aquí que tengan la capacidad de mantenerse en estado latente (sin germinar) en un medio ambiente adverso como bajas temperaturas, sequías etc. En esta investigación, los extractos que presentaron mayor actividad antifúngica fueron el metanólico seguido por el etanólico. El primero redujo el crecimiento micelial de ambos aislamientos y la esporulación del aislamiento de papaya, mientras que el segundo inhibió la esporulación de ambos aislamientos. En otros estudios de identificación de compuestos aromáticos de *C. nocturnum* el disolvente utilizado fue el metanol obteniendo compuestos del grupo de las saponinas y flavonoides, los cuales a su vez pudieran estar ejerciendo la actividad antifúngica aquí reportada (Mimaki *et al.*, 2001; 2002). En esta

investigación el extracto acuoso de *C. nocturnum* independientemente de la concentración inhibió la germinación del aislamiento de papaya. En otros estudios no se reporta el efecto de esta especie sobre la germinación, sin embargo, se hace hincapié en la actividad fungicida de estos extractos sobre el crecimiento micelial de *R. stolonifer*. Cabe mencionar que la metodología de obtención y concentraciones utilizadas fueron diferentes a la de nuestra investigación (Rodríguez, 2004). En este estudio se pudo observar que el efecto de los extractos varió según la etapa de desarrollo del hongo, es decir que en algunos casos su efecto se manifestó más sobre el crecimiento micelial, esporulación o germinación. Sin embargo, cualquiera de los estados antes mencionados es importante de inhibir ya que en cualquiera de ellos el hongo puede ocasionar daños severos al producto agrícola. Se sigue proponiendo la identificación de grupos de compuestos activos y su evaluación fungicida sobre *Fusarium*.

LITERATURA CITADA

- Barnett, H. L. and B. B. Hunter. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Third. Edition. Burgess Publishing Co. Minneapolis, Minnesota, USA. 241 p.
- Bravo, L. L.; T. K. Bermúdez y B. R. Montes. 1997. Identificación de alcaloides de *Cestrum nocturnum* y su efecto sobre crecimiento y esporulación de *Fusarium moniliforme*. Memorias del VI Congreso Nacional de Micología. IX Jornadas Científicas. Tapachula, Chiapas, México. Resumen, p.35.
- Bravo, L. L.; T. K. Bermúdez y B. R. Montes. 2000. Inhibición de *Fusarium moniliforme* mediante polvos vegetales y algunos de sus componentes químicos. Manejo Integrado de Plagas 57:29-34.
- Bunezgo, R. M. T.; A. N. León, G. M. Acevedo, V. M. Llanio, P. M. D. Fernández y H. Pérez Saad. 1997. Perfil neurofarmacológico del *Cestrum nocturnum* L. (galán de noche). Revista Cubana Planta Médica 2:30-34.
- Eloff J. N. 1998. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants. Journal of Ethnopharmacology 60:1-8.
- Grainge, M. and S. Ahmed, S. 1988. Handbook of plants with pest-control properties. John Wiley and Sons, New York, USA. 470 p.
- Hernández, A. R. 2004. Evaluación del potencial antifúngico de extractos vegetales crudos en la germinación de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. Tesis de Maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos. México.174 p.
- Hernández, A. R.; L. L. Bravo, S. Bautista B. y N. L. Barrera. 2005. Actividad antifúngica de extractos vegetales en hongos postcosecha. Revista BIOTICA 2:115-155.
- Martínez, M. 1990. Las plantas medicinales de México. Ed. Botas. México, D. F. 656 p.
- Martínez, M. 1994. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Tercera reimpresión. Fondo de cultura económica. México, D. F. 1247 p.
- Mimaki, Y.; K. Watanabe, H. Sakagami and Y. Sashida. 2001. Flavonol glycosides and steroidal saponins from the leaves of *Cestrum nocturnum* and their cytotoxicity. Journal of Natural Products 64: 17-22.
- Mimaki, Y.; K. Watanabe, H. Sakagami and Y. Sashida. 2002. Steroidal Glycosides from the leaves of *Cestrum nocturnum*. Journal of Natural Products 65: 1863-1868.
- Nelson, P. E. ; T. A. Tousson and W. F. O. Marasas. 1983. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press. Pennsylvania, USA. 357 p.
- Rodríguez, O. N. 2004. Empleo de productos naturales como agentes inductores de resistencia en el control de microorganismos postcosecha en productos hortofrutícolas. Reporte de Prácticas Profesionales. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos, México. 33 p.
- Snowdon, A. L. 1990. A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetable Vol.1. General Introduction & Fruits. CRC Press. London, UK. 302 p.