

EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN IN VITRO DE EXTRACTOS DE MUÉRDAGO ANTE HONGOS FITOPATÓGENOS EN MEDIO LÍQUIDO

¹ Edgar Fabian Macias Gómez, lrs17110367@purisima.tecnm.mx²
Braulio Ledezma Castro, Alumno, lrs17110633@purisima.tecnm.mx³
José de Jesús Flores Sierra, jesus.fs@purisima.tecnm.mx
⁴ Luis Ángel Xoca Orozco, luis.xo@purisima.tecnm.mx*

RESUMEN

En esta investigación se analiza la inhibición del desarrollo de hongos fitopatógenos en medio líquido para determinar posibles mecanismos de acción de la actividad antifúngica in vitro de extractos de muérdago. Esto permitirá obtener conocimiento que coadyuvará al planteamiento de sistemas de aprovechamiento del muérdago que es considerada una planta parásita difícil de erradicar y que afecta de manera considerable especies vegetales del Área Natural Protegida del Cerro del Palenque de Purísima del Rincón Gto. Se evaluará el desarrollo in vitro en medio líquido de los fitopatógenos por medio de la producción de biomas. Posteriormente se realizará la extracción de material genético para evaluar la expresión de genes. Con el conocimiento generado sobre los mecanismos de acción de la actividad antifúngica del muérdago se podrán plantear sistemas de aprovechamiento que pueden ayudar a establecer estrategias para optimizar su control, dándole un valor agregado, así como también se plantearán estrategias para el control de fitopatógenos utilizando metabolitos secundarios de plantas considerados como una alternativa amigable y sin riesgos al medio ambiente.

PALABRAS CLAVE

Antifúngico
Planta parásita
Psittacanthus calyculatus
Colletotrichum gloeosporioides
Fusarium

ABSTRACT

In this research, the inhibition of the development of phytopathogenic fungi in a liquid medium is analyzed to determine possible mechanisms of action of the in vitro antifungal activity of mistletoe extracts. This will allow obtaining knowledge that will contribute to the approach of systems for the use of mistletoe, which is considered a parasitic plant that is difficult to eradicate and that considerably affects plant species of the Protected Natural Area of Cerro del Palenque in Purísima del Rincón Gto. The in vitro development in liquid medium of the phytopathogens will be evaluated through the production of biomass. Subsequently, the extraction of genetic material will be carried out to evaluate the expression of genes. With the knowledge generated about the mechanisms of action of the antifungal activity of mistletoe, utilization systems can be proposed that can help establish strategies for its control, in addition to optimizing its control, as well as strategies for the control of phytopathogens. using secondary plant metabolites considered as a friendly alternative without risks to the environment.

KEYWORDS

Antifungal
Parasitic plant
Psittacanthus calyculatus
Colletotrichum gloeosporioides,
Fusarium

1,2 TECNM, Campus Purísima del Rincón / Estudiantes
3,4 TECNM, Campus Purísima del Rincón / Docentes

I. INTRODUCCIÓN

El muérdago (*Psittacanthus calyculatus*) es una planta hemiparásita que crece y se desarrolla sobre varias especies de árboles frutales y forestales en el centro y sur de México (Azpeitia & Lara, 2006). Por los impactos que ocasiona el muérdago a diversas especies forestales y frutales, es considerada como plaga, pues parasita algunas especies como encino (*Quercus* spp.), huizache (*Acacia* spp), mezquite (*Prosopis* spp), especies presentes en el Área Natural Protegida del Cerro del Palenque (De acuerdo a lo establecido en la 11a sesión ordinaria del Comité de Área Natural Protegida Cerro del Palenque (DRN. Dirección de Recursos Naturales, 2017)).

Se ha determinado de manera experimental que esta especie de muérdago contiene grupos funcionales correspondientes a hidroxilos fenólicos, flavonoides, monosacáridos, antocianinas, flavonas, flavonoles e isoflavonas (Rodríguez Acosta, 2013). La mayoría de estos compuestos presentan propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígena, quelante de metales y antioxidante (Kabera et al., 2014; Moustapha et al., 2011). Debido a sus componentes hacen que esta especie de muérdago pueda ser una fuente importante de compuestos que le confieren actividad antimicrobiana la cual se ha probado en microorganismos patógenos al humano (Jacobo-Salcedo et al., 2011). El desarrollo de productos antifúngicos de origen natural para la agricultura es una excelente alternativa para sustituir los fungicidas químicos tradicionales los cuales presentan severos daños al medio ambiente y a la salud del consumidor.

Actualmente la información sobre la capacidad antifúngica de *P. calyculatus* sobre fitopatógenos es prácticamente nula, sin embargo, ya se cuentan con estudios preliminares en el laboratorio del Instituto Tecnológico Superior de Purísima del Rincón donde se han obtenido resultados positivos que confirman que algunos extractos del muérdago tienen actividad antifúngica, en medio líquido, ante la inhibición in vitro del diferentes fitopatógenos, es por eso que el planteamiento de este proyecto es para obtener más evidencias para validar las estas propiedades.

II. METODOLOGÍA

Obtención de muestras de muérdago. El muérdago será obtenido del Área Natural Protegida del Cerro del Palenque, con ayuda de la Dirección de Ecología de Purísima del Rincón Gto,

Fitopatógeno de estudio. Se trabajó *Colletotrichum gloeosporioides*, aislado de frutos de aguacate con síntomas de antracnosis, aislado de trabajos previos (L. A. Xoca-Orozco et al., 2018; L.-Á. Xoca-Orozco et al., 2017), *Fusarium* spp., y *Penicillium* spp aislados de frutos de uva.

Preparación de muestras de muérdago. Se realizó una separación de hojas, tallos y flores, se realizará el pesadode las hojas. Posteriormente se llevará a un proceso de secado a temperatura de 70 °C hasta peso constante. Una vez seca las muestras fueron trituradas hasta tener un polvo finoque pase por un tamiz 0.25mm para una mayor superficie de contacto. Las muestras se mantuvieron en congelación -20°C hasta su uso.

Obtención de extractos. Se realizaron dos tipos de extracciones:

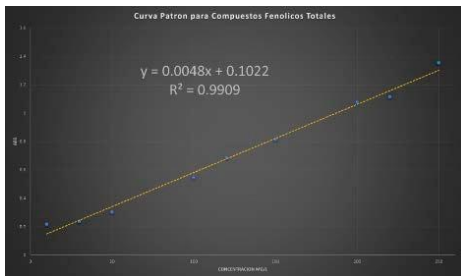
Extracto acuoso: 100 g de muestra fueron sometidos a agitación en 400 ml agua destilada estéril a temperatura ambiente durante 24 h, se filtraron en un embudo Buchner con papel filtro Whatman No.1 y finalmente se eliminará el disolvente en atmósfera reducida durante 60 min a 45°C. Los extractos se almacenarán a 4°C, en la oscuridad (Masangwa et al., 2013).

Extracto metanol/acetona/agua: Se realizó con metanol acidificado (8 mL * L-1 HCL) - agua (50-50 v/v) en una proporción de 50 mL * g-1 de muestra, para lavar durante 60 min a temperatura ambiente. Luego, la suspensión se centrifugó a 3000 g (15 min, 25°C). Se separaron las fases y se retiene el sobrenadante. El precipitado se le adicionó acetona-agua (70:30 v/v) (50 ml * g-1 de muestra) durante 60 min y se centrifugó en las mismas condiciones, se combinan los sobrenadantes de lavado de cada ronda. Posteriormente se eliminaron los disolventes en atmósfera reducida durante 60 min a 45°C. Los extractos se almacenaron a 4°C, en la oscuridad (Saura-Calixto et al., 2007).

Cuantificación compuestos fenólicos. Para evaluar la eficiencia en la extracción se determinó el contenido de fenoles totales utilizando el ensayo Folin-Ciocalteu. Para esto se utilizó un volumen de 250 µL del extracto o estándar (ácido gálico) se hizo reaccionar con 1000 µL de solución de carbonato de sodio [75 g/L]; después de 5 minutos de reacción, se adicionaron 1250 µL del reactivo Folin-Ciocalteu [100 mL/L] y la mezcla se agitó usando un vortex. La reacción fue incubada en oscuridad a 50°C por 15 min. La absorbancia fue medida a 750 nm. Los resultados fueron expresados en mg-equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto en base seca (EAG; mg/ g extracto bs) y se calcularon a partir de una curva estándar en un rango de concentración de 0.0125 a 0.2 mg/mL (Figura 1) (L. A. Xoca-Orozco et al., 2018).

Figura 1

Curva patrón para compuestos fenólicos totales.



Nota: Fuente propia

Evaluación de la actividad antifúngica. Por cada uno de los diferentes extractos se utilizaron 3 concentraciones 100%, 50% y 10% p/v. Los extractos fueron mezclados en medio líquido (Caldo de papa dextrosa) (PDC). Los tratamientos fueron inoculados con una suspensión de esporas 5×10^6 esporas mL⁻¹. Los tratamientos se mantuvieron en agitación a 140 rpm en un shaker a 26°C, tomando muestras de 15ml en los tiempos 0, 18, 21, 24, 41, 44 y 47h para cada uno de los tratamientos. Las muestras fueron filtradas a vacío en papel filtro de 0.8 µm; a los papeles filtro se les aplicó un tratamiento térmico de 1hr a 60°C para mantener un peso constante. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

II. RESULTADOS

Para la determinación de la concentración de cada extracto se realizó por diferencia de peso, para la cual se utilizó una caja Petri la cual fue sometida a un tratamiento de calor, para mantener su peso constante, luego se añadieron 10 mL por caja y por cada extracto, se mantuvieron dentro del horno por 24 h a 60 °C para asegurar la evaporación de los solventes. Las concentraciones obtenidas de los extractos fueron de 0.00862 g/mL para el extracto metanol/acetona y 0.0307 g/mL para el extracto acuoso. De acuerdo con la curva patrón, se obtuvieron la concentración de CFT (Cuantificación de Fenoles Totales) para ambos extractos en diferentes diluciones (Tabla 1)

Tabla 1

Concentraciones de CFT

Extractos	Abs	Concentración mg/ g extracto
EM 1:100	1.4182	274.1667
EM 1:1000	0.3388	49.2917
EA 1:50	0.3783	57.5208
EA 1:100	0.2624	33.3750

Observando los datos del EM (Extracto Metanol/Acetona) 1:1000, EA (Extracto Acuoso) 1:50 y EA 1:100 la concentración de Fenoles totales es muy similar, sin embargo, debido a la dilución se presenta una mayor cantidad de compuestos en los EM. En cuanto a la cuantificación de flavonoides totales se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2

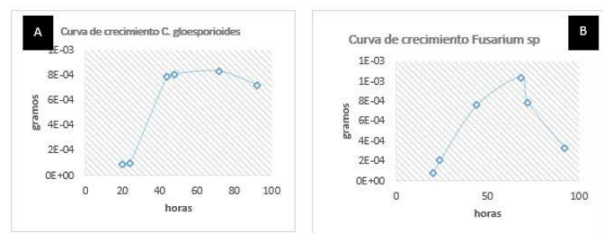
Concentración de flavonoides totales de extractos de muérdago

Extracto	Abs	concentración mg / g extracto
EM 1:100	0.0509	0.00711
EAH 1:100	0.0441	0.00213
EAF 1:100	0.0472	0.00440

De acuerdo con los valores obtenidos de flavonoides totales, el extracto Metanol-Acetona presenta una mayor concentración respecto a los extractos acuosos; sin embargo, los EAF (Extracto acuoso del Flor de muérdago) presentan una ligera diferencia estando el por encima del EAH (Extracto acuoso de Hoja). Posteriormente a la cuantificación de CFT y FT se determinaron las condiciones ideales para el crecimiento de las especies fúngicas para lo cual se utilizó Caldo de papa con dextrosa (PDL) como fuente de carbono, ajustando su pH a 3 con ácido tartárico, obteniendo la curva de crecimiento

Figura 2

A) Curva de crecimiento para *C. gloeosporioides* B) Curva de crecimiento para *Fusarium sp*

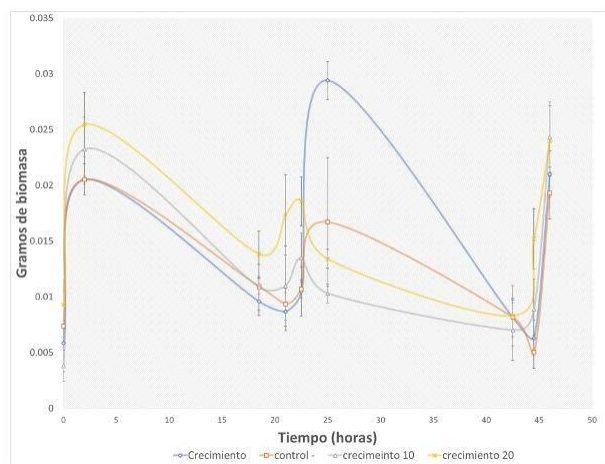


Nota: Fuente propia

A partir de los datos obtenidos se observó que en la fase exponencial para los hongos se encontraba entre las 20 y 45 h marcando un rango para la aplicación de los tratamientos de inhibición con los extractos.

Figura 3

Tratamientos para actividad antifúngica de *Penicillium* spp.



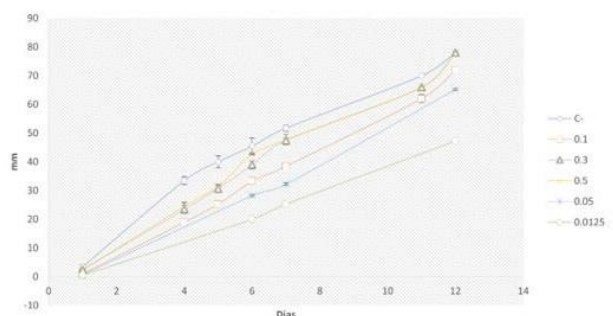
Nota: Fuente propia

Los resultados obtenidos para *Penicillium* spp (Figura 3) muestran una disminución en el crecimiento con el extracto. Para el tratamiento con el 20% EM se redujo el crecimiento en un 55% y para el tratamiento con el 10% EM se redujo el crecimiento en un 65% con respecto al crecimiento del control (+), además durante el tratamiento hubo una contaminación del control (-) ya que se presentó un aumento en masa durante el ensayo.

Al finalizar el ensayo se tomó 1 ml en tubos eppendorf estériles, los cuales se centrifugaron a 4000G por 10 min para retirar la mayor cantidad del medio y retener las esporas de la cepa de *Penicillium* después se agregaron 100 L de agua destilada, esto se realizó cada grupo de los tratamientos determinar la actividad del extracto. Posteriormente se inocularon en medio sólido PDA añadiendo 50 uL de cada grupo y se observó el crecimiento por 10 días, determinando que la actividad de los extractos es fungistáticos debido a que el crecimiento continuo después del ensayo, lo cual indico que es necesario la presencia del extracto para que se lleve a cabo la inhibición.

Figura 4

Crecimiento de *C. gloeosporioides* en PDA.

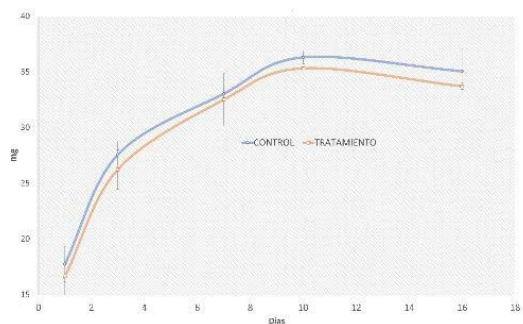


Nota: Fuente propia

Para determinar la concentración adecuada de EA para la inhibición de *C. gloeosporioides* se realizó una cinética en PDA aplicando 5 concentraciones (0.5, 0.3, 0.1, 0.05 y 0.0125 ml/L) del EM durante 12 días, encontrando que el tratamiento con la concentración de 0.0125 ml/L inhibiendo el 86% en el día 1 y 33% en el día 12 de acuerdo con el crecimiento sin tratamiento del hongo (Figura 4). A partir de los resultados obtenidos de la cinética en PDA se determinaron las condiciones para realizar la cinética en PDL. La inhibición presentada por el EA hasta el día 16 fue de 3.85% de acuerdo con el control (+) (Figura 5).

Figura 5

Crecimiento de *C. gloeosporioides* en PDL.



Nota: Fuente propia

IV. CONCLUSIONES

Psittacanthus calyculatus recolectado de árboles de mezquite del palenque tiene la capacidad de inhibir fitopatógenos como *C. gloeosporioides*, *Fusarium* spp y *Penicillium* spp de manera efectiva, exhibiendo que su actividad antifúngica y es muy prometedora para su uso como agente antimicrobiano. Este trabajo apoya aún más los usos de *P. calyculatus* como fungicida de algunos fitopatógenos.

Los rendimientos los extractos presenta mejores resultados para el EM ya que se requiere menos cantidad para llevar a cabo la inhibición de los hongos fitopatógenos, sin embargo, la utilización de solventes representa una desventaja para su reutilización ya que el metanol y la acetona quedan mezclados, lo cual agrega una etapa más al proceso para poder separarlos y reutilizarlos. El extracto aplicado en PDA tiene un mayor efecto en comparación con el PDL. Actualmente se sigue trabajando en la aplicación de diferentes tratamientos de extractos de muérdago a diferentes concentraciones en PDL.

IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azpeitia, F., & Lara, C. (2006). Reproductive biology and pollination of the parasitic plant *Psittacanthus calyculatus* (Loranthaceae) in central México. *Journal of the Torrey Botanical Society*, 133(3), 429–438. [https://doi.org/10.3159/1095-5674\(2006\)133\[429:RBAPOT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3159/1095-5674(2006)133[429:RBAPOT]2.0.CO;2)
- DRN. Dirección de Recursos Naturales. (2017). Listado florístico del Inventario de las Áreas Naturales Protegidas del Estado de Guanajuato.
- Jacobo-Salcedo, M. D. R., Alonso-Castro, A. J., Salazar-Olivo, L. A., Carranza-Alvarez, C., González-Espiñola, L. A., Domínguez, F., Maciel-Torres, S. P., García-Lujan, C., González-Martínez, M. D. R., Gómez-Sánchez, M., Estrada-Castillo, E., Zapata-Bustos, R., Medellín-Milañ, P., & García-Carrancá, A. (2011). Antimicrobial and cytotoxic effects of Mexican medicinal plants. *Natural Product Communications*, 6(12), 1925–1928. <https://doi.org/10.1177/1934578x1100601234>
- Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R., & He, X. (2014). Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(January), 377–392.
- Masangwa, J. I. G., Aveling, T. A. S., & Kritzinger, Q. (2013). Screening of plant extracts for antifungal activities against *Colletotrichum* species of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). *Journal of Agricultural Science*, 151(4), 482–491. <https://doi.org/10.1017/S0021859612000524>
- Moustapha, B., Marina, G. A. D., Raúl, F. O., Raquel, C. M., & Mahinda, M. (2011). Chemical constituents of the Mexican mistletoe (*psittacanthus calyculatus*). *Molecules*, 16(11), 9397–9403. <https://doi.org/10.3390/molecules16119397>
- Rodríguez Acosta, M. G. (2013). Comparación y análisis de extractos de *Psittacanthus calyculatus* y *Phoradendron tomentosum* para su uso en el desarrollo de alimentos funcionales para diabéticos tipo 2. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492–501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.006>
- Xoca-Orozco, L. A., Zamora-Gasga, V., Espinosa-Alonso, G., Velázquez-Estrada, R. M., López-García, U., Sáyago-Ayerdi, S., & Chacón-López, A. (2018). In vitro antioxidant and antifungal activities of carambola (*Averrhoa carambola* L), extracts. *Biotecnica*, 20(2), 104–109. <https://doi.org/10.18633/biotecnica.v20i2.608>
- Xoca-Orozco, L.-Á., Cuellar-Torres, E. A., González-Morales, S., Gutiérrez-Martínez, P., López-García, U., Herrera-Estrella, L., Vega-Arreguín, J., & Chacón-López, A. (2017). Transcriptomic Analysis of Avocado Hass (*Persea americana* Mill) in the Interaction System Fruit-Chitosan-*Colletotrichum*. *Frontiers in Plant Science*, 8(June), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00956>

