

Actividad Inhibitoria del Extracto de *Heliopsis longipes* Sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Inhibitory Activity of *Heliopsis longipes* Extract on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Susana González Morales, Departamento de Parasitología Agrícola (DPA), Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), Buenavista, Saltillo, Coah., CP 25315, México; María Liliana Flores López, Biorganix Mexicana, Aiera 240, Col. Parque Industrial, Ramos Arizpe, Coah., México; Adalberto Benavides Mendoza, Departamento de Horticultura, UAAAN; Alberto Flores Olivas, DPA, UAAAN. Correspondencia: aflooli@uaaan.mx

(Recibido: Abril 20, 2011 Aceptado: Julio 04, 2011)

González MS, Flores LML, Benavides MA y Flores OA. 2011. Actividad inhibitoria del extracto de *Heliopsis longipes* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Revista Mexicana de Fitopatología 29:146-153.

Resumen. Se obtuvieron 17 aislados de *Fusarium* sp. de raíces de tomate con síntomas de marchitez. Nueve aislados fueron identificados como *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Se determinó la patogenicidad de los aislados, uno de ellos nombrado como FOL 10 ocasionó los síntomas más severos. Dicho aislado se seleccionó para evaluar *in vitro* la dosis mínima inhibitoria del extracto etanólico de *Heliopsis longipes*. Se determinó la concentración de afinina como componente principal del extracto. La dosis letal media estimada fue de 164.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de afinina, y la dosis letal 90 fue de 348.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de afinina.

Palabras clave adicionales: Afinina, dosis letal media, tomate.

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* (FOL) es el hongo fitopatógeno distribuido en todo el mundo que causa grandes pérdidas en el cultivo de tomate. El hongo sobrevive en restos de cultivo de un ciclo a otro y posee estructuras de resistencia que le permiten perdurar en el suelo por espacio de seis años. Afecta al sistema vascular ocasionando marchitez en plantas de tomate (Ward, 1986). Existen tres razas del hongo numeradas del uno al tres, esto obedece al orden cronológico en que fueron descubiertas y en su propiedad de infectar diferentes hospederos. El manejo de la enfermedad que causa FOL es difícil, y actualmente la alternativa que se ofrece es la siembra de variedades resistentes (Janssen, 2002).

Una alternativa amigable con el medio ambiente para el control de esta enfermedad, es el uso de extractos de plantas. Algunos géneros de la familia *Heliantheae* producen diferentes tipos de alcaloides. Estos compuestos son amidas o ésteres hidrofóbicos que contienen ácidos grasos insaturados como parte de su estructura química (Johns *et al.*, 1982). Se ha demostrado que las alcaloides tienen acción biocida, especialmente en algunos insectos,

Abstract. A total of 17 *Fusarium* sp. isolates were obtained from tomato roots with wilt symptoms. Nine isolates were identified as *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*; isolates pathogenicity was determined. More severe symptoms were caused by one of the isolates named FOL10. Such isolate was selected to have the *Heliopsis longipes* ethanol extract minimum inhibitory dose evaluated *in vitro*. The affinity concentration was determined as the extract main component. The estimated median lethal dose was 164.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of affinity, and the lethal dose 90 was 348.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of affinity.

Additional key words: Affinin, median lethal dose, tomato.

The *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) is the phytopathogenic fungus distributed worldwide that causes great losses in tomato crop. The fungus survives in crop residues from one cycle to another and it has resistance structures which allow it to persist in the soil for six years, affecting the vascular system causing wilt in tomato plants, (Ward, 1986). Three races of fungus numbered from 1 to 3 exist; this is due to the chronological order in which they were discovered, as well as to their property to infect different hosts. The management of the disease that causes FOL is difficult; the alternative that is currently offered is to plant resistant varieties (Janssen, 2002).

A disease control environmentally friendly activity relies on the use of plant extracts. Different types of alkaloids are produced by some genera of the *Heliantheae* family. These compounds are amides or hydrophobic esters containing unsaturated fatty acids as part of their chemical structure (Johns *et al.*, 1982). A biocide action has been shown by the alkaloids, especially in some insects, even on the human parasite called *Schistosoma mansoni* (Frischkorm *et al.*, 1978).

The *H. longipes* is a member of the *Heliantheae* family; synthesize different toxic compounds, as the affinity, which belongs to the alkaloid group (Molina *et al.*, 1995). The affinity is the major alkaloid in the roots of

incluso sobre el parásito de humanos denominado *Schistosoma mansoni* (Frischkorm *et al.*, 1978).

H. longipes es miembro de la familia *Heliantheae*, presenta diferentes compuestos tóxicos como la afinina, que pertenece al grupo de las alcaloides (Molina *et al.*, 1995). La afinina es la alcaloide mayoritaria en las raíces de esta planta y principal responsable de los efectos biológicos específicos observados, entre los que se pueden considerar la acción de anestésico local, el estímulo organoléptico, así como la actividad insecticida y bactericida; este compuesto tiene acción biocida sobre algunas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como en algunos hongos de la clase Ascomycetes (Ramírez *et al.*, 2000; Molina *et al.*, 1996). El objetivo del presente estudio fue evaluar *in vitro* el efecto inhibitorio del extracto crudo etanólico de *H. longipes* sobre un aislado de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* obtenido e identificado de raíces de plantas de tomate con síntomas de marchitez.

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento de *Fusarium* spp. Los aislados de *Fusarium* se obtuvieron de raíces de plantas de tomate enfermas colectadas en el área de Silao, Gto., México. El aislamiento se realizó por la técnica de punta de hifa (Montiel *et al.*, 2005).

Identificación de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Los aislados con características morfológicas macroscópicas semejantes al género *Fusarium*, fueron seleccionados para su identificación a nivel de género, en base a sus características morfológicas como: macroconidias en forma de canoa, micelio, clamidiosporas y esporodocios correspondientes a *Fusarium* sp. de acuerdo con las claves de Nelson *et al.* (1983). Los aislados seleccionados con características del género *Fusarium*, se sembraron inicialmente en PDA, cuando estuvo la caja totalmente invadida por el crecimiento, se agregaron 10 mL del líquido crioprotector (glicerol al 10% - leche descremada al 5%) y se raspó el micelio hasta que se desprendiera y se mezclara con el líquido. Posteriormente, se colocó esta mezcla en tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles, y se almacenaron a -72°C (Henao *et al.*, 2006).

Para llevar a cabo la identificación de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, se realizó la extracción de ADN de las cepas de *Fusarium*, mediante la técnica de Lee *et al.* (2000). Para la identificación de FOL por medio de PCR, se utilizaron los primers CNL12 (5'-CTGAACGCCTCTAAGTCAG-3') y CNS 1 (5'-GAGACAAGCATATGACTACTG-3') que codifican para un fragmento de la región intergénica ribosomal (IGS) ubicada entre la subunidad pequeña y la subunidad grande. La temperatura de desnaturalización fue de 94°C por 1 min, seguida de la temperatura de anillamiento de 54°C por 1 min y la temperatura de extensión a 72°C por 2 min (Hyun *et al.*, 2001). Los productos de PCR obtenidos (2.6 kb) fueron visualizados en un gel de agarosa al 2%.

Evaluación de patogenicidad. Esta prueba se utilizó para comprobar la reproducibilidad de la enfermedad inoculando las cepas aisladas en plantas de tomate, aplicando los postulados de Koch. Se utilizaron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) tipo Saladett cv., 'Río

Grande', y principalmente responsable por los efectos biológicos observados, entre los que se pueden considerar la acción de anestésico local, el estímulo organoléptico, así como la actividad insecticida y bactericida; este compuesto tiene acción biocida sobre algunas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como en algunos hongos de la clase Ascomycetes (Ramírez *et al.*, 2000; Molina *et al.*, 1996). El presente estudio tiene como objetivo evaluar *in vitro* el efecto inhibitorio del extracto crudo etanólico de *H. longipes* sobre un aislado de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* obtenido e identificado de raíces de plantas de tomate con síntomas de marchitez.

MATERIALES Y METODOS

Isolación de *Fusarium* spp. The *Fusarium* isolates were obtained from diseased tomato plants roots collected at Silao, Gto., Mexico. The isolation was carried out by means of the hyphal tip technique (Montiel *et al.*, 2005).

Identification of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. The isolates, with similar macroscopic morphological characteristics to the *Fusarium* genus, were selected for identification at genus level based on their morphological characteristics, such as canoe-shaped macro-conidia, mycelia, chlamydospores and sporodochia for *Fusarium* sp., in accordance to the keys provided by Nelson *et al.* (1983). The isolates selected with *Fusarium* genus characteristics were initially grown in PDA; 10 mL of cryoprotected liquid (glycerol at 10% - 5% skim milk) were added once the box became fully invaded by the growth; the mycelium was scraped up until it had broken off and mixed with the liquid. Subsequently, this mixture was placed in 1.5 mL sterile Eppendorf tubes, and stored at -72°C (Henao *et al.*, 2006).

The DNA extraction of *Fusarium* strains was performed in order to carry out the FOL identification by means of the Lee *et al.* (2000) technique. The primers CNL12 (5'-CTGAACGCCTCTAAGTCAG-3') and CNS 1 (5'-GAGACAAGCATATGACTACTG-3') were used for the proper identification of FOL by PCR, which encode for a fragment of the ribosomal intergenic region (RIR), located between the small subunit and the large subunit. The denaturation temperature was 94°C for 1 min, followed by the annealing temperature of 54°C for 1 min and the extension temperature at 72°C for 2 min (Hyun *et al.*, 2001). The PCR products obtained (2.6 kb) were visualized in agarose gel at 2%.

Pathogenicity evaluation. This test was used to confirm disease reproducibility by inoculating the isolated strains in tomato plants, throughout the application of the postulates of Koch; seed of tomato Saladett type (*Solanum lycopersicum*) 'Río Grande' cv., were used. The seeds were disinfected and sown in trays with a peat mixture: perlite at a 1:1 ratio. The trays were watered every three days. Once the plants had aged up to five weeks or five to six true leaves, they were inoculated by placing for PDA cylinder of 6 mm diameter with FOL near the roots, which tips were cut with sterile scissors (Benhamou and Belanger, 1998). A total of four replications (plants) were inoculated for each isolate.

Incidence and severity were measured using the Diener scale (Diener and Ausubel, 2005). This indicates the

Grande'. Las semillas se desinfectaron y se sembraron en charolas con una mezcla de turba: perlita a una proporción de 1:1. Las charolas se regaron cada tres días. Cuando las plantas tenían una edad de cinco semanas o cinco a seis hojas verdaderas, fueron inoculadas colocando cuatro cilindros de PDA de 6 mm de diámetro conteniendo a FOL cerca de las raíces, las que fueron cortadas en las puntas con tijeras estériles (Benhamou y Belanger, 1998). Se inocularon cuatro repeticiones (plantas) por cada aislado.

Se midió incidencia y severidad utilizando la escala de Diener (Diener y Ausubel, 2005). La cual indica las categorías siguientes: 0, planta muerta; 1, las hojas viejas muertas, las jóvenes crecimiento detenido; 2, las hojas viejas cloróticas, hojas jóvenes con crecimiento detenido; 3, hojas viejas tienen clorosis vascular, hojas jóvenes con crecimiento detenido; 4, los peciolo de las hojas con crecimiento detenido; 5, no hay síntomas visibles. El experimento tuvo un diseño completamente al azar, los resultados se analizaron estadísticamente en Minitab mediante la prueba de Kruskal-Wallis mostrando diferencia significativa entre tratamientos ($p=0.0002$).

Actividad inhibitoria del extracto de *H. longipes*.

El extracto de *H. longipes* se elaboró con las raíces secas y molidas de esta planta colectadas en la Sierra Gorda de Guanajuato. Para obtenerlo, se usó una proporción de 1:10, esto es 1 g de raíz macerada por cada 9 mL de solvente, el cual fue etanol al 98%. El extracto se obtuvo al exponer el tejido macerado al solvente a temperatura ambiente durante 30 días. El extracto crudo se filtro con un papel filtro Whatman No. 1 y se concentró en rotavapor (IKA). La determinación de la concentración de afinina se llevó a cabo por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC, donde la afinina se purificó a partir del extracto crudo mediante cromatografía en capa fina (TLC), sobre capas de vidrio 20x20 cm cubiertas con una capa de gel de sílice de aproximadamente 0.5 mm de espesor. La muestra de extracto en las placas se corrió con el sistema de solventes constituidos por una mezcla de hexano:acetato de etilo (2:1 v/v), posteriormente se secaron a temperatura ambiente y se asperjaron con una solución de fluoresceína al 0.02% y se observó bajo luz ultravioleta. La retención relativa de la afinina es de 0.5, dicha banda se colectó y se eluyó con acetato de etilo, el cual posteriormente se evaporó. La fracción se resuspendió en etanol y se analizó en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución, en una columna C18, como fase móvil se utilizó acetonitrilo:agua en un gradiente de 40 a 70%, con un tiempo de corrida de 40 min a un flujo de 1 mL min⁻¹. El tiempo de retención fue de 23 min correspondiente a la afinina (Ramírez *et al.*, 2000). El extracto fue almacenado en oscuridad a 4°C.

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) *in vitro* se utilizaron cinco concentraciones del extracto con base a la cantidad de afinina (75, 150, 300, 600 y 1200 µg mL⁻¹), cada concentración se agregó a medio PDA, se colocó un cilindro de PDA de 6 mm de diámetro conteniendo a FOL y se incubó a 28°C. El diámetro del micelio se midió cada 24 h, hasta que el control alcanzó el límite del borde de la caja Petri. Se realizaron 10 repeticiones de cada concentración con un diseño

following categories: 0, dead plant; 1, the dead old leaves, the young leaves with growth on hold; 2, the chlorotic old leaves, the young leaves with growth on hold; 3, old leaves with vascular chlorosis, the young leaves with growth on hold; 4, the leaves petioles with growth on hold; 5, no visible symptoms. The experiment was randomly designed; the results were statistically analyzed in Minitab by the Kruskal-Wallis test, having a significant difference revealed among treatments ($p=0.0002$).

Inhibitory activity of the *H. longipes* extract. The *H. longipes* extract was made with dried and ground roots of this plant, previously collected from the Guanajuato Sierra Gorda; to do so, a 1:10 ratio was used, which is 1 g macerated root per each 9 mL of solvent, which was ethanol at 98%. The extract was obtained by exposing the solvent-soaked tissue at room temperature for 30 days. The crude extract was filtered with a Whatman No. 1 filter paper and concentrated in a rotary evaporator (IKA). The determination of affinin concentration was conducted by high resolution liquid chromatograph (HPLC), where the affinin was purified from crude extract by thin layer chromatography (TLC), on 20x20 cm glass layers covered with a silica gel layer of approximately 0.5 mm thickness. The extract sample on the plates was run with the solvent system, which consisted of a hexane mixture: ethyl acetate (2:1 v/v); then dried at room temperature and sprayed with a 0.02% fluorescein solution and observed under ultraviolet light. The affinin relative retention is 0.5; this band was collected and eluted with ethyl acetate, which subsequently evaporated. The fraction was re-suspended in ethanol and analyzed in a HPLC, in a C18 column; acetonitrile was used as mobile phase: water in a 40 to 70% gradient, with a 40 min running time at a 1 mL min⁻¹ flow rate. The retention time for the affinin was 23 min (Ramírez *et al.*, 2000). The extract was stored in the dark at 4°C.

Five extract concentrations, based on the amount of affinin (75, 150, 300, 600 and 1200 µg mL⁻¹), were used in order to determine the inhibitory minimum concentration (IMC) *in vitro*; each concentration was added to a PDA medium, having a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 6 mm explant placed and incubated at 28°C. The mycelia diameter was measured every 24 h until the control reached the limit by the edge of the Petri dish. A total of 10 replicates of each concentration were performed with a completely randomized design. The IMC was determined by means of the PROBIT SAS 9.1 program; an ANOVA, as well as a mean test in GraphPad 3.0, were carried out.

RESULTS

Identification of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL). A total of 17 isolates were obtained as a result of the *Fusarium* isolation in accordance to both its macroscopic and microscopic morphology. Nine out of those (0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 and 17) were identified as FOL by means of PCR amplification, using the primers CNL12 and CNS1 (Figure 1). The fragment amplified by PCR was 2.6 kb; this fragment corresponds to FOL, in line with those reported by Hyun *et al.* (2001). Although it had been previously reported by Alves *et al.* (1999) that two IGS exist in *F.*

completamente al azar. Se determinó la CMI con el programa PROBIT SAS 9.1 y se realizó un ANOVA y prueba de medias en GraphPad 3.0.

RESULTADOS

Identificación de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Como resultado del aislamiento de *Fusarium* según su morfología macro y microscópica se obtuvieron 17 aislados. Nueve de ellos (0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 y 17) fueron identificados como *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* por medio de amplificación por PCR, usando los primers CNL12 y CNS1 (Figura 1). El fragmento amplificado por PCR fue de 2.6 kb, este fragmento corresponde a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* acorde con lo reportado por Hyun *et al.* (2001). Aunque Alves *et al.* (1999) reporta que existen dos IGS en aislados de *F. oxysporum*, la IGS pequeña (2.55 kb) y la grande (2.6 kb).

Patogenicidad. La incidencia de la enfermedad fue mayor al 75% en la mayoría de los aislados (Cuadro 1). La severidad varió de 0-5 con respecto a la escala de Diener. Mostrando una gran variación en virulencia en los diferentes aislados, que se manifestó en la severidad de los síntomas.

Efecto inhibitorio. Para la prueba *in vitro* de inhibición del extracto de *H. longipes* sobre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, se seleccionó el aislado 10 (el cual se denominó FOL10), ya que fue positiva en la identificación por PCR, y fue la cepa que presentó la sintomatología más severa en la prueba de patogenicidad, el valor de severidad fue de 0 (planta muerta).

El extracto de *H. longipes* se concentró un 95% y la

oxysporum isolates, the small IGS (2.55 kb) and the big one (2.6 kb).

Pathogenicity. Disease incidence was greater than 75% in most of the isolates (Table 1). Severity ranged from 0-5 with regards to the Diener scale, showing a large virulence variation in different isolates, which was reflected on the symptoms severity.

Inhibitory effect. The 10 isolate was selected for the *H. longipes* extract inhibition *in vitro* test on FOL, since it had been positive to PCR identification and it had turned as the strain revealing the most severe symptoms in the pathogenicity test; the severity value was 0 (dead plant).

The *H. longipes* extract was concentrated to 95%, and the amount of affinin was 5.5 mg mL⁻¹. The FOL10 identified isolate, which was the isolate revealing the highest severity level on the damage, was used to determine *H. longipes* extract inhibitory minimum concentration on FOL. The inhibition percentages of the different affinin concentrations in *H. longipes* extract on FOL are shown in Figure 2. A 100% inhibition was revealed by the 600 and 1200 µg mL⁻¹ affinin doses. The median lethal dose (DL₅₀) was 164.2 with 133.9-199.9 µg mL⁻¹ fiducial limits (corresponding a 95% reliability); the lethal dose 90 (DL₉₀) was 348.6 (273.3-524.2 fiducial limits) µg mL⁻¹.

A 100% inhibition was revealed by the 600 µg mL⁻¹ concentration at the end of the test, as the absolute control completely filled the Petri dish. Growth was revealed by FOL10 after 32 days at the same incubation temperature, which is why the inhibition percentage decreased to 89%. It is shown by the results that the *H. longipes* extract behaves

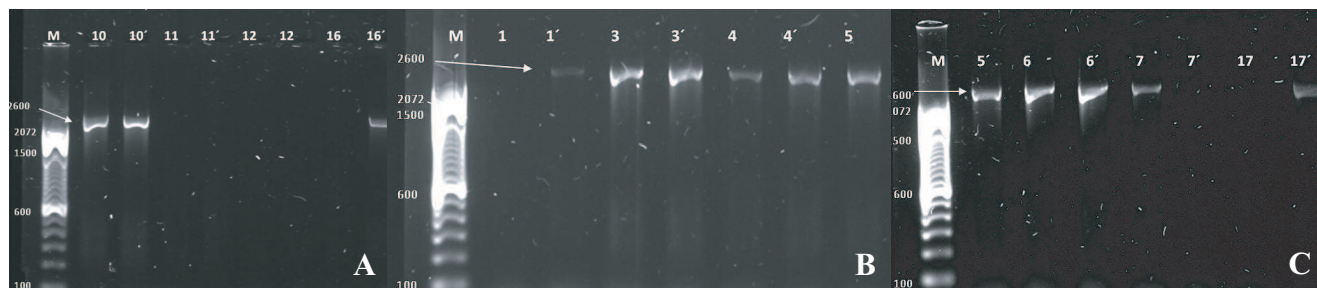


Figura 1. Identificación de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, mediante PCR utilizando los primers CNL12 y CNS1 en gel de agarosa al 2%. A. Carril 1, marcador molecular; carril 2 y 3, aislado 10 (10' es una repetición de aislado 10); carril 4 y 5, aislado 11 (11' es una repetición de aislado 11); carril 6 y 7, aislado 12 (12' es una repetición de aislado 12); carril 8 y 9, aislado 16 (16' es una repetición de aislado 16). B. Carril 1, marcador molecular; carril 2 y 3, aislado 1 (1' es una repetición de aislado 1); carril 4 y 5, aislado 3 (3' es una repetición de aislado 3); carril 6 y 7, aislado 4; carril 8, aislado 5. C. Carril 1, marcador molecular; carril 2, aislado 5 (5' es una repetición de aislado 5); carril 3 y 4, aislado 6 (6' es una repetición de aislado 6); carril 5 y 6, aislado 7 (7' es una repetición de aislado 7); carril 7 y 8, aislado 17 (17' es una repetición de aislado 17).

Figure 1. Identification of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, by PCR using the primers CNL12 and CNS1 in agarose gel at 2%. A. Lane 1, molecular marker; lanes 2 and 3, isolate 10 (10' is a repetition of isolate 10); lanes 4 and 5, isolate 11 (11' is a repetition of isolate 11); lanes 6 and 7, isolate 12 (12' is a repetition of isolate 12); lanes 8 and 9, isolate 16 (16' is a repetition of isolate 16). B. Lane 1, molecular marker; lanes 2 and 3, isolate 1 (1' is a repetition of isolate 1); lanes 4 and 5, isolate 3 (3' is a repetition of isolate 3); lanes 6 and 7, isolate 4; lane 8, isolate 5. C. Lane 1, molecular marker; lane 2, isolate 5 (5' is a repetition of isolate 5); lanes 3 and 4, isolate 6 (6' is a repetition of isolate 6); lanes 5 and 6, isolate 7 (7' is a repetition of isolate 7); lanes 7 and 8, isolate 17 (17' is a repetition of isolate 17).

Cuadro 1. Incidencia y severidad de 17 aislados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, en plántulas de tomate.Table 1. Incidence and severity of 17 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolates in tomato seedlings.

Aislado	Severidad	Incidencia (%)
Testigo absoluto	5a	0 c
Testigo relativo	5 a	0 c
0	3 b	100 a
1	1 c	100 a
2	1 c	100 a
3	2 c	100 a
4	4 b	75 b
5	3.5 ab	100 a
6	2.5 cb	100 a
7	1.5 c	100 a
8	5 a	0 c
9	2 c	75 b
10	0 c	100 a
11	5 a	0 c
12	1.25 a	100 a
13	5 a	0 c
14	0.75 c	100 a
16	2 c	100 a
17	1.25 c	100 a

*Aislamientos que se identificaron como *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* por métodos moleculares.

Los valores seguidos de literales iguales, no tienen diferencia significativa (prueba de de Mood con un nivel de confianza del 95%).

cantidad de afinina fue de 5.5 mg mL⁻¹. El aislado identificado FOL10, que fue el que mostró mayor severidad en el daño, se usó para determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto de *H. longipes* sobre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. En la Figura 2 se muestran los porcentajes de inhibición de las diferentes concentraciones de afinina en extracto de *H. longipes* sobre FOL. Las dosis de 600 y 1200 µg mL⁻¹ de afinina presentaron una inhibición del 100%. La dosis letal media (DL₅₀) fue de 164.2 con límites fiduciales de 133.9-199.9 µg mL⁻¹ (corresponde al 95% de confiabilidad), y la dosis letal 90 (DL₉₀) fue de 348.6 (límites fiduciales de 273.3-524.2) µg mL⁻¹.

La concentración de 600 µg mL⁻¹, presentó un 100% de inhibición al final de la prueba, cuando el testigo absoluto invadió toda la caja Petri. Después de 32 días, a la misma temperatura de incubación, se presentó crecimiento de FOL10, por lo que el porcentaje de inhibición disminuyó a 89%. Los resultados obtenidos nos muestran que el extracto de *H. longipes* se comporta como agente fungistático.

Los resultados de la prueba del efecto inhibitorio con respecto a la cinética de crecimiento radial de FOL10, muestran que la producción del micelio en presencia de las diferentes concentraciones del extracto de *H. longipes* es menor que el producido en el testigo absoluto (Figura 3).

Otra forma de representar la cinética es considerando el incremento en el número de células en un intervalo corto de tiempo. El incremento del número de células por unidad de tiempo es proporcional al número de células presentes en

as afungistatic agent.

It is shown by the test results of the inhibitory effect, with regards to the kinetics of FOL10 radial growth, that the mycelium production in the presence of different *H. longipes* concentrations is lower that produced in the absolute control (Figure 3).

Another way to represent the kinetics is by considering the increase in the number of cells in a short time. The increased number of cells per time unit is proportional to the number of cells in culture. The proportionality constant (μ) is called the specific growth rate (SGR), which is defined as the microbial specific growth rate given by the inverse of time. Each treatment linear equations obtained from the kinetics of growth are shown in Table 2, as well as FOL10 SGR; for the 600 and 1200 µg mL⁻¹ afinin concentrations (0 day⁻¹), there is a 100% decrease with regards to the absolute control (0.6775 day⁻¹); in the 300 µg mL⁻¹ afinin concentration (0.165 day⁻¹), there is a 24.3% decrease with regards to the absolute control (0.6775 day⁻¹).

DISCUSSION

Currently, afinin fungistatic effect over some microorganisms has been studied; a 90% growth inhibition was obtained on the strain of FOL with a 348 µg mL⁻¹ afinin dose in the study hereby. Regarding other microorganisms, Ramírez *et al.* reported in 2000 that it requires a 25 µg mL⁻¹ afinin to reach a 90% growth inhibition on *Sclerotium rolfsii*, and 28 µg mL⁻¹ for *Sclerotium cepivorum*; a 38% growth inhibition was reached for *Fusarium* sp. with 150 µg mL⁻¹ afinin A 100% growth inhibition was reached for *Rizoctonia solani* AG-3 with 150 µg mL⁻¹ afinin; a 45% growth inhibition was reached by *Verticillium* with the same concentration sp. (Molina *et al.*, 2004). This indicates that the afinin fungistatic action differs considerably, depending on the microorganism that is evaluated.

A 100% decrease was revealed by the SGR of FOL10 with the 600 and 1200 µg mL⁻¹ afinin concentrations, with regards to the absolute control, compared to Quintana *et al.* (2010), who reported that a moderate effect on the fungal biomass production was caused by the *Datura stramonium* methanol extract, finding statistically similar values ($p < 0.05$) with regards to the control. The SGR of the fungus growth was 0.040 for methanol control, and 0.037 mg h⁻¹ per cm² for the *D. stramonium* methanol extract, showing a 7.5% decrease.

It is considered that the growth specific rate depends only on the substrate concentration, presenting an inhibition with high concentrations as well, same as many toxic substances at the levels of cell wall, cell membrane, transportation system, nucleic acids replication, and protein synthesis, among other important cell cycle processes (Vargas *et al.*, 2002).

The afinin action mechanism as a fungicidal or fungistatic is still unknown. This may be due to the activity inhibition of the hidroxidecanoildehydratase (HDDase) enzyme, which initiates the route of fatty acids desaturation (palmitic, stearic, oleic and linoleic acids), and it is specifically inhibited by the 3-decinoil-N-acetyl cysteamine (Ramírez *et al.*, 2000).

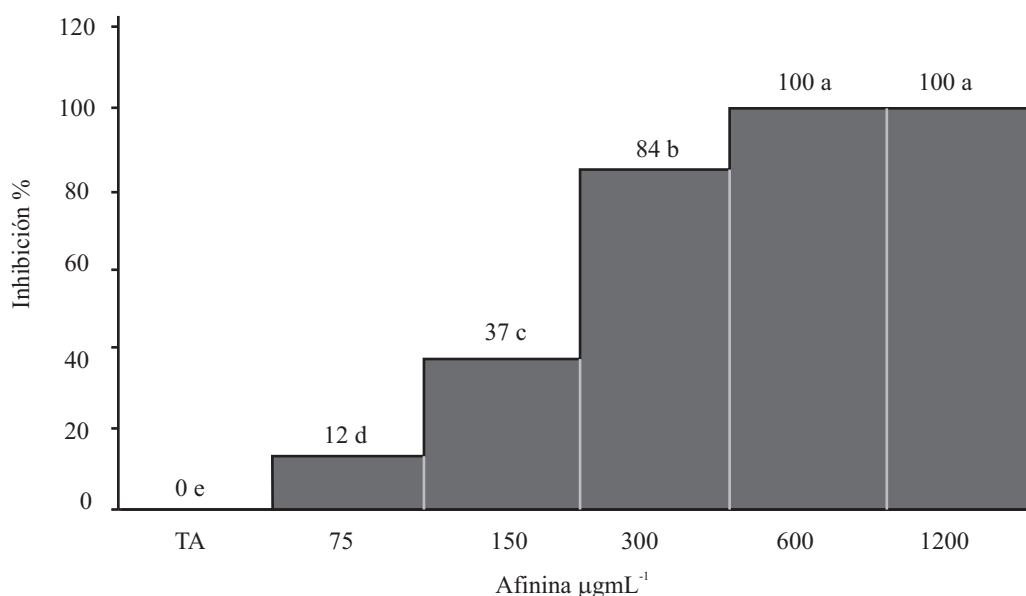


Figura 2. Porcentaje de inhibición del extracto crudo concentrado de *H. longipes* sobre el *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Los valores con literales iguales, no tienen diferencia significativa entre ellas (Tukey $\alpha < 0.05$).

Figure 2. Inhibition percentage of the *H. longipes* concentrate crude extract on *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Same literal values do not have a significant difference among them (Tukey $\alpha < 0.05$).

el cultivo. A la constante de proporcionalidad (μ) se le denomina tasa específica de crecimiento (TEC), que se define como la velocidad específica de crecimiento microbiano, dado por el inverso del tiempo. En el Cuadro 2, se muestran las ecuaciones lineales de cada tratamiento obtenidas de la cinética de crecimiento, y la TEC de FOL10; para las concentraciones de 600 y 1200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de afinina (0 día^{-1}) hay una disminución del 100% con respecto al testigo absoluto (0.6775 día^{-1}), y en la de concentración de 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de afinina (0.165 día^{-1}) hay una disminución del 24.3% con respecto al testigo absoluto (0.6775 día^{-1}).

DISCUSIÓN

Actualmente se ha estudiado el efecto fungistático de la afinina sobre algunos microorganismos, en el presente trabajo obtuvimos una inhibición del 90% sobre el crecimiento de la cepa de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* con una dosis de 348 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de afinina. Respecto a otros microorganismos, Ramírez *et al.* en el 2000 reportan que se requieren 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de afinina para inhibición del 90% sobre el crecimiento de *Sclerotium rolfsii* y 28 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *Sclerotium cepivorum*; para *Fusarium* sp. una inhibición del 38% del crecimiento con 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de afinina. Para *Rizoctonia solani* AG-3 un 100% de inhibición con 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de afinina y *Verticillium* sp. 45% de inhibición a la misma concentración (Molina *et al.*, 2004). Esto nos indica que la acción fungistática de la afinina, varía de manera considerable según el microorganismo que se evalúe.

La TEC de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 10 con las concentraciones 600 y 1200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de afinina mostró una disminución del 100% con respecto al testigo absoluto, en comparación con Quintana *et al.* (2010) quienes reportan que el extracto metanólico de *Datura stramonium* causó un efecto moderado en la producción de biomasa del hongo,

Even though in the *H. longipes* extract the major compound is affinin, other bioactive compounds, in the crude extract, may be also involved. Differences between the purified affinin and the crude extract have been reported by Ramírez *et al.* (2000), concerning their capacity to reduce fatty acids accumulation (palmitic, stearic, oleic and linoleic acids), in *S. rolfsii* mycelium. Likewise, the inhibitory effect may be due to the presence of secondary metabolites, such as alkaloids and phenols that are produced by plants as a defense against a microbial attack, in this case, the fungus, consequently, they have been named by some authors as antifungal compounds (Hernández *et al.*, 2007; Montes *et al.*, 2000). One of the advantages of obtaining substances such as affinin, which is produced by plant biosynthesis, is that they do not have any known side effects on the ecosystem, due to the fact that they can be metabolized by either one or another organism, unlikely chemical fungicides that are still currently applied.

CONCLUSIONS

A total of nine FOL isolates were obtained, which revealed a high virulence variation. The *H. longipes* crude extract inhibitory effect on FOL10 was revealed, showing that a 100% inhibition was reached at 600 and 1200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ affinin concentrations, as well as a SGR value for these of 0 days $^{-1}$. This indicates the potential inhibition that *H. longipes* extract holds over *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, which is a relevant pathogen in tomato crop.

LITERATURA CITADA

Alves SM, Eslava AP and Diazminguez JM. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. Applied and Environmental Microbiology 65:3335-3340.

Cuadro 2. Tasa específica de crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 10 en presencia del extracto etanólico de *H. longipes*.

Table 2. Specific growth rate of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 10 in the presence of *H. longipes* ethanol extract.

Tratamiento	Ecuación lineal	Tasa específica de crecimiento
TA	$y=0.6775x + 2.7314$	0.6775 día ⁻¹
75 ppm	$y=0.7289x + 0.9414$	0.72289 día ⁻¹
150 ppm	$y=0.5693x + 0.3257$	0.5693 día ⁻¹
300 ppm	$y=0.165x + 0.2557$	0.165 día ⁻¹
600 ppm	$y=0$	0 día ⁻¹
1200 ppm	$y=0$	0 día ⁻¹

encontrando valores estadísticamente similares ($p<0.05$) con respecto al control. La TEC de crecimiento del hongo fue de 0.040 para el control metanólico y 0.037 mg h⁻¹ por cm² para el extracto metanólico de *D. stramonium*, mostrando una disminución del 7.5%.

Se considera además que la tasa específica de crecimiento depende únicamente de la concentración de sustrato y presenta inhibición con altas concentraciones del mismo, tal como sucede con muchas sustancias tóxicas a nivel de pared celular, de membrana celular, de sistema de transporte, de replicación de ácidos nucleicos, de síntesis de proteínas, entre otros procesos importantes en el ciclo celular (Vargas *et al.*, 2002).

El mecanismo de acción de la afinina como fungicida o fungistático todavía se desconoce. Pudiera ser por la inhibición de la actividad de la enzima hidroxidecanoil-deshidratasa (HDDasa), esta enzima inicia la ruta de desaturación de ácidos grasos (ácido palmítico, esteárico, oleico y linoleico) y es inhibida específicamente por el 3-decinoil-N-acetil cisteamina (Ramírez *et al.*, 2000).

Aunque el compuesto mayoritario del extracto de *H. longipes* es la afinina, es posible que participen otros compuestos bioactivos presentes en el extracto crudo. Sobre ello, Ramírez *et al.* (2000) reportaron diferencias entre la afinina purificada y el extracto crudo, en cuanto a su capacidad de reducir la acumulación de los ácidos grasos (palmítico, esteárico, oleico y linoleico) en el micelio de *S. rolfssii*. De igual manera, el efecto inhibitorio se puede deber a la presencia de metabolitos secundarios, como los alcaloides y fenoles, producidos por las plantas como defensa ante el ataque microbiano, en este caso los hongos, por lo que han sido nombrados por algunos autores como compuestos antifúngicos (Hernández *et al.*, 2007; Montes *et al.*, 2000). Una de las ventajas de obtener sustancias tales como la afinina, producidas por biosíntesis de plantas, es que no tienen efectos secundarios conocidos en el ecosistema, dado que pueden ser metabolizados por uno u otro organismo, a diferencia de los fungicidas químicos comúnmente aplicados hasta ahora.

CONCLUSIONES

Se lograron obtener nueve aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, los cuales mostraron una gran

Benhamou N and Belanger R. 1998. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. *Plant Physiology* 118:1203-1212.

Diener AC and Ausubel FM. 2005. Resistance to *Fusarium oxysporum* 1, a dominant *Arabidopsis* disease-resistance gene, is not race specific. *Genetics* 171:305-321.

Frischkorm CG, Frischkorm HE and Carrazzoni E. 1978. Cercaricidal activity of some essential oils of plants from Brazil. *Naturwissenschaften* 65:480-483.

Henao I, Franco CM y Marin G. 2006. Evaluación de métodos de conservación para *Aspergillus niger* con actividad enzimática amilolítica. *Universitas Scientiarum* 11:51-60.

Hernández AR, Barrera NL, Bautista BS and Bravo LL. 2007. Antifungal potential of crude plant extracts on conidial germination of two isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. Y Sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25:180-185.

Hyun JK, Yong K C, and Byung R M. 2001. Variation of the intergenic spacer (IGS) region of ribosomal DNA among *Fusarium oxysporum* formae specialis. *Journal of Microbiology* 39:265-272

Janssen D. 2002. Tomatoes: Possible Causes of Sudden Wilt and Deathfile. University of Nebraska. <http://lancaster.unl.edu/hort/Articles/2002/TomatoWilt.htm> (consulta, febrero 2011).

Johns T, Graham K and Towers GHN. 1982. Mulluscicidal activity of affinin and other isobutylamides from the *Asteraceae*. *Phytochemistry* 21:2737-2738.

Lee YM, Choi YK and Min BR. 2000. PCR-RFLP and sequence analysis of the rDNA ITS region in the *Fusarium* spp. *Journal of Microbiology* 38:66-73.

Molina TG, Salgado GR and Ramírez CE. 1995. Presence of the bornyl ester of deca-2E-6Z-8E-trienoic acid in *Heliopsis longipes*. *Journal of Natural Products* 58:1590-1591.

Molina TG, Salgado GR, Ramírez CE and Del Río REN. 1996. Purely olefinic alkamides in *Heliopsis longipes* and *Acmella (Spilanthes) oppositifolia*. *Biochemical Systematic Ecology* 24:43-47.

Molina TJ, Salazar CCJ, Armenta SC and Ramírez CE. 2004. Fungistatic and bacteriostatic activities of alkamides from *Heliopsis longipes* Roots: Affinin and reduced amides. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 52:4700-4704.

Montes BR, Cruz CV, Martínez MG, Sandoval GG, García LR, Zilch DS, Bravo LL, Bermudez TK, Flores MH y Carvajal MM. 2000. Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo en investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18:125-131.

Montiel GL, González FF, Sánchez GBM, Guzmán RS, Gamez VFP, Acosta GJA, Rodríguez GR, Simpson WJ, Cabral EM y Mendoza EM. 2005. Especies de *Fusarium* presentes en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con daños de pudrición, en cinco estados del centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:1-7.

Nelson PE, Toussoun TA and Marasas WFO. 1983

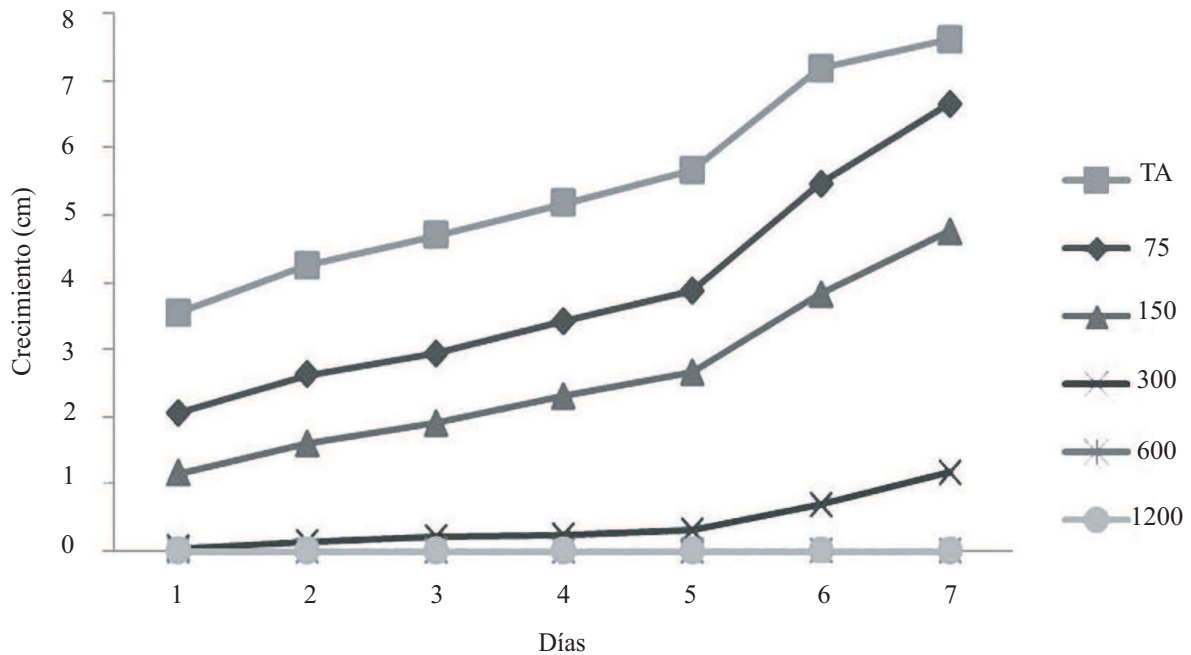


Figura 3. Cinética de crecimiento (diámetro) de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 10 en medio PDA con las diversas concentraciones de afinina del extracto de *H. longipes*.

Figure 3. Kinetics of growth (diameter) of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 10 in PDA medium with various *H. longipes* extract affinin concentrations.

variación en virulencia. Se demostró el efecto inhibitorio del extracto crudo de *H. longipes* sobre FOL10, mostrando que a concentraciones de 600 y 1200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de afinina se presentó una inhibición del 100% y un valor de TEC para estas concentraciones de 0 días⁻¹. Esto nos indica el potencial de inhibición que tiene el extracto de *H. longipes* sobre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* que es un patógeno importante del cultivo tomate.

Ward EWB. 1986. Biochemical mechanisms involved in resistance of plants to fungi. *Biology and Molecular Biology of Plant Pathogen Interactions*. Springer-Verlag. Berlin-Herdelberg Pp:107-131.

Fusarium Species. An Illustrated Manual for Identification. The

Pennsylvania State University Press. 193p.

Quintana OEA, Plascencia JM, Burgos HA, Guerrero RJ, Parra VNV y Cortez RMO. 2010. Extracto metanólico de *Datura stramonium* para el control *in vitro* e *in vivo* de *Ramularia cercosporelloides*, agente causal de la falsa cenicilla del cártamo (*Carthamus tinctorius*). *Revista Mexicana de Micología* 31:19-27.

Ramírez CE, Lucas VL, Virgen CG y Molina TJ. 2000. Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotium*. *Agrociencia*. 34:207-215.

Vargas A, Moreno J y Buiton G. 2002. Estrategia de control de tiempo óptimo para un Sbr usando aprendizaje interactivo. Coordinaciones de Automatización y Bioprocesos Instituto de Ingeniería, UNAM. www.bvsde.paho.org/bvsaidis/aresidua/peru/mextar060.pdf (consulta, febrero 2011).