

COMPOSICIÓN DE ALCALOIDES EN SEMILLAS DE *Lupinus mexicanus* (FABACEAE) Y EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA Y ALELOPÁTICA DEL EXTRACTO ALCALOIDEO

COMPOSITION OF ALKALOIDS IN SEEDS OF *Lupinus mexicanus* (FABACEAE) AND ANTIFUNGAL AND ALLELOPATHIC EVALUATION OF THE ALKALOID EXTRACT

Francisco Zamora-Natera¹, Pedro García-López¹, Mario Ruiz-López¹ y Eduardo Salcedo-Pérez²

¹Departamento de Botánica y Zoología, ²Departamento de Madera Celulosa y Papel. Universidad de Guadalajara. 45110. Km. 15.5. Carretera Guadalajara-Nogales. Las Agujas, Zapopan. Jalisco, México (jzamora@cucba.udg.mx)

RESUMEN

Las plantas sintetizan metabolitos secundarios que se pueden aislar y usar en la agricultura como una alternativa para el control de plagas y enfermedades. Se analizó por cromatografía de gases capilar-espectrometría de masas (CG-EM) la composición de alcaloides en semillas de *Lupinus mexicanus*; así mismo se estudió *in vitro* la actividad antifúngica y alelopática del extracto crudo de alcaloides. La acción antifúngica del extracto se evaluó con base en la inhibición del crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*, mientras que la actividad alelopática se evaluó sobre la germinación de semillas de *Amaranthus hybridus* y *Echinochloa crus-galli*. El análisis de alcaloides del extracto reveló la presencia de lupalina, 3 β -hidroxilupalina, multiflorina afilina, epiafilina y α -isolupalina como compuestos mayoritarios. El extracto, a concentración de 3 mg mL⁻¹, inhibió significativamente el crecimiento micelial de *R. solani* en 87.7%, mientras que el micelio de *S. rolfsii* sólo se inhibió 72.5% con la concentración más alta. Sólo la germinación de semillas de *A. hybridus* mostró diferencias significativas por efecto del extracto, y la inhibición de la germinación fue 80% con la mayor concentración (1 mg mL⁻¹). La lupalina fue el alcaloide más abundante (76.2%) en el extracto de semillas de *L. mexicanus*. El extracto mostró actividad inhibitoria del crecimiento micelial de *R. solani* y *S. rolfsii*, y un efecto fitotóxico o inhibidor de la germinación de semillas de *A. hybridus*.

Palabras clave: *Lupinus*, actividad biológica, alcaloides quinolizidínicos, hongos fitopatógenos.

INTRODUCCIÓN

Los insectos, microorganismos fitopatógenos y malezas son responsables de la reducción de los rendimientos en cultivos agrícolas. Según Mohamed *et al.* (1996), las pérdidas económicas por enfermedades causadas por hongos en frutos pueden

Recibido: Marzo, 2007. Aprobado: Diciembre, 2007.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 42: 185-192. 2008.

ABSTRACT

Plants synthesize secondary metabolites that can be isolated and used in agriculture as an alternative for the control of pests and diseases. Capillary gas chromatography-mass spectrometry (CG-MS) was used to analyze the composition of alkaloids in seeds of *Lupinus mexicanus*. In addition, an *in vitro* study was made of the antifungal and allelopathic activity of the crude extract of alkaloids. The antifungal action of the extract was evaluated based on the inhibition of the mycelial growth of the phytopathogenic fungi *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*, while the allelopathic activity was evaluated on the germination of seeds of *Amaranthus hybridus* and *Echinochloa crus-galli*. The analysis of alkaloids from the extract revealed the presence of lupaline, 3 β -hydroxylupaline, multiflorine aphylline, epiaphylline and α -isolupaline as majority compounds. The extract, at the concentration of 3 mg mL⁻¹, significantly inhibited the mycelial growth of *R. solani* by 87.7%, whereas the mycelial growth of *S. rolfsii* was only inhibited 72.5% with the highest concentration. Only the germination of seeds of *A. hybridus* showed significant differences from the effect of the extract, and inhibition of germination was 80% with the highest concentration (1 mg mL⁻¹). Lupaline was the most abundant alkaloid (76.2%) in the extract of seeds of *L. mexicanus*. The extract showed inhibitory activity of the mycelial growth of *R. solani* and *S. rolfsii*, and a phytotoxic or inhibitory effect on the germination of seeds of *A. hybridus*.

Key words: *Lupinus*, biological activity, quinolizidine alkaloids, phytopathogenic fungi.

INTRODUCTION

Insects, phytopathogenic microorganisms and weeds are responsible for the reduction in yields in agricultural crops. According to Mohamed *et al.* (1996), economic losses due to diseases caused by fungi in fruits can be 5 to 50% or more. In species such as wheat or corn, yield reductions and the resulting economic losses from weeds are 30% and in some cases as much as 90% (Kogan and Pérez,

ser 5 a 50% o más. En especies como trigo o maíz las bajas de rendimiento y las consiguientes pérdidas económicas por malezas son 30% y en algunos casos hasta 90% (Kogan y Pérez, 2003). Aunque estas pérdidas se pueden reducir mediante el uso de variedades resistentes, rotación de cultivos o prácticas sanitarias, el uso de plaguicidas sintéticos para proteger los cultivos es el factor más importante para maximizar los rendimientos (Carpinella *et al.*, 2003).

Sin embargo, el uso indiscriminado de estos productos ocasiona problemas como la eliminación de enemigos naturales, surgimiento de organismos resistentes, acumulación de residuos tóxicos en productos agrícolas y contaminación del ambiente (Duke *et al.*, 2000). Esto ha motivado la búsqueda de productos alternativos en la protección de cultivos contra la acción de organismos fitopatógenos y malezas cuya actividad, selectividad y seguridad ambiental sea adecuada. Los productos naturales son menos agresivos para el ambiente y representan una fuente alternativa de plaguicidas naturales en la agricultura. Los alcaloides quinolizidínicos son un grupo importante de compuestos naturales en el género *Lupinus* (Fabaceae) (Wink, 2003). Estos metabolitos secundarios son un mecanismo de defensa contra microorganismos fitopatógenos, herbívoros y contra otras especies de plantas que causan competencia (Wink, 1998). Se han hecho estudios preliminares para conocer la actividad funguicida de polvos y extractos crudos obtenidos de semillas de *L. campestris*, *L. montanus* y *L. exaltatus* (Bravo *et al.*, 2000; Zamora *et al.*, 2002). En *L. mexicanus*, una especie silvestre con amplia distribución en Jalisco, México, y con alto contenido de alcaloides en sus semillas, no se ha estudiado la actividad biológica de estos compuestos. Por tanto, el objetivo de esta investigación fue determinar la composición de alcaloides en semillas de *L. mexicanus* y evaluar la actividad antifúngica y potencial alelopático *in vitro* del extracto de alcaloides.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las semillas de *L. mexicanus* se recolectaron en mayo de 2005 en el municipio de Lagos de Moreno, Jalisco, México. Se determinó la identidad de la especie usando el herbario del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara (Voucher No. 853). Las semillas se molieron y la harina se desengrasó con hexano en equipo soxhlet.

Extracción de alcaloides para análisis

La extracción de alcaloides se hizo según Muzquiz *et al.* (1993): 500 mg de harina se homogenizaron con 5 mL de ácido

2003). Although these losses can be reduced through the use of resistant varieties, crop rotation or sanitary practices, the use of synthetic pesticides to protect crops is the most important factor for maximizing yields (Carpinella *et al.*, 2003).

However, the indiscriminate use of these products causes problems such as the elimination of natural enemies, surging of resistant organisms, accumulation of toxic residues in agricultural products and the contamination of the environment (Duke *et al.*, 2000). This has motivated the search for alternative products for the protection of crops against the action of phytopathogenic organisms and weeds, whose activity, selectivity and environmental safety be adequate. Natural products are less aggressive for the environment and represent an alternative source of natural pesticides in agriculture. The quinolizidine alkaloids are an important group of natural compounds in the genus *Lupinus* (Fabaceae) (Wink, 2003). These secondary metabolites are a defense mechanism against phytopathogenic microorganisms, herbivores and against other plant species that cause competition (Wink, 1998). Preliminary studies have been made to know the fungicidal activity of powders and crude extracts obtained from seeds of *L. campestris*, *L. montanus* and *L. exaltatus* (Bravo *et al.*, 2000; Zamora *et al.*, 2002). In *L. mexicanus*, a wild species with wide distribution in Jalisco, México, and with high content of alkaloids in its seeds, the biological activity of these compounds has not been studied. Therefore, the objective of the present investigation was to determine the composition of alkaloids in seeds of *L. mexicanus* and to evaluate the fungicidal activity and *in vitro* allelopathic potential of the extract of alkaloids.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The seeds of *L. mexicanus* were collected in May 2005 in the municipality of Lagos de Moreno, Jalisco, México. The identity of the species was determined using the herbarium of the Instituto de Botánica of the Universidad de Guadalajara (Voucher No. 853). The seeds were ground and the flour was degreased with hexane in soxhlet equipment.

Extraction of alkaloids for analysis

The extraction of alkaloids was made according to Muzquiz *et al.* (1993): 500 mg of flour were homogenized with 5 mL of trichloroacetic acid at 5% for 1 min. The mixture was centrifuged 15 min at 2400 x g and the supernatant was decanted. The extraction was repeated twice and the volume of the three supernatants was

tricloroacético al 5% por 1 min, la mezcla se centrifugó 15 min a 2400 x g y se decantó el sobrenadante. La extracción se repitió dos veces y el volumen de los tres sobrenadantes se transfirió a embudos para alcalinizar con 0.8 mL de NaOH 10 M. Los alcaloides se extrajeron con diclorometano (3X15 mL). Los extractos crudos se concentraron en un rotavapor a 40 °C hasta sequedad. El residuo se disolvió en 1 mL de metanol y se paso por filtros Millipore de 0.45 μm .

Cromatografía de gases capilar-espectrometría de masas

Después de filtrar, 0.5 mL del extracto se mezclaron con 0.5 mL de metanol y se inyectó 1 μL de muestra a un cromatógrafo de gases capilar Perkin-Elmer Autosystem 1XL con columna capilar SPB-1 (30 m \times 0.25 mm d.i.), acoplado a un espectrómetro de masas (Perkin-Elmer Turbomass Gold). El gas acarreador fue He con un flujo de 1 mL min^{-1} ; las temperaturas del inyector y del detector fueron 240 y 300 °C. El programa de temperatura fue 180 °C 2 min, isotérmica, 180-300 °C a 5 °C min, 300 °C 10 min, isotérmica. La abundancia relativa de alcaloides se calculó considerando las áreas de los picos del cromatograma, mientras que para identificar los alcaloides se compararon los espectros de masas obtenidos con los de la biblioteca del software y con los reportados por Meibner y Wink (1991).

Obtención del extracto crudo de alcaloides para los bioensayos

Se pesaron 100 g de harina desengrasada y se homogeneizaron con 400 mL de ácido tricloroacético al 5% en agitación constante por 12 h; la mezcla se centrifugó 15 min a 2400 x g. El sobrenadante se alcalinizó con 10 mL de hidróxido de sodio 10 M en un embudo de separación, los alcaloides se extrajeron con diclorometano (3X50 mL), se recuperó la fase orgánica y se llevó a sequedad a 40 °C con rotavapor. El extracto se resuspendió en metanol, se transfirió a frascos ámbar, se evaporó el solvente y se almacenó a 4 °C hasta su utilización en los bioensayos.

Bioensayos

La actividad antifúngica *in vitro* del extracto se evaluó con base en su capacidad de inhibición del crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos *Sclerotium rolfsii* Sacc, y *Rhizoctonia solani* Kühn (cepas proporcionadas por El Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados) y *Fusarium oxysporum* Schlechtend aislado de plantas de *Agave tequilana* Weber en Zapopan, Jalisco. El extracto de alcaloides disuelto en agua destilada se adicionó a 100 mL de medio de cultivo agar papa dextrosa a concentraciones de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mg mL^{-1} . El medio se esterilizó 15 min en autoclave a 1.05 kg cm^{-2} de presión y se transfirió a cajas Petri (8.5 cm diámetro). Las cajas se inocularon con discos de micelio (0.5 cm diámetro) y se incubaron en la oscuridad a 25 °C. Cuando el micelio del hongo cubrió la superficie del medio en el testigo se retiraron todas las cajas de la estufa y se midió el diámetro del micelio. El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente

transfirió a funnels for alkanization with 0.8 mL of NaOH 10 M. The alkaloids were extracted with dichloromethane (3X15 mL). The crude extracts were concentrated in a rotavapor at 40 °C until dried. The residue was dissolved in 1 mL of methanol and passed through Millipore filters of 0.45 μm .

Capillary gas chromatography-mass spectrometry

After being filtered, 0.5 mL of the extract was mixed with 0.5 mL of methanol and 1 μL of the sample was injected into a Perkin-Elmer Autosystem 1XL capillary gas chromatograph with SPB-1 (30 m \times 0.25 mm d.i.) capillary column, coupled to a mass spectrometer (Perkin-Elmer Turbomass Gold). The gas carrier was He with a flow of 1 mL min^{-1} ; the temperatures of the injector and of the detector were 240 and 300 °C. The temperature program was 180 °C 2 min, isothermic, 180-300 °C at 5 °C min, 300 °C 10 min, isothermic. The relative abundance of alkaloids was calculated considering the areas of the peaks of the chromatogram, whereas to identify the alkaloids, a comparison was made of the spectra of masses obtained with those of the software library and with those reported by Meibner and Wink (1991).

Obtainment of the crude extract of alkaloids for the bioassays

One hundred grams of degreased flour were weighed and homogenized with 400 mL of trichloroacetic acid at 5% in constant agitation for 12 h; the mixture was centrifuged 15 min at 2400 x g. The supernatant was alkalized with 10 mL of sodium hydroxide 10M in a separation funnel, the alkaloids were extracted with dichloromethane (3X50 mL), the organic phase was recovered and was brought to dryness at 40 °C with rotavapor. The extract was re-suspended in methanol, transferred to amber jars, the solvent was evaporated, and it was stored at 4 °C until being used in the bioassays.

Bioassays

The *in vitro* antifungal activity of the extract was evaluated based on its capacity of inhibition of the mycelia growth of the phytopathogenic fungi *Sclerotium rolfsii* Sacc, and *Rhizoctonia solani* Kühn (strains provided by the Instituto de Fitosanidad of the Colegio de Postgraduados) and *Fusarium oxysporum* Schlechtend isolated from plants of *Agave tequilana* Weber in Zapopan, Jalisco. The extract of alkaloids dissolved in distilled water was added to 100 mL of potato dextrose culture medium at concentrations of 0, 1, 2, 3, 4 and 5 mg mL^{-1} . The medium was sterilized 15 min in autoclave at 1.05 kg cm^{-2} of pressure and transferred to Petri dishes (8.5 cm diameter). The dishes were inoculated with discs of mycelia (0.5 cm diameter) and incubated in darkness at 25 °C. When the mycelium of the fungus covered the surface of the medium in the control, all of the dishes were removed from the oven and the diameter of the mycelia was measured. The percentage of inhibition was calculated with the following equation: $I = [(C - T) / C] * 100$, where I is the

ecuación: $I = [(C - T) / C] * 100$, donde I es la inhibición (%), C es el diámetro del micelio en la caja Petri del testigo (0 mg mL⁻¹), y T es el diámetro del micelio en la caja del tratamiento (1, 2, 3, 4 y 5 mg mL⁻¹).

Para evaluar la actividad alelopática del extracto se usaron semillas de *Amaranthus hibrydus* y *Echinochloa crus galli*, consideradas como malezas en el valle de México (Espinosa y Sarukhán, 1998). Estas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% y se lavaron con agua destilada. Para evaluar el efecto del extracto alcaloideo sobre la germinación de las semillas se prepararon soluciones de extracto en agua destilada en concentraciones de 0.25, 0.50, 0.75 y 1.0 mg mL⁻¹. Se colocaron 40 semillas en cajas Petri sobre papel filtro (Whatman Núm. 1), se adicionaron 4 mL de cada concentración, así como 4 mL de agua destilada en el tratamiento testigo (0 ppm). Las cajas (5 por tratamiento) se incubaron 72 h en la oscuridad a 25 °C y después se registraron las semillas germinadas para cada tratamiento.

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento y las variables fueron: crecimiento micelial, y germinación de semillas. Se hizo un análisis de varianza y las medias se compararon con la prueba de Tukey (p≤0.05).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de alcaloides

En el Cuadro 1 se muestra el patrón de fragmentación de los alcaloides mayoritarios en el extracto de *L. mexicanus*, los cuales se identificaron al comparar los espectros de masas obtenidos con los espectros de la base de datos del programa y los existentes en la bibliografía (Meibner y Wink, 1991). También se identificaron algunos alcaloides minoritarios: 11,12-dehidrolupanina, 17-oxolupanina, amodendrina y 11,12-dehidro-oxoesparteína. La lupanina y 3β-hidroxi-lupanina fueron los principales alcaloides en el extracto (21.2 y 2.6 mg g⁻¹): el primero contribuyó con 76.2% y el segundo con 9.4% del contenido total, mientras que los alcaloides minoritarios representaron

inhibición (%), C is the diameter of the mycelium in the dish of the control (0 mg mL⁻¹), and T is the diameter of the mycelium in the dish of the treatment (1, 2, 3, 4 and 5 mg mL⁻¹).

To evaluate the allelopathic activity of the extract, seeds of *Amaranthus hibrydus* and *Echinochloa crus galli*, considered weeds in the Valley of México (Espinosa and Sarukhán, 1998). These were disinfected with sodium hypochlorite at 5% and were washed with distilled water. To evaluate the effect of the alkaloid extract on the germination of the seeds, solutions of extract were prepared in distilled water in concentrations of 0.25, 0.50, 0.75, and 1.0 mg mL⁻¹. Then, 40 seeds were placed in Petri dishes on filter paper (Whatman No. 1), 4 mL of each concentration were added, as well as 4 mL of distilled water in the control treatment (0 ppm). The dishes (5 per treatment) were incubated 72 h in darkness at 25 °C, and afterwards the germinated seeds of each treatment were registered.

Statistical analysis

The experimental design was completely randomized with five replicates per treatment and the variables were: mycelial growth, and seed germination. An analysis of variance was made and the means were compared with the Tukey test (p≤0.05).

RESULTS AND DISCUSSION

Analysis of alkaloids

In Table 1 it is shown the fragmentation pattern of the main alkaloids in the extract of *L. mexicanus*, which were identified when the spectra of masses were compared with the spectra of the data base of the program and those of the bibliography (Meibner and Wink, 1991). Some minority alkaloids were also identified: 11, 12-dehydrolupanine, 17-oxolupanine, ammodendrine and 11,12-dehydrooxosparteine. Lupanine and 3β-hydroxylupanine were the principal alkaloids in the extract (21.2 and 2.6 mg g⁻¹): the former contributed with 76.2% and the latter with 9.4% of the total content, whereas the minority alkaloids represented 4.5% (Table 2). According to Przybylak *et al.* (2005), lupanine is the major alkaloid in seeds

Cuadro1. Patrón de fragmentación de los alcaloides quinolizidínicos mayoritarios detectados en *L. mexicanus*.
Table 1. Fragmentation pattern of the major quinolizidine alkaloids detected in *L. mexicanus*.

Alcaloide	M ⁺	Iones característicos (% de abundancia)
Lupanina	248	136(100) 149(52) 98(28) 150(34) 248(32) 110(12)
3-β-hidroxi-lupanina	264	136(100) 264(41) 134(48) 150(41) 98(38) 110(22) 84(21)
Multiflorina	246	136(100) 246(61) 110(35) 148(17) 97(10)
Afilina	248	136(100) 97(48) 96(44) 84(35) 220(22) 248(21) 124(23)
Epiafilina	248	136(100) 137(51) 96(38) 220(37) 247(29) 248(33)
α-isolupanina	248	136(100) 149(52) 248(33) 150(31) 110(19) 84(16)

M⁺ = ion molecular.

4.5% (Cuadro 2). Según Przybylak *et al.* (2005), la lupanina es el alcaloide mayoritario en semillas de *L. rotundiflorus* y *L. exaltatus* de México, con 62.2 y 47.3%, pero estos valores son inferiores a los determinados en el presente estudio con *L. mexicanus* (76.2%).

En otras especies silvestres de México, *L. hintonii* y *L. campestris*, los alcaloides mayoritarios son 13 α -hidroxilupanina e hidroxiafilidina (Bermúdez *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2001). Estas variaciones en el perfil y composición de alcaloides en las semillas de las diferentes especies del género *Lupinus* se han relacionado con la especie, lugar y fecha de recolecta.

Actividad antifúngica

Hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el crecimiento promedio del micelio de *S. rolfisii* y *R. solani* por efecto del extracto. Las concentraciones más bajas del extracto no mostraron efectos importantes sobre el crecimiento del micelio con respecto al testigo; sin embargo, al aumentar las concentraciones hubo una reducción del crecimiento micelial con una respuesta de susceptibilidad diferente en relación con el patógeno. Así, al aumentar las concentraciones de extracto el crecimiento del micelio de *R. solani* la inhibición promedio fue 81.6, 87.7 y 100% con 3, 4 y 5 mg mL⁻¹ (Cuadro 3). Este comportamiento fue similar en *S. rolfisii*, pero la inhibición del crecimiento del micelio fue inferior al aplicar las mismas concentraciones del extracto: con 3, 4 y 5 mg mL⁻¹ el crecimiento del micelio sólo se inhibió 31, 35 y 72.5%. Esto indica que *S. rolfisii* fue menos susceptible que *R. solani* al extracto alcaloideo de *L. mexicanus*.

El crecimiento micelial de *F. oxysporum* no fue diferente ($p > 0.05$) entre tratamientos, es decir, las concentraciones del extracto no inhibieron el crecimiento de este hongo. La resistencia de *F. oxysporum* a los alcaloides de *L. mexicanus* se ha reportado al

Cuadro 2. Composición de alcaloides en el extracto obtenido de las semillas de *L. mexicanus*.

Table 2. Composition of alkaloids in the extract obtained from the seeds of *L. mexicanus*.

Alcaloide	Contenido (mg g ⁻¹)	Abundancia (%)
Lupanina	21.2	76.2
3- β -hidroxilupanina	2.61	9.2
Multiflorina	1.09	3.9
Afilina	0.79	2.8
Epiafilina	0.48	1.7
α -isolupanina	0.36	1.3
11,12-dehidrolupanina	0.19	0.07
17-oxolupanina	0.14	0.05
Amodendrina	0.13	0.04
11,12-dehidro-oxoesparteína	0.13	0.04
Contenido total de alcaloides	27.1	

of *L. rotundiflorus* and *L. exaltatus* of México, with 62.2 and 47.3%, but these values are inferior to those determined in the present study with *L. mexicanus* (76.2%).

In other wild species of México, *L. hintonii* and *L. campestris*, the majority alkaloids are 13 β -hydroxylupanine and hydroxyaphyllidine (Bermúdez *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2001). These variations in the profile and composition of alkaloids in the seeds of the different species of the genus *Lupinus* have been related with the species, location and date of collection.

Antifungal activity

There were significant differences ($p \leq 0.05$) in the average growth of the mycelia of *S. rolfisii* and *R. solani* by effect of the extract. The lower concentrations of the extract did not show important effects on the growth of the mycelia with respect to the control; however, when the concentrations

Cuadro 3. Efecto del extracto de alcaloides sobre el crecimiento y porcentaje de inhibición del micelio de hongos fitopatógenos.
Table 3. Effect of the extract of alkaloids on the growth and percentage of inhibition of the mycelia of phytopathogenic fungi.

Concentración de extracto en el medio de cultivo (mg mL ⁻¹)	<i>Sclerotium rolfisii</i>		<i>Rhizoctonia solani</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>	
	CRM [†] (cm)	PI [‡] (%)	CRM [†] (cm)	PI [‡] (%)	CRM [†] (cm)	PI [‡] (%)
0	8.0 \pm 0.0 a	0	8.0 \pm 0.0 a	0	8.0 a	0
1	8.0 \pm 0.0 a	0	8.0 \pm 0.0 a	0	8.0 a	0
2	7.5 \pm 0.24 a	12.4	5.7 \pm 0.42 b	32.4	8.0 a	0
3	5.5 \pm 0.46 b	31.2	1.5 \pm 0.17 c	81.6	8.0 a	0
4	5.2 \pm 0.53 b	35.1	1.0 \pm 0.11c	87.7	8.0 a	0
5	2.2 \pm 0.13 c	72.5	0.0 \pm 0.0 d	100	8.0 a	0

[†] CRM = crecimiento radial del micelio; [‡] PI = porcentaje de inhibición. Promedios con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

usar extractos de *L. montanus* y *L. rotundiflorus* (Bernal, 2004³; Zamora *et al.*, 2002); además, no se inhibió el crecimiento micelial de *F. moniliforme* al incorporar al medio de cultivo semillas molidas de *L. campestris* y *L. mutabilis* (Bravo *et al.*, 2000).

Sas-Piotrowska *et al.* (1996) reportaron porcentajes de inhibición menores a los encontrados en el presente estudio contra *R. solani* y otras especies de hongos al usar diferentes fracciones de un extracto etanólico de *L. angustifolius*. Las diferencias observadas en otros estudios y los reportados en esta investigación se deben probablemente a la variación en el perfil y concentración de alcaloides en los extractos de semillas de las especies de *Lupinus*, así como las posibles variaciones en la metodología de extracción. Los resultados son de interés debido a que hay pocas referencias de la actividad fungicida de alcaloides quinolizidínicos de especies mexicanas de *Lupinus*.

Actividad alelopática

Hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$) para la germinación de semillas de *A. hybridus*, ya que disminuyó hasta 80% la germinación con la concentración más alta de extracto (Cuadro 4). En otro estudio (Zárate *et al.*, 2006) se encontró la misma tendencia al evaluar concentraciones de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5% de un extracto acuoso de hojas de *Calia secundiflora*, en el cual se detectó la presencia de alcaloides quinolizidínicos, aunque la máxima inhibición de la germinación de *A. hybridus* fue 27%.

Wink (1983) reportó una inhibición de 100% en semillas de *Lactuca sativa* al usar un extracto de *L. mutabilis* a una concentración de 1.98 mg mL^{-1} , la cual fue superior a la concentración máxima usada en este estudio (1 mg mL^{-1}). Las anteriores diferencias en la inhibición de la germinación se deben probablemente a la variación en la composición y concentración

were increased, there was a reduction of mycelia growth with a different response of susceptibility with respect to the pathogen. Thus, when the concentrations of the extract were increased, the growth of the mycelia of *R. solani* had an average inhibition of 81.6, 87.7 and 100% with 3, 4, and 5 mg mL^{-1} (Table 3). This behavior was similar in *S. rolfisii*, but the inhibition of mycelia growth was lower when the same concentrations of the extract were applied: with 3, 4 and 5 mg mL^{-1} , the growth of the mycelia was only inhibited by 31, 35 and 72.5%. The above indicates that *S. rolfisii* was less susceptible than *R. solani* to the alkaloid extract of *L. mexicanus*.

The mycelia growth of *F. oxysporum* was not different ($p > 0.05$) among treatments, that is, the concentrations of the extract did not inhibit the growth of this fungus. The resistance of *F. oxysporum* to the alkaloids of *L. mexicanus* has been reported when using extracts of *L. montanus* and *L. rotundiflorus* (Bernal, 2004³; Zamora *et al.*, 2002); furthermore, the mycelia growth of *F. moniliforme* was not inhibited when ground seeds of *L. campestris* and *L. mutabilis* were incorporated to the culture medium (Bravo *et al.*, 2000).

Sas-Piotrowska *et al.* (1996) reported inhibition percentages lower than those found in the present study against *R. solani* and other species of fungi when using different fractions from an ethanol extract of *L. angustifolius*. The differences observed in other studies and those reported in the present research are probably due to the variation in the profile and concentration of alkaloids in the extracts of seeds of the species of *Lupinus*, as well as the possible variations in the methodology of extraction. The results are interesting because there are few references of the fungicidal activity of quinolizidine alkaloids of Mexican species of *Lupinus*.

Cuadro 4. Efecto del extracto alcaloideo sobre la germinación de semillas.

Table 4. Effect of the alkaloid extract on seeds germination.

Concentración de alcaloides (mg mL^{-1})	<i>Amaranthus hybridus</i>		<i>Echinochloa crus galli</i>	
	Germinación (%)	Inhibición (%)	Germinación (%)	Inhibición (%)
0	92.5 ± 2.1 a	7.5 ± 1.2 a	95.0 ± 1.0 a	5.0 ± 1.4 a
0.25	78.3 ± 4.5 b	21.7 ± 5.5 b	92.5 ± 2.3 a	7.5 ± 2.8 a
0.50	58.8 ± 5.3 c	44.2 ± 4.8 c	91.7 ± 2.1 a	8.3 ± 1.1 a
0.75	41.6 ± 1.4 d	58.4 ± 3.4 d	90.0 ± 1.2 a	10.0 ± 1.5 a
1.0	20.0 ± 3.4 e	80.0 ± 7.5 e	92.5 ± 2.6 a	7.5 ± 2.1 a

Promedios con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

³ Bernal, A. A. 2004. Actividad fungicida *in vitro* de extractos con alto contenido de alcaloides obtenidos de *Lupinus silvestres* (Fabaceae) y esparteína sobre algunos hongos fitopatógenos. Tesis de Maestría. Universidad de Guadalajara. 57 p.

de alcaloides quinolizidínicos entre *C. secundiflora*, *L. mutabilis* y *L. mexicanus*. Aunque hay antecedentes de la alta sensibilidad de *A. hybridus* a la aplicación de diferentes compuestos naturales como ácidos fenólicos y aceites esenciales, éste es el primer reporte de un efecto inhibitorio importante de la germinación de esta especie de maleza, particularmente por el efecto de los alcaloides quinolizidínicos.

Los porcentajes de germinación de las semillas de *E. crus galli* en el análisis no fueron diferentes ($p > 0.05$) entre las concentraciones de extracto y el testigo. Lo anterior indica que *A. hybridus* es más sensible a los alcaloides de *L. mexicanus* que *E. crus galli*. Esta diferencia de sensibilidad entre especies receptoras de alcaloides quinolizidínicos también fue reportada por Muzquiz *et al.* (1994) quienes, al evaluar un extracto alcaloideo obtenido de *Lupinus hispanicus* y *L. albus* sobre la germinación de *Avena sterilis*, *Lycopersicon sculentum*, *Triticum aestivum*, *Chenopodium album*, *Vicia villosa* y *Pisum sativum*, sólo encontraron efectos inhibitorios de la germinación en *A. sterilis*.

CONCLUSIONES

La lupanina fue el alcaloide más abundante en las semillas de *L. mexicanus*. Con la concentración más alta de extracto (5 mg mL^{-1}) el crecimiento micelial de *R. solani* se inhibió completamente (100%), mientras que el micelio de *S. rolfisii* a la misma concentración mostró una inhibición de 72.5%. Sólo la germinación de *A. hybridus* se inhibió significativamente por efecto del extracto.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Educación Superior e Investigación Científica por el financiamiento otorgado mediante el PROMEP/103.5/07/27.

LITERATURA CITADA

- Bermúdez T. K., N. Robledo Q., L. Barrera N., and M. Wink. 2002. Alkaloid profile of leaves and seeds of *Lupinus hintonii* C. P. Smith. *Z. Naturforsch.* 57c: 243-247.
- Bravo L. L., K. Bermúdez T., y R. Montes B. 2000. Inhibición de *Fusarium moniliforme* Sheld. mediante polvos vegetales y algunos de sus componentes químicos. *Manejo Integrado de Plagas* 57: 29-34.
- Carpinella C. M., L. M. Giorda, C. Ferrayoli G., and S. M. Palacios. 2003. Antifungal effects of different organic extracts from *Melia azederach* on phytopathogenic fungi and their isolated active components. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2506-2511.
- Duke, S. O., J. Romagni G., and E. Dayan F. 2000. Natural products as source for new mechanisms of herbicidal action. *Crop Protection* 19: 583-589.
- Espinosa G. F., y J. Sarukhán K. 1998. Manual de Malezas del Valle de México. Fondo de Cultura Económica. México, D. F. 407 p.

Allelopathic activity

There were significant differences among treatments ($p \leq 0.05$) for the germination of seeds of *A. hybridus*, given that germination decreased by as much as 80% with the highest concentration of the extract (Table 4). In another study (Zárate *et al.*, 2006), the same tendency was found when evaluations were made of concentrations of 0.5, 1, 2, 3, 4 and 5% of an aqueous extract of leaves of *Calia secundiflora*, in which the presence of quinolizidine alkaloids was detected, although the maximum inhibition of the germination of *A. hybridus* was 27%.

Wink (1983) reported an inhibition of 100% in seeds of *Lactuca sativa* when using an extract of *L. mutabilis* at a concentration of 1.98 mg mL^{-1} , which was higher than the maximum concentration used in the present study (1 mg mL^{-1}). The above differences in the inhibition of germination are probably due to the variation in the composition and concentration of quinolizidine alkaloids among *C. secundiflora*, *L. mutabilis* and *L. mexicanus*. Although there are antecedents of the high sensitivity of *A. hybridus* to the application of different natural compounds such as phenolic acids and essential oils, this is the first report of an important inhibitory effect on the germination of this species of weed, particularly from the effect of the quinolizidine alkaloids.

The percentages of germination of the seeds of *E. crus galli* on the analysis were no different ($p > 0.05$) among the concentrations of the extract and the control. The above indicates that *A. hybridus* is more sensitive to the alkaloids of *L. mexicanus* than *E. crus galli*. This difference of sensitivity among species receiving quinolizidine alkaloids was also reported by Muzquiz *et al.* (1994), who when evaluating an alkaloid extract obtained from *Lupinus hispanicus* and *L. albus* on the germination of *Avena sterilis*, *Lycopersicon sculentum*, *Triticum aestivum*, *Chenopodium album*, *Vicia villosa* and *Pisum sativum*, only found inhibitory effects on germination in *A. sterilis*.

CONCLUSIONS

Lupanine was the most abundant alkaloid in the seeds of *L. mexicanus*. With the highest concentration of extract (5 mg mL^{-1}), the mycelial growth of *R. solani* was completely inhibited (100%), while the mycelia of *S. rolfisii* showed an inhibition of 72.5% to the same concentration. Only the germination of *A. hybridus* was significantly inhibited by the effect of the extract.

—End of the English version—

- Kogan A. M., y A. Pérez J. 2003. *Herbicidas: Fundamento Fisiológicos y Bioquímicos del Modo de Acción*. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 333 p.
- Martínez H. J. N. Robledo Q., R. Mora E., and G. Davila O. 2001. Alkaloids composition of *Lupinus campestris* from Mexico. *J. Food Biochem.* 25: 117-125.
- Meibner, C., and M. Wink 1991. GC/MS-Analyse von Alkaloiden Nordamerikanischer Lupinen. *Forschung, anbau und verwertung*. Wink, M. (ed). Heidelberg, Germany. pp: 91-22
- Mohamed, S., S. Saka, S. El-Sharkawy H., M. Ali, and S. Muid. 1996. Antimycotic screening of 58 Malaysian plants against plant pathogens. *Pesticide Sci.* 47(3): 259-264.
- Muzquiz M, C. Burbano, C. Cuadrado, y C. De la Cuadra. 1993. Determinación de factores antinutritivos termorresistentes en leguminosas I: Alcaloides. *Inv. Agraria. Producción y Protección Veg.* 8: 351-361.
- Muzquiz M. E., C. De la Cuadra, C. Cuadrado, C. Burbano, and R. Calvo. 1994. Herbicide-like effect of *Lupinus* alkaloids. *Industrial Crops and Products* 2: 173-280.
- Przybylak, J. K., D. Ciesiolka, W. Wysocka, P. Garcia L., M. A. Ruiz L., W. Wysocki, and K. Gulewicz. 2005. Alkaloids profiles of Mexican wild lupin and effect of alkaloid preparation from *Lupinus exaltatus* seeds on growth and yield of paprika (*Capsicum annum* L.). *Industrial Crops and Products* 21: 1-7.
- Sas-Piotrowska, B., T. Aniszewski, and K. Gulewicz. 1996. An evidence for fungistatic activity of some preparations from alkaloids-rich lupin seeds on potato pathogenic fungi. *Bull. of the Polish Academy of Biol. Sci.* 44(1-2): 41-47.
- Wink, M. 1983. Inhibition of seed germination by quinolizidine alkaloids. *Aspects of allelopathy in Lupinus albus* (L.). *Planta* 158: 365-368.
- Wink, M. 1998. Chemical ecology of alkaloids. *In: Roberts F. M., and M. Wink (eds). Alkaloids: Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications*. Plenum Press, New York, pp: 265-296.
- Wink, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64: 3-19.
- Zamora N. F., G. Virgen C., A. Bernal A., S. Fausto G., and M. Ruiz L. 2002. *In vitro* antifungal activity of *Lupinus montanus* extract and lupanine on *Fusarium oxysporum* f. sp *melonis*. *In: Proc. 10th Int. Lupin Conference*. van Santen E., M. Wink, S. Weissmann, and P. Romer (eds). Laugarvatn, Iceland. pp: 255-256.
- Zárate H., J., R. García M., F. Zavala CH., R. Pérez L., y M. Soto H. 2006. Fitotoxicidad de los extractos de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev. *Revista Chapingo, Serie Horticultura.* 12(002): 197-202.