

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE DOS MORFOTIPOS DE *Raphanus raphanistrum* L. SOBRE TRES HONGOS FITOPATÓGENOS

Gina Sánchez-León¹, Andrea Vargas-Rincón¹ y Pedro Jiménez¹

RESUMEN

Los extractos obtenidos a partir de plantas han ido ganando popularidad e interés científico, dado que se ha reportado que presentan actividad antibacteriana y antifúngica. Esta actividad se ha atribuido a los diferentes metabolitos secundarios que están presentes en los extractos. En el caso de la familia Brassicaceae se ha demostrado la presencia de diferentes compuestos secundarios tales como los glucosinolatos y sus derivados (isotiocianatos), así como las fitoalexinas. Así, el objetivo del presente estudio fue evaluar *in vitro* el efecto antifúngico de los extractos etanólicos obtenidos de *Raphanus raphanistrum* sobre el crecimiento micelial y la producción de conidias de importantes fitopatógenos como son *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum* y *Fusarium oxysporum*. Igualmente, se determinó si el morfotipo y estado fenológico de la planta (flor morada-blanca y terracota-crema) influye en la actividad que tienen los extractos sobre los hongos, a la vez que se trató de establecer si el órgano (tallos y hojas vs. frutos y semillas) de donde se obtuvo el extracto interviene en la actividad biológica que éste tiene sobre los hongos. Los resultados mostraron que el efecto de los extractos sobre los diferentes hongos es muy variable. Es posible que la variación se deba a la diferente capacidad que poseen los microorganismos para detoxificar los compuestos presentes en los extractos. El efecto de los extractos en la conidiación fue también muy variable y en muchos casos, particularmente para el hongo *C. acutatum*, el extracto indujo positivamente la conidiación. Igualmente, ningún compuesto mostró actividad fungitóxica y en todos los casos la inhibición fue de tipo fungistática.

Palabras clave adicionales: *Botrytis cinerea*, Brassicaceae, *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum*, glucosinolatos

ABSTRACT

Evaluation of the antifungal activity of two ethanolic extracts of *Raphanus raphanistrum* morphotypes on three phytopathogenic fungi

The use and the scientific interest of plant extracts have grown in the recent years since they exhibit activity against bacteria and fungi. This activity has been attributed to the different secondary metabolites present in the extracts. Plants belonging to the Brassicaceae family show different secondary metabolites such as glucosinolates and its derivatives (isothiocyanates), and phytoalexins. Therefore, the main objective of this study was to assess the *in vitro* effect of different ethanolic extracts from the plant *Raphanus raphanistrum* against the mycelial growth and the conidia production of three important plant pathogens: *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum* and *Fusarium oxysporum*. Additionally, we determined the possible effect of the plant phenologic phase and flower morphotype (violet-white or terracotta-beige flowers) on the activity of the extracts against fungi. Also, we tried to determine if the organ where the extract was obtained from (shoots and leaves vs. fruits and seeds) has an influence on the effect against fungi. Results showed that the effect of the extracts on fungi is highly variable. It is possible that the variability could be due to the differential capacity of the fungi to detoxify the compounds present in the extracts. The effect of the extracts on conidiation was also very variable and in particular in the case of the fungus *C. acutatum*, the extract activated the conidiation. None of the extracts showed a fungitoxic activity and in all cases the activity was fungistatic.

Additional key words: *Botrytis cinerea*, Brassicaceae, *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum*, glucosinolates

INTRODUCCIÓN

Los extractos obtenidos a partir de plantas han ido ganando interés científico, dado que se ha reportado que presentan actividad antibacteriana y antifúngica (Briceño et al., 2011). Estos reportes

atribuyen esta actividad a los diferentes metabolitos secundarios que están presentes en los extractos vegetales (Vig et al., 2009). Los extractos obtenidos de plantas pertenecientes a la familia botánica Brassicaceae se caracterizan por presentar diversas actividades biológicas, dentro

Recibido: Junio 5, 2014

Aceptado: Enero 5, 2015

¹ Grupo Integrado de Investigaciones en Química y Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Militar Nueva Granada, Campus Nueva Granada. Cajicá, Colombia. e-mail: pedro.jimenez@unimilitar.edu.co

de las cuales se encuentran propiedades antimicrobiana, antiviral, antifúngica e insecticida (Björkman et al., 2011; Mendoza-García et al., 2014). Estas cualidades se deben, entre otros, a diferentes compuestos tales como glucosinolatos, isotiocinatos (Malik, 2009) y fitoalexinas (Pedras y Ahiahonu, 2005; Ahuja et al., 2012).

En el caso de la especie *Raphanus raphanistrum* L. perteneciente a la familia Brassicaceae, se han identificado glucosinolatos como son glucoiberina, glucorafanina, gluconapina, glucobrassicina, glucosinalbina, gluconasturtina, progoitrina, glucoerucina, glucorafenina y glucotropaeolina (Malik, 2009). Los tres últimos conforman más del 90% de estos compuestos en esta especie, lo cual en términos de cantidad equivale a unos 5,70 μmol por planta en la etapa de cotiledón, mientras que en la etapa de floración representa unos 1942,4 μmol por planta. En el estado de silicua (frutos) este valor disminuye en un 35 %, lo cual equivale a 1262,56 μmol por planta (Malik, et al., 2010). Estos valores resultan similares a los reportados por Brown et al. (2003) para *Arabidopsis thaliana*, quienes reportan altas concentraciones de glucosinolatos en los órganos reproductivos, encontrando en las inflorescencias 25-30 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$, en las silicuas 15-25 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ y en las semillas 63 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$.

En la familia Brassicaceae se reporta la producción de otros metabolitos secundarios, tales como las fitoalexinas, estos son compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular, sintetizados por las plantas como respuesta al estrés de diferente origen, incluido el ataque de patógenos (Agrios, 2005; Pedras y Ahiahonu, 2005; Ahuja et al., 2012). Sin embargo, aún no existe evidencia de producción de fitoalexinas por *R. raphanistrum* a juzgar por la bibliografía revisada.

En Colombia, los reportes de ataques de *B. cinerea*, *C. acutatum* y *F. oxysporum* sobre diversos cultivos (Rodríguez et al., 2010) y sus efectos sobre la producción agrícola son importantes (Sanabria et al., 2010). Es sabido que el control de estos patógenos, basado en el uso de productos de síntesis artificial, puede tener consecuencias sobre la aparición de resistencias y contaminación, por esta razón, se inició el estudio de extractos etanólicos obtenidos de los frutos y la parte aérea (tallos y hojas) de *R. raphanistrum* (Brassicaceae). Con la intención final de evaluar su actividad antifúngica potencial, basada en

afectar el crecimiento micelial y la producción de conidios de *B. cinerea*, *C. acutatum* y *F. oxysporum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico. Muestras, consistentes de plantas completas fueron colectados en la Sabana Norte de Bogotá (04°55' N; 74°05' W). Luego, en el laboratorio, el material fue seccionado en raíz, tallos, hojas y frutos, antes de deshidratarlo a 25 °C durante 8 días (Mendoza-García et al., 2014). Una vez deshidratado el material, con excepción de la parte subterránea, fue utilizado en los posteriores procedimientos. Ejemplares completos fueron depositados en el Herbario Nacional Colombiano ubicado en la Universidad Nacional sede Bogotá D.C., bajo los números de colección 573006, 573007, 573008 y 573009. Los ejemplares fueron identificados como *Raphanus raphanistrum*, sin embargo difieren en el color de la flor (morada, blanca, crema y terracota). Esta característica está ligada al estado fenológico de la planta, en el caso de la flor morada esta se torna de color blanco después de la fecundación (Conabio, 2009) y para el caso de flor terracota en experimentos preliminares se observó comportamiento similar y la flor va adquiriendo un color amarillo muy leve denominado crema (resultados no mostrados). Incluso, es posible encontrar plantas en las cuales la pérdida de color o bien no ocurre, o se verifica de manera muy lenta.

Los hongos, *B. cinerea*, *C. acutatum* y *F. oxysporum*, fueron obtenidos de la colección del Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Militar Nueva Granada. Estos aislamientos fueron reactivados en Agar Papa Dextrosa (PDA) a 25 °C.

Obtención de extractos etanólicos. Una vez seco el material para preparar los extractos se separó por color de flor y dos órganos: vástago (incluyendo hojas y tallo) y frutos, así fueron obtenidas ocho fuentes para extraer, a las cuales se les asignó un código: vástago de flor terracota: VT; fruto de flor terracota: FT; vástago de flor crema: VC; fruto de flor crema: FC; vástago de flor morada: VM; fruto de flor morada: FM; vástago de flor blanca: VB; fruto de flor blanca: FB. Este material fue triturado, utilizando un procesador de alimentos. Se tomaron de 150 a 300 g de material molido, y se maceraron en etanol 96 % durante 72 horas, agitando

vigorosamente esta mezcla dos veces al día (Ayambo, 2006). Pasado este tiempo, la mezcla fue filtrada y sometida a destilación a presión reducida a 45 °C. El residuo obtenido se dejó secar por 24 horas a 35 °C y se almacenó a temperatura ambiente (21 ± 2 °C) hasta su utilización (Colegate y Molyneaux, 2008).

Efecto sobre el crecimiento micelial y la producción de conidios *in vitro*.

Los aislamientos de los hongos *B. cinerea*, *C. acutatum* y *F. oxysporum* fueron cultivados en PDA, a un medio de concentración recomendada, complementado con 0,0; 0,1; 1,0 y 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de los extractos obtenidos. Los medios complementados, una vez servidos, se dejaron almacenados por 24 horas antes de ser inoculados para permitir una completa homogenización. La inoculación se llevó a cabo colocando en el centro de la caja de Petri (60 mm x 15 mm) un disco de 3 mm de diámetro y 3 mm de altura, obtenido de zonas de crecimiento activo de cultivos de los hongos (Soliman y Badeaa, 2002; Castillo et al., 2010). Estas cajas se incubaron a 21 ± 2 °C, hasta que el hongo de algún tratamiento alcanzaba el borde de la caja, para *B. cinerea* y *F. oxysporum*, mientras que en el caso de *C. acutatum* se incubó por 8 días, ya que este hongo necesita más tiempo para colonizar hasta el borde la caja de Petri. Cumplida esta incubación, el crecimiento micelial se determinó tomando dos medidas del diámetro de la colonia, la primera al azar y la segunda perpendicular a esta, el promedio de estas medidas se utilizó para el cálculo del área ocupada por la colonia, la cual se contrastó contra el área del tratamiento control (0,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Soliman y Badeaa, 2002), determinando el porcentaje de inhibición según la fórmula: $\text{Inhibición} = 100[(C-T)/C]$, donde C denota el crecimiento radial del micelio en el control y T el crecimiento radial del hongo en el tratamiento a evaluar. En consecuencia, ya que se asume que el control tuvo un crecimiento micelial del 100 % (sin inhibición), este valor no es presentado en las tablas de resultados.

El efecto sobre la producción de conidios se determinó mediante el conteo de éstos, cosechados al final del experimento de inhibición. Para coleccionar los conidios se procedió a desprenderlos con la ayuda de un rastrillo de vidrio, utilizando para ello tres alícuotas de 3 mL de agua, la suspensión se diluyó hasta 10^{-2} , y se procedió a contarlos utilizando una cámara de

Neubauer. Los resultados de los conteos se utilizaron para estimar el número de conidios/cm² de la colonia fúngica.

Determinación del efecto fungicida o fungistático. Para determinar si el efecto observado era un efecto fungistático o fungicida, discos de 3 mm de diámetro y 3 mm de altura fueron tomados de los bordes de las colonias crecidas en cada uno de los tratamientos anteriores e inoculados sobre PDA a concentración completa. Estas cajas fueron incubadas a 21 ± 2 °C durante 72 horas, luego de las cuales se evaluó si ocurrió o no crecimiento de hifas (Soliman y Badeaa, 2002; Veloz-García et al., 2010). Aquellos casos en los que las hifas reactivaran su crecimiento se consideró que el efecto del extracto era fungistático, y aquellas en las que no ocurriera crecimiento se asumió que el efecto era fungicida.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria. Para establecer la concentración mínima inhibitoria se utilizó el método de dilución en agar descrito arriba, pero en este caso se implementaron concentraciones intermedias a las evaluadas en las pruebas de inhibición (0,0; 1,0; 2,5; 5,0 y 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Se utilizaron dos placas excavadas de vidrio (placas de tinción) de 12 pozos, estériles. En cada pozo, se sirvieron 150 μL de medio suplementado con los extractos, dejando homogenizar por 1 hora. Posteriormente, en cada pozo se sembró un disco de 3 mm de diámetro y 3 mm de altura obtenido de zonas de crecimiento activo de cultivos de hongos. Las placas se incubaron a 21 ± 2 °C y se evaluaron una vez que los hongos de algún tratamiento alcanzaran el borde del pozo.

Todos los tratamientos de estos experimentos fueron repetidos cuatro veces. Se establecieron tres réplicas por tratamiento y cada una consistió de una caja de Petri.

Para el análisis estadístico se establecieron los intervalos de confianza para cada una de las diferencias con relación al control, utilizando la versión 3.0.1 del programa R (R Development Core Team, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de diferentes extractos etanólicos sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*, *C. acutatum* y *F. oxysporum*. En el Cuadro 1 se puede notar el efecto sobre el crecimiento micelial de los 8 extractos

evaluados en este trabajo. En caso de *B. cinerea*, cinco de los extractos ejercieron un efecto inhibitorio del crecimiento micelial cuando se utilizaron a la dosis más alta ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) siendo el extracto que ejerció la mayor inhibición el extracto de plantas de flor morada (FM). Los extractos provenientes de plantas en etapa fenológica de flor terracota y flor crema no presentaron efecto inhibitorio a ninguna de las concentraciones utilizadas cuando se trató de los extractos de vástago, VT y VC, mientras que los provenientes de fruto, FT y FC, sí presentaron efecto inhibitorio pero sólo a la

concentración más alta evaluada. Los extractos provenientes de plantas de flor morada y flor blanca, ejercieron efecto inhibitorio que se mantuvo a medida que se aumentó la concentración evaluada, con la excepción del extracto proveniente de vástago de plantas de flor blanca (VB). En este caso, su efecto a dosis intermedia y alta no muestran diferencia, estadísticamente significativa, con el obtenido en ausencia de extracto. El extracto obtenido de frutos de plantas de flor blanca (FB) resultó el único que ejerció actividad inhibitoria a todas las concentraciones evaluadas.

Cuadro 1. Intervalos de confianza y significancia estadística para las medias del efecto inhibitorio de diferentes extractos sobre crecimiento micelial de *B. cinerea* (Bc), *C. acutatum* (Ca) y *F. oxysporum* (Fox)

Hongo	Extracto	Dosis ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
		0,10	1,00	10,00
Bc	VT	0,00	0,00	0,00
Bc	FT	0,00	0,00	(3,34; 10,72)*
Bc	VC	0,00	0,00	0,00
Bc	FC	0,00	0,00	(10,05; 27,06)*
Bc	VM	(-2,67; 19,06)	(-0,28; 16,70)	(6,88; 33,00)*
Bc	FM	(-0,25; 18,97)	(14,87; 27,74)*	(31,25; 48,33)*
Bc	VB	(1,07; 17,76)*	(-0,17; 14,56)	(-0,3; 15,49)
Bc	FB	(3,42; 24,54)*	(1,12; 15,37)*	(0,72; 28,20)*
Ca	VT	(-17,32; -9,27)**	(-17,9; -4,06)**	(6,79; 16,61)*
Ca	FT	(-26,25; -13,96)**	(-25,79; -16,32)**	(20,64; 30,96)*
Ca	VC	(-31,91; -16,58)**	(-28,21; -13,24)	(8,70; 26,53)*
Ca	FC	(-27,88; -14,94)**	(-27,19; -13,37)**	(44,79; 59,39)*
Ca	VM	(-40,71; 3,10)	(-53,02; -8,88)**	(-8,21; 22,78)
Ca	FM	(-55,11; -14,87)**	(-67,44; -18,87)**	(-4,26; -5,97)**
Ca	VB	(-32,81; -5,97)**	(-47,24; -15,96)**	(9,41; 21,69)*
Ca	FB	(-36,31; -3,70)**	(-54,30; -1,63)**	(-31,93; 7,96)
Fox	VT	0,00	0,00	(32,51; 58,20)*
Fox	FT	0,00	0,00	(28,16; 57,47)*
Fox	VC	0,00	0,00	(22,70; 46,43)*
Fox	FC	0,00	0,00	(50,42; 67,49)*
Fox	VM	(-3,18; 9,97)	(-0,79; 12,88)	(44,49; 51,52)*
Fox	FM	0,00	(-1,30; 4,02)	(56,56; 62,12)*
Fox	VB	(3,20; 24,89)*	(-0,28; 23,59)	(37,32; 47,85)*
Fox	FB	(10,70; 44,57)*	(-0,30; 25,65)	(35,49; 46,88)*

Los asteriscos indican diferencias significativas con relación al control ($P \leq 0,05$): *Efecto inhibitorio y **Efecto estimulador. Los valores 0,00 y los no marcados con asterisco indican ausencia de diferencias significativas ($P > 0,05$). V= vástago; F= fruto; T= flor terracota; C= flor crema; M= flor morada; B= flor blanca

El efecto inhibitorio bajo y, en algunos casos, ausente encuentra explicación en la posible resistencia a compuestos antifúngicos que podría mostrar *B. cinerea*. Esta resistencia ha sido explicada por la presencia de sistemas de transporte transmembranal, como los llamados transportadores ABC (ATP-binding cassette

transporters) y las MFS (major facilitator superfamily). Estos sistemas pueden excretar desde el citoplasma un amplio rango de sustratos, entre ellos metabolitos tóxicos y compuestos antifúngicos químicamente heterogéneos (Elad et al., 2007). Y en el caso de comprobarse la producción de fitoalexinas por la planta, podría

estar ocurriendo un proceso de detoxificación de las mismas, el cual consiste en la transformación de su estructura química para convertirlas de compuestos antifúngicos a compuestos inocuos o menos agresivos para el patógeno, lo cual puede causar que la inhibición generada por el extracto no sea tan eficiente (Pedras y Ahiahonu, 2005). Además, Islam (2000) puso en evidencia que algunas fitoalexinas, pertenecientes a la familia Brassicaceae, tienen poco efecto sobre el hongo.

La respuesta de *C. acutatum*, a la mayoría de los extractos se muestra dependiente de la dosis. Es decir, ocurrió la estimulación, o la inhibición, del crecimiento micelial según la dosis utilizada en el tratamiento. La primera respuesta se observa en los tratamientos con dosis baja e intermedia de los extractos (0,1 y 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), con la excepción del extracto VM (Cuadro 1). Al utilizar dosis mayores (10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) el efecto cambia, resultando en la inhibición del crecimiento por los extractos VT, FT, VC, FC, y VB, mientras que para los demás extractos la respuesta no es significativamente diferente del control. Estos resultados sugieren la ocurrencia de hormesis, la cual se ha descrito como un efecto paradójico de estimulación de respuesta por bajas concentraciones de un factor y, la inhibición de esa respuesta a altas concentraciones del factor (Calabrese y Baldwin, 2003). Este fenómeno ha sido reportado como una respuesta, presentada por algunos hongos, a las condiciones de estrés (López-Diazguerrero et al., 2013), también se ha observado al evaluar el efecto de inhibidores de crecimiento sobre diferentes organismos (Oliva et al., 2003), y nuestros resultados parecen apoyar la hipótesis de que esto ocurre en este sistema.

El efecto de los extractos sobre el crecimiento micelial de *F. oxysporum* sugiere dependencia del origen del extracto. Los extractos VT, FT, VC y FC, no presentaron efecto detectable a concentraciones baja e intermedia, pero si a la más alta concentración utilizada (Cuadro 1). La respuesta a los demás extractos evaluados se caracterizó por no ser significativamente diferente del control cuando se evaluó el efecto de dosis intermedia, mientras que a la dosis más alta (10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) inhibió el crecimiento. Este grupo de extractos, evaluado a la más baja concentración, presentó un comportamiento de inhibición del crecimiento, salvo VM y FM cuyos efectos fueron similares al control (Cuadro 1).

Los resultados muestran que los extractos

provenientes de plantas de flor terracota y crema (VT, FT, VC y FC) presentan efectos similares frente a cada hongo particular (Cuadro 1), lo cual pudiera en alguna forma estar asociado a la presencia de diferentes fitohormonas en la etapa fenológica correspondiente a cada color de flor. En todos los extractos, la mayor inhibición se presentó a la mayor concentración (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Por otra parte, se esperaba que los extractos obtenidos de frutos presentaran mayor efecto inhibitorio debido a la cantidad de metabolitos secundarios que acumulan como un mecanismo de protección de los propágulos (Malik, 2009), los resultados parecen corroborar esta idea.

Efecto *in vitro* de diferentes extractos sobre la conidiación de *B. cinerea*, *C. acutatum* y *F. oxysporum*. Como se desprende del Cuadro 2, la mayoría de los tratamientos aplicados a *B. cinerea* no tuvieron una diferencia estadísticamente significativa con el control sin extracto. Un único extracto presentó un efecto inhibitorio constante a lo largo de todas las concentraciones evaluadas, y fue el VC. Los demás tratamientos que produjeron un efecto inhibitorio se pueden separar en dos grupos, el primero está formado por FT y FC, los cuales a bajas concentraciones ejercieron un efecto inhibitorio. El segundo grupo es el FB, el cual a dosis intermedia y alta, 1,0 y 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente, mostró un efecto inhibitorio. Una explicación para la inhibición observada es provista por el trabajo de Mari et al. (1993), quienes mostraron que la presencia de isotiocianatos resulta tener actividad biocida contra *B. cinerea*, aunque la intensidad y especificidad son variables. Adicionalmente, la disminución en la esporulación de este hongo es congruente con lo reportado por Drobnica et al. (1967), quienes sostienen que dicha actividad se asocia a los isotiocianatos, incluso cuando no hay inhibición del crecimiento micelial. Por último, el efecto de los extractos de frutos era esperable al considerar que deben proteger los propágulos contra predadores (Malik, 2009) y los rangos de concentración en los cuales son activos en este caso apunta a reforzar esa idea. Llama la atención la falta de actividad mostrada por el extracto FM, el cual resultó muy activo en el control del crecimiento micelial de *B. cinerea*, lo cual apunta a la necesidad de explorar en detalle la composición del extracto a futuro.

El efecto de los extractos sobre la producción de conidios de *C. acutatum* (Cuadro 2) en una

clara estimulación de la producción de estos, con tres excepciones: los casos de FB a concentración baja e intermedia, y VB a baja concentración. Así a medida que aumentó la concentración de los extractos, aumentó la producción de conidios, lo cual se debe a que *C. acutatum* responde al estrés generado por los extractos aumentando la producción de conidios corroborando lo

establecido por Osorio-Concepción et al. (2013). Adicionalmente, al contrastar los resultados obtenidos para crecimiento y producción de conidios se puede notar que los tratamientos que afectan más severamente el crecimiento son los que inducen una mayor conidiación, lo cual puede considerarse como una reafirmación de lo propuesto por Osorio-Concepción et al. (2013).

Cuadro 2. Intervalos de confianza y significancia estadística para las medias del efecto inhibitorio sobre la conidiación de *B. cinerea* (Bc), *C. acutatum* (Ca) y *F. oxysporum* (Fox)

Hongo	Extracto	Dosis ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
		0,10	1,00	10,00
Bc	VT	(-259.958; 772.387)	(-812.656; 673.815)	(-120.999; 961.765)
Bc	FT	(294.182; 800.013)*	(-26.832; 800.639)	(-21.094; 589.823)
Bc	VC	(261.490; 793.414)*	(447.527; 964.032)*	(787.899; 988.048)*
Bc	FC	(605.854; 887.503)*	(-408.280; 834.473)	(-699.650; 546.999)
Bc	VM	(-13.963.603; 1.699.687)	(-2.960.953; 617.121)	(-10.552.468; 2.110.200)
Bc	FM	(-2.418.064; 1.154.387)	(-2.418.064; 1.154.387)	(-1.665.511; 338.259)
Bc	VB	(-482.648; 1.005.375)	(-864.815; 787.614)	(-131.818; 950.000)
Bc	FB	(-855.162; 753.681)	(555.283; 1.058.353)*	(447.233; 1.030.040)*
Ca	VT	(-851.764; 445.792)	(-6.999.368; -298.402)**	(-16.855.876; -4.839.244)**
Ca	FT	(-812.333; 555.799)	(-4.505.588; 24.355)*	(-29.1459; -6.453.880)**
Ca	VC	(-1.498.128; -134.254)**	(-3.916.887; -833.948)**	(-16.886.000; -4.839.244)**
Ca	FC	(-5.972.370; 255.870)	(-9.170.100; 892.386)	(-35.676.048; -7.504.382)**
Ca	VM	(-1.122.140; 889.875)	(-3.151.636; -392.417)**	(-9.743.013; -2.586.367)**
Ca	FM	(-564.032; 301.970)	(-1.802.070; 11.594)	(-18.099.071; -3.591.578)**
Ca	VB	(139.179; 787.074)*	(-533.889; 499.507)	(-92.125; -2.749.334)**
Ca	FB	(68.484; 925.623)*	(143.778; 941.230)*	(-65.927; -830.041)**
Fox	VT	(-177.098; 320.833)	(-883.089; 187.422)	(-1.672.513; -133.328)**
Fox	FT	(-93.736; 498.736)	(-3.375.592; 645.592)	(-2.527.509; -533.419)**
Fox	VC	(-238.310; 404.738)	(-1.857.109; -849.320)**	(-601.879; 256.347)
Fox	FC	(-787.816; 50.877)	(-1.732.232; -1020.320)**	(-2.101.846; -817.374)**
Fox	VM	(-1.598.665; 678.495)	(-2.804.886; -784.799)**	(-908.214; 701.958)
Fox	FM	(-810.152; 415.719)	(-3.511.174; -473.481)**	(-1.524.425; -263.701)**
Fox	VB	(-327.151; 616.104)	(460.802; 952.534)*	(117.496; 975.398)*
Fox	FB	(-1.509.892; 313.623)	(-1.328.417; 485.068)	(-700.910; 844.197)

Los asteriscos indican diferencias significativas con relación al control ($P \leq 0,05$), *Efecto inhibitorio y **Efecto estimulador. V = vástago; F = fruto; T = flor terracota; C = flor crema; M = flor morada; B = flor blanca

Para el caso de la producción de conidios de *F. oxysporum* (Cuadro 2), los resultados son parecidos a los obtenidos en el caso anterior. De los tratamientos que produjeron resultados que difieren de manera significativa del control, solo uno de ellos produjo reducción de la conidiación el extracto VB, todos los demás indujeron un aumento de la cantidad de conidios producidos por unidad de área. El extracto VB produjo el mayor efecto inhibitorio a concentración intermedia ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Estudios previos han mostrado que la respuesta de los hongos a los estímulos externos, por ejemplo extractos vegetales y concentraciones empleadas, es variable (Espinosa-García y Langenheim, 2003). Es por esto que algunos extractos inhiben el crecimiento micelial de unos hongos y otros actúan mejor inhibiendo la producción de conidios, hecho que podría explicar el porqué los resultados obtenidos en este trabajo varían entre los tres hongos usados.

Actividad fungicida o fungistática. Se evidenció

que los extractos presentaron actividad fungistática. Esto se demostró al reinocular los hongos sometidos a cada tratamiento en un medio sin complementar, y se observó crecimiento micelial después de 3 a 5 días, indicando fungistasis.

Concentración mínima inhibitoria. La concentración mínima inhibitoria de los extractos no pudo ser determinada, debido a que el micelio de los hongos mostró crecimiento, aún en la concentración más alta ($10,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) del extracto etanólico.

CONCLUSIONES

No existe una respuesta general de los diferentes hongos ante los diversos extractos. La utilización de las mayores concentraciones de éstos indujo en la mayoría de los casos una respuesta de inhibición del crecimiento, la cual resultó ser de tipo fungistático. Sin embargo, debe destacarse que *C. acutatum* presentó ocurrencia de hormesis al menos para crecimiento micelial.

La conidiación fue particularmente estimulada por los extractos, lo cual apunta a una respuesta ante el estrés, que aun cuando ha sido reportada para uno de los hongos, *B. cinerea*, resultó una respuesta común en nuestros experimentos.

No es posible generalizar sobre las actividades de un extracto particular, sin embargo aunque no pudo ser calculada una CMI es posible afirmar que sí se registraron efectos los cuales ameritan posterior estudio para posibles aplicaciones prácticas.

AGRADECIMIENTO

A la Dra. Silvia Restrepo por su lectura crítica y sus aportes en la preparación final de este artículo. A la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad Militar Nueva Granada, Proyecto CIAS 940.

LITERATURA CITADA

- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. Academic Press. New York.
- Ahuja, I., R. Kissen y A.M. Bones. 2012. Phytoalexins in defense against pathogens. Trends in Plant science 17: 73-90.
- Ayambo, L.D. 2006. Optimización del proceso de extracción etanólica de *Lipidium peruvianum* Chacón, "maca". Universidad Nacional Mayor de San Marcos. <http://www.cybertesis.edu.pe/> (consulta del 20/10/2013).
- Björkman, M., I. Klingen, A.N. Birch, A.M. Bones, T.J.A. Bruce, T.J. Johansen, R. Meadow, J. Mølmann, R. Seljasen, L.E. Smart y D. Stewart. 2011. Phytochemicals of Brassicaceae in plant protection and human health - Influences of climate, environment and agronomic practice. Phytochemistry 72: 538-556.
- Briceño, G., J. García, A. Maselli y L.G. Rosales. 2011. Effect of ethanolic extracts of rue and neem on the control of phytopathogenic bacteria of the genus *Erwinia*. Agronomía Tropical 61(2): 141-148.
- Brown, P.D., J.G. Tokuhisa, M. Reichelt y J. Gershenzon. 2003. Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. Phytochemistry 62: 471-481.
- Calabrese, E.J., L.A. Baldwin. 2003. Hormesis: the dose-response revolution. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 43: 175-197.
- Castillo, F., D. Hernández, G. Gallegos, M. Mendez, R. Rodríguez, A. Reyes y C.N. Aguilar. 2010. *In vitro* antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia solani* Kühn. Industrial Crops and Products 32(3): 324-328.
- Colegate, S.M. y R.J. Molyneux. 2008. Bioactive Natural Products. Taylor & Francis Group. Boca Ratón.
- Conabio. 2009. *Raphanus sativus* L. <http://www.conabio.gob.mx/> (consulta del 27/09/2012).
- Drobnica, L., M. Zemanová, P. Nemeč, K. Antoř, P. Kristián, A. Štullerová, V. Knoppová y P. Nemeč. 1967. Antifungal activity of Isothiocyanates and related compounds. Applied Microbiology 15(4): 701-709.
- Elad, Y., B. Williamson, P. Tudzynski y N. Delen. 2007. Botrytis: biology, pathology and control. Springer, Dordrecht.
- Espinosa-García, F.J. y J.H. Langenheim. 2003. Effect of some leaf essential oil phenotypes in coastal redwood on the growth

- of several fungi with endophytic stages. *Biochemical Systematics and Ecology* 19: 629-642.
14. Islam, M.B. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* 19:603-608.
15. López-Diazguerrero, N.E., V.Y. González, R.J. Hernández-Bautista, A. Alarcón-Aguilar, A. Luna-López y M. Königsberg. 2013. Hormesis: lo que no mata, fortalece. *Gaceta Médica de México* 149: 438-447.
16. Malik, M.S. 2009. Biology and ecology of wild radish (*Raphanus raphanistrum*). Tesis. Clemson University, SC. 161 p.
17. Malik, M.S., M.B. Riley, J.K. Norsworthy y W. Bridges Jr. 2010. Glucosinolate Profile Variation of Growth Stages of Wild Radish (*Raphanus raphanistrum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 3309-3315.
18. Mari, M., R. Oiri, O. Leoni y A. Marchi. 1993. *In vitro* activity of glucosinolate-derived isothiocyanates against postharvest fruit pathogens. *Annals of Applied Biology* 123: 155-164.
19. Mendoza-García, E.E., L. D.Ortega-Arenas, R. Pérez-Pacheco y C. Rodríguez-Hernández. 2014. Repellency, toxicity, and ovoposition inhibition toxicity of vegetables extracts against greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* West. (Hemiptera: Aleyrodidae). *Chilean Journal of Agricultural Research* 74(1): 41-48
20. Oliva, A., K.M. Meepagala, D.E. Wedge, D. Harries, A.L. Hale, G. Aliotta, S.O Duke. 2003. Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 890-896.
21. Osorio-Concepción, M., S. Casas-Flores, C. Cortés-Penagos. 2013. The influence of phosphate limitation on conidiation in *Trichoderma atroviride* and light blind mutants. *Revista Mexicana de Micología* 37: 41-50.
22. Pedras, M.S. y P.W. Ahiahonu. 2005. Metabolism and detoxification of phytoalexins and analogs by phytopathogenic fungi. *Phytochemistry* 66: 391-411.
23. Sanabria, A., G. Mehuku, S. Kelemu, M. Cadavid, C. García, J. C. Hio, E. Martínez y J. A. Osorio. 2010. Molecular identification and characterization of *Colletotrichum* sp. Isolates from Tahiti lime, tamarillo and mango. *Agronomía Colombiana* 28(3): 391- 399.
24. Soliman, K.M. y R.I. Badaea. 2002. Effect of soil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*. 40(11): 1669-1675.
25. Veloz-García, R., R. Marín-Martínez, R. Veloz-Rodríguez, R. Rodríguez-Guerra, I. Torres-Pacheco, M.M. González-Chavira, J.L. Anaya-López, L. Guevara-Olvera, A.A. Feregrino-Pérez, G. Loarca-Piña y R.G. Guevara-González. 2010. Antimicrobial activities of cascote (*Caesalpinia cacalaco*) phenolics-containing extract against fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Industrial Crops and Products* 31(1): 134-138.
26. Vig, A.P., G. Rampal, T. S. Thind, S. Arora. 2009. Bio-protective effects of glucosinolates- A review. *Food Science and Technology* 42(10): 1561-1572.