

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*)

Eber Addi Quintana-Obregón¹, Maribel Plascencia-Jatomea¹, Armando Burgos-Hernández¹, José Cosme Guerrero-Ruiz², Norma Violeta Parra-Vergara¹, Mario Onofre Cortez-Rocha^{1*}

¹Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA), ²Departamento de Agricultura y Ganadería. Universidad de Sonora, Rosales y Luis Encinas s/n. Hermosillo, Sonora, México. C.P. 83000

Methanolic extract of *Datura stramonium* for control *in vitro* and *in vivo* of *Ramularia cercosporelloides*, causal agent of false powdery mildew of safflower (*Carthamus tinctorius*)

Abstract. The safflower production in the Mexican state of Sonora has been significantly affected by a new fungal disease caused by *Ramularia cercosporelloides*. Producers have been applied several fungicide treatments which implies high economic investment and high risk for environment pollution. The aim of this study was to evaluate the potential antifungal activity of the methanolic extract of *Datura stramonium* as an alternative to control this fungus. The effect of the methanolic extract on the radial growth kinetic, biomass production and the concentration required to delay 50% (CR₅₀) of radial growth were determined. An *in vivo* test was done to evaluate the effect of the methanolic extract on the safflower seed germination. The methanolic extract 10%, v/v caused 75.0% inhibition on the fungal growth at 96 h of incubation in media v8. When the CR₅₀ (3.0%, v/v) was applied the radial inhibition was 32.0%. The methanolic extract did not affect the biomass production. The safflower seed germination was not affected by the methanolic extract because most of the seedlings were normally developed.

Key words: Inhibition growth, extract plant, safflower

Resumen. La producción de cártamo en Sonora se ha visto significativamente afectada por el desarrollo de una enfermedad causada por el hongo *Ramularia cercosporelloides*. Productores locales han aplicado severos tratamientos con fungicidas incrementando los riesgos para el medio ambiente. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el uso del extracto metanólico de *Datura stramonium* como una alternativa para el control de *R. cercosporelloides*. Se evaluó el efecto del extracto metanólico sobre la cinética de crecimiento radial del hongo, determinando la concentración requerida para retardar la extensión radial en un 50% (CR₅₀) y se cuantificó la producción de biomasa. Además, se evaluó la germinación de semilla de cártamo tratada con el extracto metanólico de *Datura stramonium*. El extracto metanólico al 10% (v/v) inhibió en 75.0% el crecimiento radial de *Ramularia* a las 96 h de incubación en medio v8, y 32.0% al utilizar la CR₅₀ (3.0% v/v). El extracto metanólico no afectó la producción de biomasa con respecto al control metanólico. En germinación de semilla, se observó que la aplicación con el extracto metanólico no protegió contra la invasión de *Ramularia*. Sin embargo, las semillas germinaron y la plántula se desarrolló normalmente.

Palabras clave: Inhibición de crecimiento, extracto de plantas, cártamo

Received 14 August 2009; accepted 13 March 2010.

Recibido 14 de agosto 2009; aceptado 13 de marzo 2010.

Autor para correspondencia: Mario Onofre Cortez-Rocha
mcortez@guayacan.uson.mx

Introducción

Carthamus tinctorius L. es una planta miembro de la familia Compositae. En México la producción de cártamo ha sido afectada en los últimos años por una enfermedad denominada "falsa cenicilla del cártamo". El agente causal de esta fue recientemente identificado como el hongo *Ramularia cercosporelloides* U. Braun & Crous (Huerta-Espino *et al.*, 2006). La aparición de dicha enfermedad generó grandes pérdidas económicas en el ciclo agrícola 2000/2001, al disminuir el rendimiento promedio de producción de 2.2 Ton/ha a 1.4 Ton/ha agravándose el problema durante el ciclo 2004/2005 (CESAVE Sonora, 2008). Con base a lo anterior, se desarrollaron campañas de prevención y control de *R. cercosporelloides* mediante la aplicación de agentes fungicidas de uso agropecuario. Sin embargo, esta acción ha originado mayor gasto para el productor, debido a que se han requerido de hasta tres dosis adicionales por hectárea. Aunado a ello, los efectos adversos provocados por las excesivas cantidades de fungicidas (recalcitrancia, daños a la salud y contaminación ambiental, entre otros); lo cual ha obligado a la búsqueda de compuestos alternativos para controlar el crecimiento del hongo y así prevenir el desarrollo de la enfermedad. En este contexto, el uso de extractos de plantas silvestres o sus aislados, ha sido considerado como una alternativa viable para el control de bacterias y hongos (Draughon, 2004).

En Sonora se ha reportado el uso de plantas silvestres para el control de hongos fitopatógenos. Suárez-Jiménez *et al.*, (2007) y Tequida-Meneses *et al.*, (2002) reportaron la actividad fungistática de extractos metanólicos de plantas como *Ambrosia confertiflora* DC. (estafiate), *Azadirachta indica* A. Juss (neem), *Baccharis glutinosa* Pers. (batamote), y *Larrea tridentata* DC. (gobernadora o hediondilla). Sin embargo, existen muchas otras de las que se ha estudiado poco sobre sus propiedades antifúngicas o no hay reportes

sobre su utilización, siendo el toloache (*Datura stramonium* L.) una de ellas. Ésta es una planta del orden de las Solanaceas, hierba-arbusto de 30 cm a 1 m de alto, con fruto en forma de cápsula erecta armada con espinas largas y agudas (Heike, 2005). Además es una planta con resistencia y persistencia a plagas de insectos y hongos en la región. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto antifúngico *in vitro* del extracto metanólico de *D. stramonium* sobre el agente causal de la falsa cenicilla del cártamo y su efecto sobre la germinación de la semilla de cártamo.

Materiales y Métodos

Se utilizó semilla de cártamo variedad S-518 de tipo oleico, proporcionada por el Instituto de Nacional de Investigaciones Forestales y Pecuarías (INIFAP), Campo Experimental del Valle del Yaqui en Ciudad Obregón, Sonora, la cual es altamente susceptible al ataque por *R. cercosporelloides*.

Microorganismo

Se utilizó una cepa de *Ramularia cercosporelloides* aislada de cultivos comerciales de cártamo de la región del Valle del Yaqui, Sonora (Huerta-Espino *et al.*, 2006). La cepa refrigerada (5-7 °C) se traspasó a medio de cultivo agar papa dextrosa, PDA (Bioxon, USA) e incubándose a 25°C durante 7 días en oscuridad (Zhao *et al.*, 2002). Posteriormente se obtuvo un subcultivo en medio PDA a 25°C durante 7 días con fotoperiodos de 12 h luz-oscuridad (PRECISION Low Temperature Illuminated Incubator 818, LabMechanics, USA). El subcultivo se inoculó en 20 mL de medio agar jugo de vegetales v8 (medio v8), preparado como sigue: 200 mL de jugo v8, 3 g de CaCO₃, 15 g de agar base, y agua destilada hasta un volumen final de un litro (ATCC, 2008). Se incubó a 25°C durante 7 días, con fotoperiodos de 12 h luz-oscuridad. Posteriormente, las esporas y el micelio fueron resuspendidos en 20 mL de solución estéril de Tween 20 (0.1%), mediante

agitación magnética por 10 minutos. El inóculo se estuvo renovando cada 7 días después de preparado.

Extracto metanólico de *Datura stramonium*

Se colectaron muestras de *D. stramonium* en el área rural a 19 km al Este de Hermosillo, Sonora. Las plantas estaban alejadas de 3 a 4 km de la carretera principal. Se tomaron únicamente partes aéreas de la planta, tallos y hojas. Se secaron a temperatura ambiente a la sombra por 15 días. Se molió por separado tallos y hojas en un molino de martillos (Wiley laboratory mill modelo 4) hasta un tamaño de partícula de 0.5-1.0 mm. Se depositó cada fracción molida en bolsas Ziplock®, se cubrieron con papel de estrasa y se guardaron en refrigeración a -4°C hasta su uso.

El extracto metanólico se preparó de acuerdo a la técnica de Tequida-Meneses *et al.* (2002). Se elaboró el extracto al 10% (p/v) en metanol al 70%, usando para ello 5% de tallo y 5% de hoja (p/p). Se agitó por 15 minutos seguido de un reposo de 48 h a 25°C en la oscuridad. Se filtró en papel Whatman No. 4 y se descartaron los sólidos. El sobrenadante se redujo de 50 mL hasta 20 mL a 40°C y 45 rpm (0.09 g) en un rotavapor con vacío (LABCONCO ROTARY EVAPORATOR, LABCONCO CO., USA). Esta solución es el extracto metanólico de *D. stramonium* al que se hace referencia en los ensayos. Esta evaporación también se realizó al metanol al 70%, que se utilizó en los medios de control metanólico (solución de metanol evaporada).

Crecimiento radial

Diferentes porciones de extracto metanólico de *D. stramonium* fueron mezcladas con el medio de cultivo agar v8 estéril; posteriormente se vaciaron en placas Petri de 5 cm de diámetro. La concentración del extracto metanólico en los medios de cultivo fue de 1.25, 2.5, 5.0, y 10.0% (v/v). Como control se utilizó medio agar v8 adicionado con solución de metanol evaporada (v/v) (control metanólico), utilizando además un control de medio agar v8 sin metanol (control sin

disolvente)(Tequida-Meneses *et al.*, 2002).

La evaluación del crecimiento de extensión radial se realizó con la técnica descrita por Plascencia-Jatomea *et al.*, (2003) modificada como sigue: en el centro de cada placa Petri previamente preparada con el medio de cultivo se realizó una perforación de 0.6 cm con una pipeta Pasteur formando un pozo. Se inoculó en el pozo de cada caja de Petri 25 µl del inóculo de esporas, debido que no se logró determinar la concentración de esporas, como se explica en el apartado de discusiones y se incubó a 25°C con fotoperiodos de 12 h luz-oscuridad. Se midió el diámetro de la colonia de *R. cercosporelloides* cada 12 h para determinar la cinética de crecimiento radial y se comparó el valor con respecto al control metanólico. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial con la ecuación descrita por Plascencia-Jatomea *et al.*, (2003) y Holmes y Eckert (1999):

$$\text{Inhibición radial (\%)} = [(X_c - X_t)/X_c] \times 100$$

donde X_c es el radio promedio de la colonia en el medio control y X_t el radio de la colonia en medio con extracto metanólico de *D. stramonium*. Además se determinó la velocidad de extensión radial de la colonia U (mm/h) a partir de la pendiente resultante de graficar los valores del radio de la colonia con respecto al tiempo, y se obtuvo su coeficiente de determinación (R^2).

Se determinó la dosis requerida para controlar el crecimiento radial en un 50% (CR₅₀) con respecto al control metanólico, para lo cual se utilizó análisis Probit con un intervalo de confianza de 95% en el programa estadístico NCSS 2000 (NCSS Inc., USA) (Infante y Calderón, 1994; Finney, 1952).

Biomasa

Con el valor de CR₅₀ obtenido a partir de los datos de la cinética de crecimiento radial, se procedió a preparar medios para cuantificar la producción de biomasa. Para ello se utilizó medio agar v8 esterilizado a 121°C por 15 min, se dejó enfriar hasta cerca de 45°C y se mezcló con el extracto metanólico de

D. stramonium para obtener una solución final al 3% (v/v). Se prepararon también controles (control metanólico y control sin disolvente) que también se vaciaron en placas Petri de 5 cm de diámetro.

Cada una de las placas de Petri preparadas se inoculó con 25 µl de la suspensión de esporas y micelio colocados en el centro. Se distribuyeron en toda la superficie del medio con ayuda de una varilla de vidrio estéril (Paul *et al.*, 1993) y se incubaron a 25°C con fotoperiodos de 12 h luz-oscuridad. Cada 12 h se tomaron al azar de cada tratamiento 3 placas para cuantificar el peso seco de las colonias desarrolladas. Para ello, el medio de cultivo con el micelio fue separado de la placa y traspasado a un vaso de precipitado con 50 ml de agua destilada. Se calentaron en la autoclave hasta alcanzar 15 lb de presión e inmediatamente se desconectó la fuente de calor. De la solución obtenida se separó el micelio por filtración en papel Whatman # 2 previamente llevado a peso constante. El papel filtro con el micelio se secó en estufa de convección de aire a 105°C por 2 h y se enfriaron en un desecador. El peso seco de la colonia se expresó en mg/cm² de placa (Larralde *et al.*, 1997; López *et al.*, 1997).

Germinación de semilla de cártamo e infección fúngica

Se preparó una solución de extracto metanólico de *D. stramonium* al 3% (v/v) disuelto con agua estéril. Además un control que consistió en metanol (70%) llevado al 3% (v/v) con agua estéril y se evaporó reduciendo el volumen de 50 mL a 20 mL en el rotavapor a 40°C y 45 rpm.

La germinación de semilla de cártamo se realizó de acuerdo a Cruz *et al.* (2005) con las siguientes modificaciones: las semillas se desinfectaron superficialmente por remojo en solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1% por 2 minutos. Se lavaron dos veces con agua destilada estéril y se dejaron secar sobre papel estéril. Se hicieron al azar dos lotes, cada uno con 50 semillas desinfectadas, los cuales se remojaron por separado durante 15 y 60 min. Después de cada tiempo de remojo se tomaron 10

semillas que se dejaron secar durante 3 horas en condiciones asépticas. Posteriormente, cada semilla se sumergió individualmente en 20 mL de suspensión de micelio y esporas por 5-10 s para infección artificial por inmersión. Estas semillas se colocaron en placas de Petri de 8 cm de diámetro con papel de estrasa en la base y sobre este una capa de algodón previamente mojados con agua estéril. Se incubaron a 25°C con fotoperiodos de 12 h luz-oscuridad y se contó el número de semillas germinadas e infectadas a las 72 horas.

Ensayo *in vivo*

Para el ensayo *in vivo* se tomaron 10 semillas remojadas por 60 minutos de cada tratamiento (extracto de *D. stramonium* y los controles) como se describió previamente y se contaminaron artificialmente por inmersión en la suspensión de inóculo por 30 s. Cada semilla se colocó en un vaso con tierra de invernadero estéril y se incubó a 25°C con fotoperiodos de 12 h luz-oscuridad. A las 96 horas se midió la altura de la plántula de manera manual con una regla y el ancho de la plántula con un caliper digital (Truper®).

Análisis estadístico

Los ensayos de crecimiento radial se realizaron por cuadruplicado, la producción de biomasa por triplicado, germinación de semilla por cuadruplicado y de semilla *in vivo* por decena. Se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) para determinar diferencia estadística entre los tratamientos de cada ensayo. Además se determinó la CR₅₀ mediante análisis Probit con el programa NCSS (2000). Asimismo, se compararon los tratamientos con la prueba de rangos múltiples de Tukey (P<0.05) y pruebas de contraste con el programa estadístico JMP versión 5.0.

Resultados

El crecimiento radial de *R. cercosporoides* en el medio agar

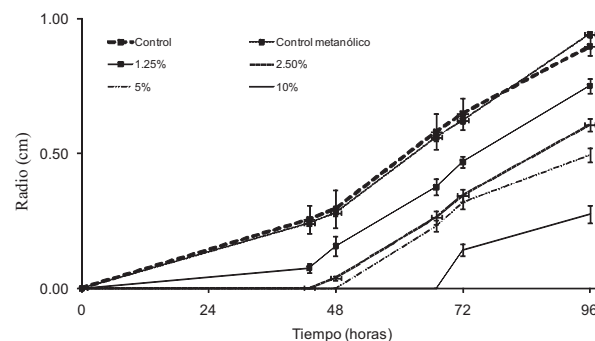


Figura 1. Cinética de crecimiento radial *in vitro* de *Ramularia cercosporoides* en medio v8 con diferente concentración de extracto metanólico de *Datura stramonium* a 25°C y fotoperiodos de 12 h luz-oscuridad.

v8 y el medio agar v8 adicionado con solución de metanol al 70% evaporado (control metanólico) no presentaron diferencia significativa entre sí (P<0.05). Se observó que el extracto metanólico de *D. stramonium* a diferentes concentraciones inhibió significativamente (P<0.05) el crecimiento radial del hongo a las 48 h (Figura 1).

Se observó que el porcentaje de inhibición del radio de la colonia se incrementó al aumentar la concentración de extracto metanólico en el medio, encontrando porcentajes de inhibición radial de 33.70 ±2.36, 46.41±2.11, 56.35±2.28 y 75.69±2.7 para las concentraciones de extracto 1.25, 2.50, 5.0, y 10% (v/v), respectivamente a las 96 h. Además mostraron diferencia significativa (P<0.05) con respecto al control metanólico y control sin solvente. Se estimó mediante análisis Probit que la cantidad de extracto metanólico de *D. stramonium* requerida para retardar el crecimiento radial de la colonia en un 50% (CR₅₀) a las 96 h es de 3.0% (v/v). Al utilizar la CR₅₀ se observó que el crecimiento radial de *R. cercosporoides* presentó diferencia significativa (P<0.05) con respecto al control sin disolvente y al control metanólico (Tabla 1) (Figura 2).

Los porcentajes de inhibición radial para una concentración de 3.0% de extracto metanólico de *D.*

stramonium fueron de 48.8±2.94, 36.9±1.90 y 32.7±1.11% a las 48, 72 y 96 h, respectivamente. La velocidad de crecimiento radial de la colonia fue de 0.091 mm/h (R²>0.9) y en el control metanólico de 0.115 mm/h (R²>0.9), lo cual indica que el extracto metanólico presenta efecto fungistático al retardar la velocidad de extensión radial del hongo.

El extracto metanólico de *D. stramonium* causó un efecto moderado en la producción de biomasa del hongo, encontrando valores estadísticamente similares (P<0.05) con respecto al control. La tasa específica de crecimiento del hongo fue de 0.040 y 0.037 mg/h por cm² para el control metanólico y el extracto metanólico de *D. stramonium*, respectivamente; en ambos casos los coeficientes R² fueron superiores a 0.90.

Germinación de semilla de cártamo e infección fúngica

En germinación de semilla de cártamo no se encontró diferencia significativa (P<0.05) entre el control metanólico, control sin disolvente, y extracto metanólico de *D. stramonium* ni entre los tiempos de remojo (datos no presentados). En lo referente al porcentaje de infección en semilla de cártamo, en los dos tiempos de remojo (15 y 60 min), se presentó infección cercana al 100% sobre la

Tabla 1. Efecto de extracto metanólico de *Datura stramonium* al 3% en el desarrollo del *Ramularia cercosporelloides*

Tratamiento	Crecimiento radial		Producción de biomasa	
	Tiempo (horas)	Radio (cm)	Tiempo (horas)	Biomasa (mg/cm ²)
Control sin disolvente	48	0.35 ± 0.03 ^a	24	0.54 ± 0.07 ^b
Control metanólico		0.36 ± 0.01 ^a		0.76 ± 0.09 ^a
Extracto de <i>D. Stramonium</i>	72	0.18 ± 0.03 ^b	48	0.50 ± 0.04 ^a
Control sin disolvente		0.67 ± 0.04 ^a		1.60 ± 0.08 ^a
Control metanólico	96	0.70 ± 0.01 ^a	60	1.82 ± 0.08 ^a
Extracto de <i>D. Stramonium</i>		0.44 ± 0.01 ^b		1.79 ± 0.08 ^a
Control sin disolvente	96	0.97 ± 0.09 ^a	60	1.96 ± 0.01 ^a
Control metanólico		0.94 ± 0.01 ^a		2.38 ± 0.13 ^a
Extracto de <i>D. Stramonium</i>		0.63 ± 0.01 ^b		2.11 ± 0.10 ^a

Valores expresados como media estadística y error estándar de cuatro réplicas. Diferente superíndice indica diferente grupo estadístico por tiempos. Tukey P<0.05.

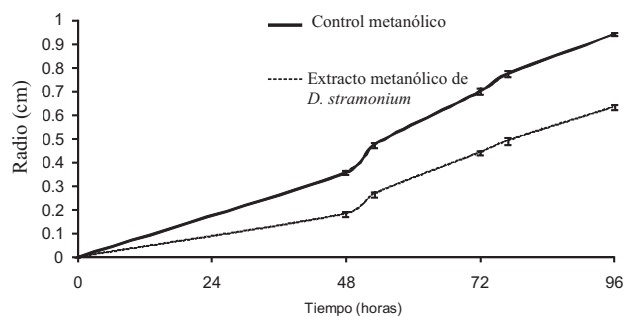


Figura 2. Cinética de crecimiento radial *in vitro* de *Ramularia cercosporelloides* en medio v8 con extracto metanólico de *Datura stramonium* al 3% a 25°C y fotoperiodos de 12 h luz-oscuridad.

superficie a las 72 h, y no se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los dos tratamientos (datos no presentados).

Siembra *in vivo*

Las plántulas resultantes de las semillas sembradas en vasos y sometidas a 60 min de remojo, no mostraron evidencia física de infección a las 96 h posteriores a su siembra en vasos. Asimismo, no se observó diferencia significativa ($P \geq 0.05$)

entre la altura de las plántulas ni en el grosor de la parte media de los tallos. La altura de las plántulas fue de 0.96 ± 0.30 , 1.12 ± 0.41 y 1.12 ± 0.42 cm para las del control sin solvente, control metanólico, y extracto de *D. stramonium*, respectivamente. Por otra parte, el grosor de la parte media de las plántulas fue de 1.55 ± 0.42 , 1.62 ± 0.44 , y 1.51 ± 0.42 mm para el control sin solvente, control metanólico, y extracto de *D. stramonium*, respectivamente.

Discusión

Existe escasa información y reportes sobre la especie *Ramularia cercosporelloides*. Kirschner (2009), reporta que es difícil trabajar con esta especie en laboratorio, ya que según las condiciones de crecimiento puede presentar estructuras reproductoras correspondientes al género *Ramularia*, en otras al género *Cercospora*, y cambios en la estructura las esporas.

Al observar las características de la morfología de las estructuras reproductoras del hongo durante la preparación de los inóculos, se observó la presencia de esporas de ambos géneros, *Ramularia* y *Cercospora*. La cantidad de las mismas variaba aún entre muestras observadas de un mismo cultivo, por lo que se estandarizó las condiciones de cultivo y la suspensión de esporas y de micelio. Por ello, es necesario establecer condiciones de crecimiento de este hongo en laboratorio que favorezcan el desarrollo de una sola forma reproductora (conidio).

En este estudio, al no encontrar diferencia significativa entre el control sin disolvente y el control metanólico en crecimiento radial y producción de biomasa, se demuestra que la técnica de extracción y obtención del extracto de *D. stramonium* es adecuada, y por lo tanto, el efecto inhibitorio encontrado en los ensayos se puede atribuir únicamente a los compuestos extraídos de la planta.

No se ha encontrado en la literatura estudios de extractos de plantas para el control de este hongo en particular, sin embargo, existen reportes en otros organismos como hongos fitopatógenos y bacterias. Efectos en la inhibición de crecimiento como el producido por el extracto metanólico de *D. stramonium* en *R. cercosporelloides* han sido reportados en bacterias Gram-positivas por Pérez *et al.* (1993), ya que en su estudio señalan inhibición por extractos acuosos y metanólicos (al 2.8%) de *Sechefflera octophylla* Endl. Así mismo, Tequida-Meneses *et al.* (2002) reportan

inhibición en seis especies de hongos por extracto metanólico y etanólico de *Larrea tridentata* en un rango del 41% hasta el 100%, con extracto metanólico de *Bacharis glutinosa* del 66% y 53% para *Fusarium poae* (Peck.) y *Fusarium moniliforme* (Sheldon), respectivamente. Lo cual indica que el metanol por su polaridad es un solvente adecuado para extraer compuestos con propiedades antifúngicas.

Rivera-Castañeda *et al.* (2001) estudiaron el extracto metanólico de *D. stramonium*, aunque no mencionan si éste presentó efecto inhibitorio, reportan que no favorece el crecimiento del hongo *Tilletia indica* Mitra. Türküsay y Onogur (1998) reportaron inhibición fúngica por extractos de *D. stramonium* en medio PDA, mientras que Eftekhary *et al.* (2005) encontraron actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *D. stramonium* con presencia de alcaloides en concentración de 2.5 g/L, sobre bacterias Gram-positivas. Asimismo, Hernández *et al.* (2007) observaron efecto antifúngico en *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) por el extracto crudo de *Cestrum nocturnum* (Jeps.), una solanaceae al igual que *D. stramonium*.

Al no detectar cambio en la producción de biomasa por *R. cercosporelloides* con el extracto metanólico de *D. stramonium*, nos indica que a pesar de existir un efecto inhibitorio en el crecimiento radial de la colonia, ésta puede estar desarrollando micelio aéreo. Roller y Covill (1999) reportan la formación de colonias fúngicas compactas con producción de micelio aéreo en medio de cultivo con compuestos naturales. Asimismo, Plascencia-Jatomea *et al.* (2003) reportan alta densidad de micelio durante el crecimiento de *Aspergillus niger* como respuesta a la presencia de compuestos antifúngicos naturales, formando colonias compactas y con micelio aéreo. Es posible que el extracto metanólico de *D. stramonium* en *R. cercosporelloides* este causando el mismo efecto que el observado por estos autores.

El efecto inhibitorio sobre el crecimiento radial puede deberse a la presencia de compuestos con actividad

antifúngica, y el efecto sobre la biomasa a una respuesta fisiológica del crecimiento del hongo con esos compuestos. Selitrennikoff (2001) describe que la producción de compuestos de bajo peso molecular como fitoalexinas, péptidos y proteínas (tioninas) en las plantas, es el resultado de respuesta defensiva hacia patógenos como virus y hongos. Waizel-Bucay y Martínez (2007) aislaron compuestos de plantas empleadas en Odontalgia, y describen a *D. stramonium* como una planta venenosa, en particular sus semillas, debido a la producción de alcaloides tóxicos del tipo tropano (atropina, hioscina, taninos, datugeno, datugenina, y anti-O-lectinas). Por su parte, Namdeo (2007) reporta la producción de metabolitos secundarios en plantas como respuesta a adaptaciones química, estrés, defensa y protección contra ataques de microorganismos y herbívoros. Además menciona factores de respuesta bióticos (microorganismos) y abióticos como los iones metálicos que promueven la producción de sesquiterpenoides. También hace hincapié que de *D. stramonium* se aisló al compuesto libimina como respuesta a presencia de esporas fúngicas. Por lo tanto, el extracto metanólico de *D. stramonium* al 3.0% fue capaz de inhibir el crecimiento radial de *R. cercosporioides*, el agente causal de la falsa cenicienta del cártamo por efecto de la presencia de uno o más compuestos activos ya mencionados. Sin embargo, el hongo es capaz de adaptarse a estos compuestos creciendo apicalmente en lugar de extenderse radialmente a través del medio de cultivo.

Al no encontrar diferencia significativa en el porcentaje de germinación de la semilla de cártamo entre los tratamientos, indican que la solución de disolvente evaporada y el extracto de la planta no afectan la germinación de la misma. En lo referente al porcentaje de infección en semilla de cártamo, el desarrollo del hongo sobre la plántula no presentó evidencia física de daños en la emergencia de la plántula ni en el desarrollo posterior. La falta de protección de la semilla a la falsa cenicienta del cártamo puede deberse entre otros factores, a la presencia no solo de alta contaminación

superficial, sino también a la presencia de infección interna natural proveniente del campo. Lo anterior ya que aún cuando se realizó una desinfección con hipoclorito de sodio de manera superficial, la contaminación interior permaneció. Por lo tanto el extracto metanólico de *D. stramonium* (3.0%) no fue adecuado para controlar el crecimiento *in vivo* del hongo. Por lo anterior se debe probar con concentraciones más altas, como se reporta en estudios para otras semillas, o aislar y purificar el compuesto activo contenido en el extracto metanólico de *D. stramonium* para su estudio.

La evaluación del porcentaje de germinación de la semilla se hizo para determinar si los disolventes que contenía el extracto de *D. stramonium* influían en la germinación, demeritando un importante atributo para el agricultor al tratar de combatir la infección fúngica.

Aún cuando las plántulas obtenidas de semillas sembradas en los vasos de poliuretano no manifestaron daño físico aparente en ninguno de los tratamientos, no implicó que el hongo no haya estado presente en la planta, pues previamente las semillas habían sido infectadas artificialmente, lo que indica que el mecanismo de entrada a la planta ocurre de manera sistemática. Walters *et al.* (2008) reportan en cebada que desde la semilla hasta los primeros estadios de crecimiento no se presenta evidencia física o sintomatológica de infección por *Ramularia collo-cygni*, siendo ésta solo detectable por la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR). Asimismo, la manifestación y sintomatología de la enfermedad se presenta cuando la planta pasa de un estado de crecimiento vegetativo al estado reproductor.

Agradecimientos

Estudio apoyado parcialmente con recursos del proyecto 58249 financiado por CONACYT: Evaluación de la actividad

antifúngica *in vitro* de extractos vegetales y quitosano y de su impacto en la producción de micotoxinas por *Fusarium verticillioides* y *Aspergillus flavus*.

Literatura citada

- ATCC, 2008. ATCC medium 343 V8 juice agar. <http://www.atcc.org/Attachments/3662.pdf>. Última consulta junio 2008.
- CESAVE Sonora, 2008. Vigilancia fitosanitaria. Falsa cenicienta del cártamo. Informe técnico. http://cesaveson.com/archivosYdocumentos/cartamo_infotecCfc2006.pdf. Última consulta 26 de mayo de 2008.
- Cruz, A., D. Rivero, B. Martínez, M.A. Ramírez, L. Maqueira, 2005. Efecto de la quitosana sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro* del hongo *S. oryzae* Sawada y de la protección de semillas de arroz (*Oryza sativa* L.). Cultivos Tropicales 26: 83-86.
- Draughon, A., 2004. Use of botanicals as biopreservatives in foods. Food Technology 58: 20-28.
- Eftekhari, F., M. Yousefzadi, V. Tafakori, 2005. Antimicrobial activity of *Datura innoxia* and *Datura stramonium*. Fitoterapia 76: 118-120.
- Finney, D.J., 1952. Probit analysis. Cambridge University Press, London.
- Hernández, A.R.C., N.L.L. Barrera, S. Bautista-Baños, L.L. Bravo, 2007. Antifungal potential of crude plant extracts on conidial germination of two isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. Revista Mexicana de Fitopatología 25: 180-185.
- Holmes, G.J., J.W. Eckert, 1999. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. Phytopathology 89: 716-721.
- Huerta-Espino, J., O. Constantinescu, C. Velázquez, S.A. Herrera-Foessel, P. Figueroa-López, 2006. First report of *Ramularia cercosporioides* on *Carthamus tinctorius* in Northwestern México. Plant Disease 90: 1552.
- Infante, G.S., A.L. Calderón, 1994. Manual de análisis probit. Colegio de Postgraduados. Centro de Estadística y Cálculo. Cámara Nacional de la Industria Editorial Mexicana, México.
- Kirschner, R., 2009. *Cercospora* and *Ramularia*. Mycologia 101: 110-119.
- Laralde, C.C., I.F. López, G.G. Viniestra, 1997. Morphometric evaluation of the specific growth in agar plates at high glucose levels. Biotechnology and Bioengineering 56: 287-294.
- López, F., P. Laralde, G. Viniestra, 1997. Mass transfer and growth kinetics in filamentous fungi. Chemical Engineering Science 52: 2629-2639.
- Namdeo, A.G., 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. Pharmacognosy Reviews 1: 69-79.
- Paul, G.C., C.A. Kent, C.R. Thomas, 1993. Viability testing and characterization of germination of fungal spores by automatic image analysis. Biotechnology and Bioengineering 42: 11-23.
- Pérez, R.M.G., G.S. Pérez, S.R. Vargas, M.A. Zavalas, G.C. Pérez, 1993. Antimicrobial activity of different extracts of five plants. Actes du 2^o Colloque Européen d'Ethnopharmacologie de la 11^e Conférence Internationale d'Ethomédecine, Heidelberg, 24-27 March, pp.292-293.
- Plascencia-Jatomea, M., G. Viniestra, R. Olayo, M.M. Castillo-Ortega, K. Shirai, 2003. Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. Macromolecules Bioscience 3: 582-586.
- Rivera-Castañeda, G., M.A. Martínez-Téllez, S. Vallejo-Cohen, G. Álvarez-Manilla, I.C. Vargas-Arispuro, P. Moya-Sanz, E. Primo-Yufura, 2001. *In vitro* inhibition of mycelial growth of *Tilletia indica* by extracts of native plants from Sonora, Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 19: 214-217.
- Roller, S., N. Covill, 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. International Journal Food Microbiology 47: 67-77.
- Selitrennikoff, C.P., 2001. Antifungal proteins. Applied Environmental Microbiology 67: 2883-2894.
- Suárez-Jiménez, G.M., M.O. Cortez-Rocha, E.C. Rosas-Burgos, A. Burgos-Hernández, M. Plascencia-Jatomea, F.J. Cinco-Moroyoqui, 2007. Antifungal activity of plant methanolic extracts against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. and fumonisin B₁ production. Revista Mexicana de Fitopatología 25: 134-142.
- Tequida-Meneses, M., M. Cortez-Rocha, E.C. Rosas-Burgos, S. López-Sandoval, C. Corrales-Maldonado, 2002. Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. Revista Iberoamericana de Micología 19: 84-88.
- Türküsay, H., E. Onogur, 1998. Studies on antifungal effects of some plant extracts *in vitro*. Turk Journal Agricultural Forestry 22: 267-271.
- Waizel-Bucay, J., I.M.R. Martínez, 2007. Plantas empleadas en Odontalgias 1. Revista ADM 64: 173-186.
- Walters, D., N.D. Havis, S.J.P. 2008. Oxley. *Ramularia collo-cygni*: The biology of an emerging pathogen of barley. FEMS Microbiology Letters 279: 1-7.
- Zhao, Y., B.W. Groat, X. Xu, 2006. Effects of temperature on germination and hyphal growth from conidia of *Ramularia rhei* and *Ascochyta rhei*; causing spot disease of rhubarb (*Rheum raphaniticum*). Plant Pathology 55: 664-670.