

Efecto nematocida y fungicida de extractos hidroalcohólicos de *Piper lapathifolium* y *P. melastomoides*

Nematicidal and fungicidal effect of hydroalcoholic extracts of *Piper lapathifolium* and *P. melastomoides*

Carmona Hernández, Oscar¹, José Armando Lozada García^{2✉}, María del Socorro Fernández², Mauricio Luna Rodríguez¹, María de Jesús Martínez Hernández¹ y José Antonio Guerrero Analco³

¹Facultad de Ciencias Agrícolas Xalapa, Universidad Veracruzana. Circuito Universitario Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Col. Zona Universitaria, Xalapa, Veracruz C.P. 91000

²Facultad de Biología Xalapa, Universidad Veracruzana. Circuito Universitario Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Col. Zona Universitaria, Xalapa, Veracruz C.P. 91000

³Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecología A. C. Carretera Antigua Xalapa-Coatepec Km 2.5. Xalapa, Veracruz.

✉ Autor de correspondencia: alozada@uv.mx

Recibido: 13/07/2018

Aceptado: 12/09/2018

RESUMEN

El género *Piper* ha mostrado tener efectos biocidas sobre diferentes organismos nocivos para la agricultura como lo son nematodos y hongos fitopatógenos. Debido a que mayoría de estos organismos son contralados o erradicados con compuestos químicos tóxicos, se han estado buscando alternativas para sustituirlos, incluyendo el uso de extractos naturales, como los de *Piper*. En este sentido el presente trabajo se evaluó el efecto nematocida y fungicida de extractos hidroalcohólicos (ETOH: H₂O 7:3) de *Piper lapathifolium* y *P. melastomoides*. El efecto nematocida se determinó en *Panagrellus redivivus* en un ensayo a 24 horas y se estimó la Concentración Letal Media (CL₅₀). El efecto fungicida se evaluó en *Fusarium oxysporum* y *F. solani*, por el ensayo de dilución en placa. La Concentración Efectiva Media (CE₅₀) se estableció mediante el modelo de Probit. Los resultados mostraron que *P. melastomoides* presentó efecto nematocida a concentraciones menores de 5 mg/mL con una CL₅₀ de 2.32 mg/mL, en el caso de *P. lapathifolium* no presentó actividad en los nematodos, en el caso de la actividad fungicida este extracto fue el que tuvo mayor actividad en ambas especies de *Fusarium* (CE₅₀: 26.32 y 5.83 mg/mL), mientras que para *P. melastomoides* se presentó una menor actividad. Se concluye que *P. melastomoides* tiene efecto nematocida y *P. lapathifolium* fungicida.

Palabras clave: *Fusarium*, *Panagrellus redivivus*, Biocida.

ABSTRACT

The *Piper* has been shown to have biocidal effects on different organisms harmful to agriculture such as phytopathogenic nematodes and fungi. Because most of these organisms are controlled or eradicated with toxic chemical compounds, less toxic alternative have been sought to replace them, included natural extracts, such as those of *Piper*. In this sense, the present work evaluated the

namaticidal and fungicidal effect of the hydroalcoholic extracts (ETOH: H₂O 7: 3) of *Piper lapathifolium* and *P. melastomoides*. The nematicidal effect was determined in *Panagrellus redivivus* in a 24-hour trial and the Mean Lethal Concentration (LC₅₀) was estimated. The fungicidal effect was evaluated in *Fusarium oxysporum* and *F. solani*, by the plate dilution test. The Average Effective Concentration (EC₅₀) was shown by the Probit model. The results showed that *P. melastomoides* presented a nematicidal effect at levels lower than 5 mg / ml with an LC₅₀ of 2.32 mg / ml, in the case of *P. lapathifolium* it did not present activity in the nematodes, in the case of the fungicidal activity this extract (EC₅₀: 26.32 and 5.83 mg / mL), whereas *P. melastomoides* exhibited lower activity. It is concluded that *P. melastomoides* has a nematicidal effect and *P. lapathifolium* fungicide.

Keywords: *Fusarium*, *Panagrellus redivivus*, Biocidal.

INTRODUCCIÓN

El género *Piper* comprende cerca de 1500 especies distribuidas a lo largo del mundo en zonas tropicales, siendo más diversas en el continente americano, especialmente en bosques húmedos premontanos y tierras bajas. De los 1500 taxa descritos cerca 136 están reportadas para México y 86 para Veracruz (Sosa y Gómez-Pompa, 1994; Villaseñor, 2016). Debido a su elevada diversidad, por lo cual representa un gran potencial biológico en la búsqueda de compuestos con bioactividad. En este sentido la biotecnología, ha encontrado en las especies del género *Piper* un recurso natural de gran importancia, puesto que en éste. Se han reportado que tienen una amplia variedad de efectos biocidas en el género *Piper*, entre los que destacan la actividad bactericida, insecticida, antiprotozoarios, fungicida, antihelmíntica y nematicida (Scott *et al.*, 2008; Carmona *et al.*, 2016). Atribuibles a sus más de 667 fitocompuestos descritos (Parmar *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2001). Recordando que los nematodos son un problema fitosanitario para las plantaciones interés comercial, principalmente los géneros *Meloidogyne* y *Gobodera* (Johnson y Olsen, 2010); mientras que los hongos fitopatógenos son responsables de enfermedades como el marchitamiento del

banano y de algunas solanáceas de importancia económica, dada su importancia se ha buscado como erradicarlos o contenerlos con métodos ecológicamente aceptables como, lo son el uso de extractos del género *Piper*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta e identificación de especímenes

Piper melastomoides y *P. lapathifolium* fueron colectados en la Reserva Ecológica la Martinica en el municipio de Banderilla, Veracruz, en enero del 2018, estos fueron identificados por comparación en los herbarios XAL y con ayuda de la base de datos del MEXU.

Preparación de extractos

1.5 kg de hojas de cada especie fueron secadas a 60 ± 5 °C, posteriormente fueron molidas hasta obtener un polvo fino (Soberon *et al.*, 2006). Los extractos fueron obtenidos mediante maceración al 10 % (p:v) en Etanol 70 % y concentrados a presión reducida (Kusuma *et al.*, 2017; Moreno *et al.*, 2000).

Ensayo en Panagrellus redivivus

La cepa de *P. redivivus* utilizada en esta investigación se cultivó en medio avena:agua (1:1). Se utilizaron nematodos J2 para los ensayos. Los gusanos se extrajeron del medio con buffer M9 (3g KH₂PO₄, 6 g Na₂HPO₄, 5g

NaCl, 0.25g MgSO₄ 7H₂O en un litro de agua) (Brenner, 1974; Pica, 2008; Agyare *et al.*, 2014). Los nematodos obtenidos del medio de cultivo se traspasaron a un tubo de plástico para 2 ml y se centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante se descartó y se realizaron dos lavados más con buffer M9.

El ensayo se realizó en microplacas de 96 pozos, en cada pozo se depositaban 10 organismos, para cada prueba se manejaron cinco concentraciones de los extractos resuspendidos en buffer M9, más un control sin el extracto, el diseño fue completamente al azar. El tiempo de exposición fue de 24 horas a 22 ± 2° C. Posteriormente se contabilizó el número de organismos muertos, todo esto se determinó mediante inspección visual con ayuda de un microscopio estereoscópico (Katiki *et al.*, 2011; Roh y Choi, 2007; Agyare *et al.*, 2014).

Cultivo y ensayo en *Fusarium spp*

Se utilizaron las cepas de *Fusarium oxysporum* y *F. solani*, las cuales fueron cultivadas en Agar Papa Dextrosa (PDA Sigma Aldrich) a 27 °C por 7 días, después de este tiempo se mantenían en crecimiento constante y en recultivo. El ensayo se realizó mediante el método de vaciado en placa, este consistió en colocar el medio de cultivo con diferentes concentraciones de los extractos crudos, depositando en el centro de la placa de petri un disco de 5 mm de las cepas de *Fusarium*, las cajas fueron incubadas 27 °C por 7 días, posterior a esto se midió el crecimiento micelial, el diseño del experimento fue completamente al azar (Neela *et al.*, 2014).

Caracterización fitoquímica preliminar

La identificación de los metabolitos secundarios presentes en las dos especies se realizó

mediante pruebas fitoquímicas preliminares, para alcaloides (Mayer, Draguendorff y Wagner), flavonoides (Shinnoda, cloruro férrico y ácido sulfúrico), cumarinas (fluorescencia), saponinas (prueba de espuma y si esta permanecía más de 20 minutos se realizaba la prueba de Lieberman) y triterpenos y/o esteroides (Prueba de Lieberman-Bouchard), todo esto se basó en una escala cualitativa (Domínguez, 1979, Carmona-Hernández *et al.*, 2014).

Análisis estadístico

Se determinaron los porcentajes de mortalidad para el caso de los nematodos y porcentaje de inhibición para los hongos (Finney, 1987). Para los nematodos se calculó la Concentración Letal Media (CL₅₀) y en los hongos la Concentración Efectiva Media (CE₅₀) se estimó mediante el modelo de regresión lineal Probit, (Finney, 1987; Jensen *et al.*, 2006), utilizando el programa estadístico BioStat V5. Para comprobar si existía diferencias entre las concentraciones se realizó un ANOVA y una prueba posterior de Tukey, los datos no normales se analizaron una prueba ANOVA no paramétrica de Kruskal Wallis y el test posterior de Dunncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinó la actividad nematocida en uno de los dos extractos trabajados, siendo el extracto de *Piper melastomoides* con mayor actividad estimándose una CL₅₀ de 2.323 mg/mL (Tabla 1) y fue el extracto más activo. Por el contrario, no se encontró efecto sobre los nematodos del extracto de *P. lapathifolium*, cuya CL₅₀ en 3 g/mL, esto debido a que el modelo no se puede ajustar a la baja o nula mortalidad que éste presentó, la cual no difiere significativamente del control (Figura 1 a y b). Esto refuerza los ya

reportados para algunas especies del género que han mostrado tener efecto biocida como el caso de *P. nigrum* sobre *Meloidogyne incognita*; *P. chava* sobre *C. elegans* (Wiratno *et al.*, 2009; Atjanasuppat *et al.*, 2009). Al igual que el extracto etanólico *P. aduncum* sobre *Haemonchus contortus* con una CL₅₀ de 2.5

mg/mL. El extracto de *P. melastomoides* presentó actividad a bajas concentraciones e inclusive menores a las reportadas para algunos plaguicidas sintéticos (clorpirifos CL₅₀ 19.4 mg/mL, carbosulfan CL₅₀ 25.3 mg/mL y deltametrina CL₅₀ > 40 mg/mL) (Wiratno *et al.*, 2009).

Tabla 1. Concentraciones letales medias y concentraciones efectivas medias de los extractos de *Piper*.

Modelo	Extracto	CL ₅₀ /CE ₅₀	P
<i>Panagrellus redivivus</i>	<i>P. melastomoides</i>	2.32 mg/mL	0.016
	<i>P. lapathifolium</i>	3.25 mg/mL	0.5777
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>P. lapathifolium</i>	26.32mg/mL	0.5270
	<i>P. melastomoides</i>	80.28 mg/mL	0.0488
<i>Fusarium solani</i>	<i>P. lapathifolium</i>	5.83 mg/mL	0.0001
	<i>P. melastomoides</i>	54.66 mg/mL	0.0001

En el caso de la actividad fungicida se determinó que el extracto de *Piper lapathifolium* fue el que presentó mayor actividad sobre *Fusarium solani*, con una CE₅₀ de 5.28 mg/mL; con el 95 % de inhibición del crecimiento (Tabla 1 y Figura 1. c, d, e, f). Para el resto de los extractos el efecto fue reducido con menos del 50 % de inhibición, siendo los extractos de *P. melastomoides* los menos efectivos. Cabe mencionar que la cepa de *F. oxysporum* resultó ser menos susceptible que *F. solani*, e inclusive se ha reportado que *F. oxysporum* muestra resistencia a plaguicidas sintéticos como al carbendazim, dithane M-45 y metil tiofanato con crecimientos entre 20.5, 22.3 y 14.3 mm respectivamente (Gnanaskaran *et al.*, 2015). A pesar de que los resultados no fueron los esperados para *F. oxysporum*, caso contrario a la efectividad sobre *F. solani*,

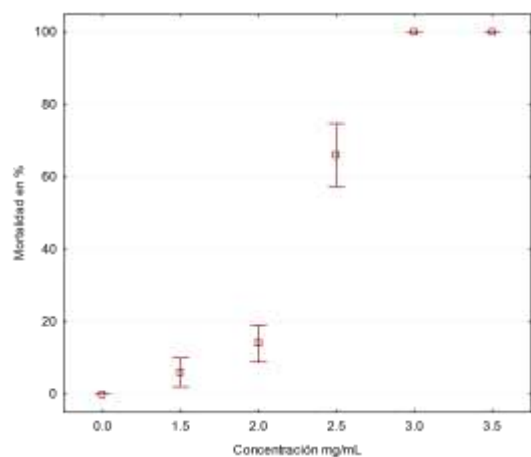
además de que esto abre la posibilidad de buscar otros extractos del género *Piper*, con actividad fungicida puesto que se ha reportado que algunas especies como *P. betle*, tiene efectos sobre *F. oxysporum* var. *vanillae*, y en el caso de *P. hispidum*, *P. eriopodom*, *P. bremedayeri*, *P. bogontense*, *P. marginatum* y *P. divacatum* han probado ser efectivas sobre *F. oxysporum* var. *vanillae* (Tangarife-Castaño *et al.*, 2014; Singha *et al.*, 2011; Ngurah *et al.*, 2007). Por ello se deben ampliar los estudios en búsqueda de extractos que presenten mayor actividad. El análisis fitoquímico preliminar dio como resultados la presencia de alcaloides, terpenos y flavonoides, así como nula presencia de saponinas y cumarinas (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis fitoquímico preliminar de las dos especies de *Piper*.

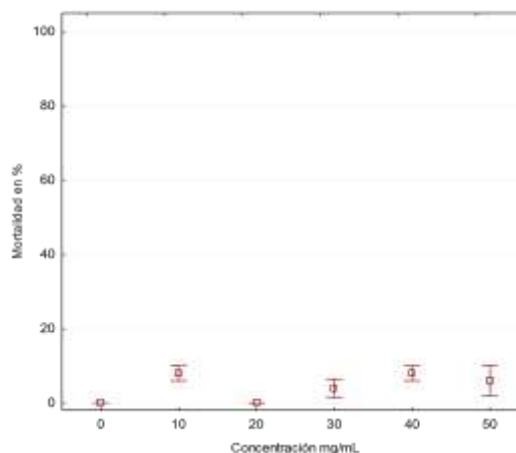
Extracto	Compuesto Especie	Alcaloides		Flavonoides			Saponinas		Cumarinas	Terpenos y/o esteroides	
		Prueba									
		M	D	W	A	C	S	E	L	CU	LB
Hidroalcoholico 30/70	<i>P. melastomoides</i>	+	+	+	-	+	-	-	n/d	-	+
	<i>P. lapathifolium</i>	+	+	+	-	+	-	-	n/d	-	+

Alcaloides: M= Prueba de Mayer, D= prueba de Drangendorff y W= prueba de Wagner. Flavonoides: A= Prueba del H₂SO₄, C= FeCL₂, S= prueba de Shinoda. Saponinas: E= Prueba de la espuma, L= Prueba de Lieberman. Cumarinas: CU= Prueba de Fluorescencia. Triterpenos y/o Esteroles: LB= Prueba de Lieberman-Bouchard. Intensidad: Presencia +, Ausencia - y n/d no determinada.

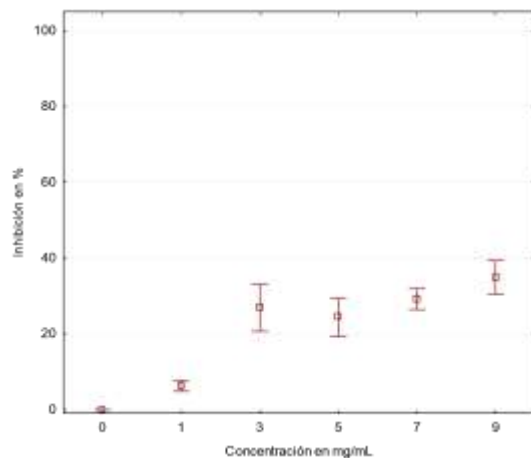
A



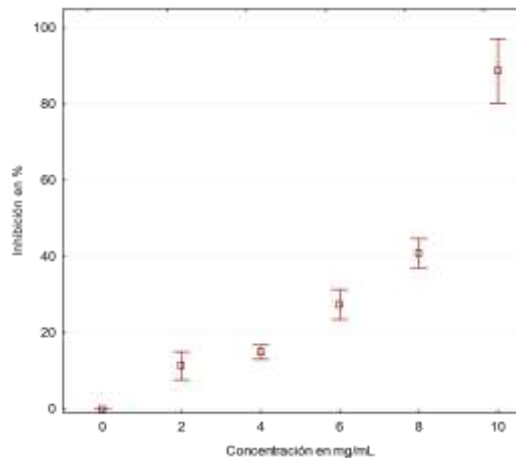
B



C



D



E

F

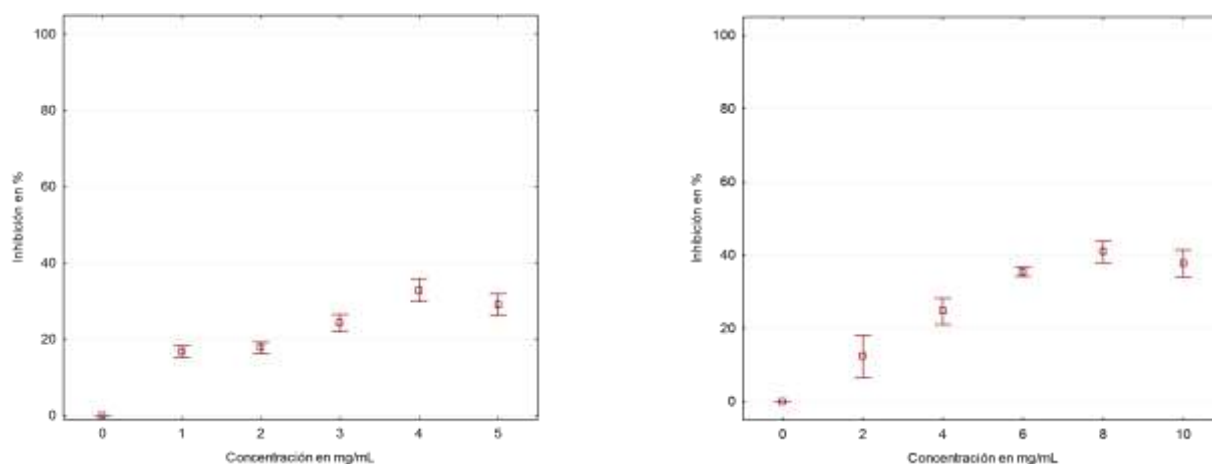


Figura 1. Porcentaje de mortalidad de los extractos de *Piper lapathifolium* (a) y de *P. melastomoides* (b) en *Panagrellus redivivus*, porcentaje de inhibición de *P. lapathifolium* en *Fusarium oxysporum*(c) y *F. solani* (d), (e) porcentaje inhibición de *P. melastomoides* en *F. oxysporum* y (f) en *F. solani*

CONCLUSIONES

El efecto nematicida solo se encontró en el extracto de *Piper melastomoides*, y fue nulo en *P. lapathifolium*. La actividad en *Fusarium oxysporum* fue menor al 50 % tanto para *P. lapathifolium* como para *P. melastomoides*, en cambio se encontró mayor inhibición del crecimiento con el extracto de *P. lapathifolium* en *F. solani*.

LITERATURA CITADA

Agyare, C., Spiegler, V., Sarkodie, H., Asase, A., Liebaw, E. y Hensel, A. 2014. An ethnopharmacological survey and in vitro confirmation of the ethnopharmacological use of medicinal plants as anthelmintic remedies in the Ashanti region, in the central part of Ghana. *Journal of Ethnopharmacology* 158 PART A: 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.10.029>

Atjanasuppat, K., Wongkham, W., Meepowpan, P., Kittakoop, P., Sobhon, P., Bartlett, A. y Whitfield, P. J. 2009. In vitro screening for anthelmintic and antitumour activity of ethnomedicinal plants from Thailand. *Journal of Ethnopharmacology* 123(3): 475–482. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.03.010>

Brenner, S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77(1): 71–94. <https://doi.org/10.1093/genetics/77.1.71>

Carmona-Hernández, Ó., del Socorro Fernández, M., Palmeros-Sánchez, B. y Lozada-García, J. A. 2014. Actividad insecticida de extractos etanólicos foliares de nueve piperáceas (*Piper* spp.) en *Drosophila melanogaster*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 30: 67-73.

- Carmona-Hernández, O., Lozada-García, J. A., Martínez-Hernández, M. J., Fernández, M. S. y Torres-Pelayo, V. R. 2016. *Piper* L. genus potential as natural biocide. *Wulfenia Journal* 23(6): 65-95.
- Domínguez, A. X. 1979. Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa, México, D.F.
- Finney, D. L. 1987. Chapter 18: Assay base don quantal responses. *Statistical Method in Biological Assay* 469-490.
- Juárez-Becerra, G. P., Sosa-Morales, M. E. y López-Malo, A. 2010. Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 4(2): 14-23.
- Jensen, H. R., Scott, I. M., Sims, S., Trudeau, V. L. y Arnason, J. T. 2006. Gene expression profiles of *Drosophila melanogaster* exposed to an insecticidal extract of *Piper nigrum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(4): 1289–1295.
<https://doi.org/10.1021/jf052046n>
- Johnson, S. B., Olsen, N., Rosen, C. y Spooner, D. M. 2010. Commercial potato production in North America. *American Journal of Potato Research* 87 suppl: 1–90.
- Katiki, L. M., Ferreira, J. F. S., Zajac, A. M., Masler, C., Lindsay, D. S., Chagas, A. C. S. y Amarante, A. F. T. 2011. *Caenorhabditis elegans* as a model to screen plant extracts and compounds as natural anthelmintics for veterinary use. *Veterinary Parasitology* 182(2–4): 264–268.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.020>
- Kusuma, S. A. F., Tjitraresmi, A. y Susanti, G. 2017. Antibacterial effect of red *Piper betel* leaf (*Piper crocatum* ruiz & amp; pav.) ethanol extracts to *Lactobacillus acidophilus* and *L. bifidus* growth inhibition. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 10(14): 65.
<https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10s2.19490>
- Lee, S. E., Park, B. S., Kim, M. K., Choi, W. S., Kim, H. T., Cho, K. Y., Lee, S. G. y Lee, H. S. 2001. Fungicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 20(6): 523–528.
[https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00172-1](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00172-1)
- Moreno, M. E., González, S., Acevedo, L., Morales, G., Betancur, M, López, J. J. y Peláez, C. A. 2000. *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae): modelo biológico para la estandarización de extractos naturales con actividad insecticida (El Neem-*Azadirachta indica*- un caso particular). *Revista Entomológica de Colombia* 26 (1-2): 21-55.4
- Neela, F. A., Sonia, I. A. y Shamsi, S. 2014. Antifungal activity of selected medicinal plant extract on *Fusarium oxysporum* Schlecht the causal agent of fusarium wilt disease in tomato. *American Journal of Plant Sciences* 05(18): 2665–2671.
<https://doi.org/10.4236/ajps.2014.518281>

- Ngurah, D. y Oshawa, K. 2007. Fungicidal activity of *Piper betle* extract against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vanilla*. JISSAAS 13(2): 40-46.
- Parmar, V. S., Jain, S. C., Bisht, K. S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Om, D., Tyagi, A. K., Prasad, J., Wengel, T C., Olsen, E. y Per, M. B. Phytochemistry of genus *Piper*. *Phytochemistry* 46(4): 597-673. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00328-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00328-2)
- Pica, G. Y. 2008. Ensayo de toxicidad con el nemátodo *Panagrellus redivivus*. Ensayos Toxicológicos para la Evaluación de Sustancias Químicas en Agua y Suelo 139-154
- Roh, J. Y. y Choi, J. 2008. Ecotoxicological evaluation of chlorpyrifos exposure on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71(2): 483-489. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.11.007>
- Scott, I. M., Jensen, H. R., Philogène, B. J. R. y Arnason, J. T. 2008. A review of *Piper spp.* (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochemistry Reviews* 7(1): 65-75. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9058-5>
- Singha, I. M., Kakoty, Y., Unni, B. G., Kalita, M. C., Das, J., Naglot, A., Wann S. B. y Singh, L. 2011. Control of *Fusarium* wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* using leaf extract of *Piper betle* L.: A preliminary study. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27(11): 2583-2589. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0730-6>
- Soberón, G. V., Rojas, C., Saavedra, J., Kato, M. J. y Delgado, G. E. 2006. Acción biocida de plantas de *Piper tuberculatum* Jacq. sobre *Diatrea saccharalis* (Lepidóptera, Pyralidae). *Revista Peruana de Biología* 13(1): 107-112. <https://doi.org/10.15381/rpb.v13i1.1770>
- Sosa, V. y Gómez-Pompa, A. 1994. Lista florística del estado de Veracruz. *Flora de Veracruz* 82: 1-245.
- Tangarife-Castaño, V., Correa-Royero, J. B., Roa-Linares, V. C., Pino-Benitez, N., Betancur-Galvis, L. A., Durán, D. C., Staschenko, E. E. y Mesa-Arango, A. C. 2014. Anti-dermatophyte, anti-*Fusarium* and cytotoxic activity of essential oils and plant extracts of *Piper* genus. *Journal of Essential Oil Research* 26(3): 221-227. <https://doi.org/10.1080/10412905.2014.882279>
- Varsha, H. y Sonali, S. 2014. Studies on qualitative phytochemical analysis of selected species of *Piper*. *International Journal of Life Sciences Special Issue* A2: 156-158
- Villaseñor, J. L. 2016. Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 87(3): 559-902. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.06.017>
- Wiratno, T. D., Van den Berg, H., Riksen, J. A. G., Rietjens, I. M. C. M., Djiwanti, S. R. y Murk, A. J. 2009. Nematicidal activity of plant extracts against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *The Open Natural Products Journal* 2:77-85. <https://doi.org/10.2174/1874848100902010077>

Copyright (c) 2018 Oscar Camona Hernández, José Armando Lozada García, María del Socorro Fernández, Mauricio Luna Rodríguez, María de Jesús Martínez Hernández y José Antonio Guerrero Analco



Este texto está protegido por una licencia [Creative Commons 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Usted es libre para Compartir —copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato— y Adaptar el documento —remezclar, transformar y crear a partir del material— para cualquier propósito, incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de:

Atribución: Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, proporcionar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que tiene el apoyo del licenciante o lo recibe por el uso que hace de la obra.

[Resumen de licencia - Texto completo de la licencia](#)