







## Inhibición *in vitro* de hongos fitopatógenos utilizando extractos de muérdago mexicano (*Psittacanthus calyculatus*)

### *In vitro* inhibition of phytopathogenic fungi using extracts of Mexican mistletoe (*Psittacanthus calyculatus*)

Luis Ángel Xoca-Orozco<sup>1\*</sup> ,  
 Karina Cortez-Fonseca<sup>1</sup> ,  
 Carlos Luna López<sup>1</sup> ,  
 Gustavo Hernández-Mendoza<sup>1</sup> ,  
 José de Jesús Flores-Sierra<sup>1</sup> ,  
 Martina Alejandra Chacón-López<sup>2</sup> ,  
 Selene Aguilera-Aguirre<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Tecnológico Nacional de México/ITS de Purísima del Rincón. Departamento de Ing. Bioquímica. Blvd. del Valle 2301, Col. Guardarrayas, CP. 36425. Purísima del Rincón. Guanajuato, México.

<sup>2</sup>Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tepic. Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos. Av. Tecnológico 2595, Lagos del Country, CP. 63175. Tepic, Nayarit. México.

<sup>3</sup>Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tepic. Departamento de Química y Bioquímica. Av. Tecnológico 2595, Lagos del Country, CP. 63175. Tepic, Nayarit. México.

\*Autor de correspondencia: [luis.xo@purisima.tecnm.mx](mailto:luis.xo@purisima.tecnm.mx)

#### Artículo científico

Recibido: 03 de agosto 2022

Aceptado: 22 de noviembre 2022

**Como citar:** Xoca-Orozco LA, Cortez-Fonseca K, Luna López C, Hernández-Mendoza G, Flores-Sierra JJ, Chacón-López MA, Aguilera-Aguirre S (2022) Inhibición *in vitro* de hongos fitopatógenos utilizando extractos de muérdago mexicano. (*Psittacanthus calyculatus*) Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 9(3): e3431. DOI: 10.19136/era.a9n3.3431

**RESUMEN.** *Psittacanthus calyculatus* es una planta hemiparásita que afecta diversas especies vegetales de gran importancia para el ecosistema. Existen diversos reportes sobre su capacidad antibacteriana debido a que contiene diversos compuestos con actividad antioxidante y antimicrobiana, sin embargo, sobre su actividad antifúngica es prácticamente nula la información disponible. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue conocer la actividad antifúngica de extractos de muérdago ante la inhibición de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium* sp. y *Curvularia* sp. Para ello, se utilizó hoja y flor de muérdago obtenidos de dos hospederos: *Prosopis laevigata* y *Eysenhardtia polystachya*. Las muestras se lavaron, deshidrataron y molieron. Posteriormente se realizó una extracción sólido-líquido utilizando el metanol-acetona-agua. Se cuantificó el contenido de fenoles y flavonoides, además el perfil fitoquímico cualitativo. La evaluación de la actividad antifúngica se llevó a cabo con la técnica de dilución en placa con medio PDA. Se determinaron los parámetros de inhibición del crecimiento micelial, esporulación, germinación y se determinó el efecto fungicida o fungistático. Los resultados muestran inhibición mayor al 70% con extractos de hoja y flor, siendo *Curvularia* sp. el más susceptible con un 98% de inhibición. También hubo reducción de la esporulación y germinación de los fitopatógenos evaluados. Se determinó que la inhibición corresponde a un efecto fungistático. Los resultados revelan alta capacidad de inhibición *in vitro* de extractos de muérdago contra fitopatógenos de gran importancia para la agricultura.

**Palabras clave:** Antifúngico, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia*, fungistático, *Fusarium*.

**ABSTRACT.** *Psittacanthus calyculatus* is a hemiparasitic plant that affects various plant species of great importance to the ecosystem. Contains various compounds with antioxidant and antimicrobial activity. There are various reports on its antibacterial capacity; however, there is no information available on its antifungal activity. That is why the aim of this work was to show the antifungal activity of mistletoe extracts against the inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium* sp. and *Curvularia* sp. For this, both mistletoe leaves and flowers obtained from two hosts were used: *Prosopis laevigata* and *Eysenhardtia polystachya*. The samples were washed, dehydrated and ground. Subsequently, a solid-liquid extraction was carried out using methanol-acetone-water. The content of phenols and flavonoids was quantified, as well as the phytochemical profile qualitatively. The evaluation of the antifungal activity was carried out with the plate dilution technique with PDA medium. The parameters of inhibition of mycelial growth, sporulation, germination was evaluated and the fungicidal or fungistatic effect was determined. The results showed an inhibition greater than 70% using both leaf and flower extracts, with *Curvularia* sp. being the most susceptible with 98% inhibition. There was also a reduction in sporulation and germination of the evaluated phytopathogens. It was determined that the inhibition corresponds to a fungistatic effect. The results reveal a high *in vitro* inhibition capacity of mistletoe extracts against phytopathogens of great importance for agriculture.

**Key words:** Antifungal, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia*, fungistatic, *Fusarium*

## INTRODUCCIÓN

El muérdago mexicano (*Psittacanthus calyculatus*) es una planta hemiparásita que crece y se desarrolla sobre varias especies de árboles frutales y forestales en el centro y sur de México (Azpeitia y Lara 2006). Por el impacto que ocasiona el muérdago a diversas especies forestales y frutales, es considerado como plaga, ya que parasita algunas especies vegetales como encino (*Quercus deserticola*) (Cuevas-Reyes et al. 2017), huizache (*Acacia schaffneri*) (Queijeiro-Bolaños et al. 2020), mezquite (*Prosopis laevigata*) (Quintana-Rodríguez et al. 2018), palo dulce (*Eysenhardtia polystachya*) (Infante et al. 2016) entre otros. Se han identificado ácidos fenólicos y flavonoides en extractos metanólicos de *P. calyculatus* (Moustapha et al. 2011). La mayoría de estos compuestos presentan propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, anticancerígena, quelante de metales y antioxidante (Kabera et al. 2014). Existen reportes sobre la actividad antimicrobiana de extractos de *P. calyculatus*, principalmente en bacterias patógenas al humano como *Acinetobacter lwoffii*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus* y *Bacillus cereus* (Frei et al. 1998, Jacobo-Salcedo et al. 2011, Ortega-Cervantes et al. 2016).

En lo referente a la actividad antifúngica, solo se encuentran reportes que evalúan el efecto de extractos etanólicos de *P. calyculatus* para la inhibición de hongos patógenos a humanos como *Penicillium oxalicum* (Frei et al. 1998), *Trichosporon belgeii* y en levaduras *Candida albicans* y *Candida tropicalis* (Jacobo-Salcedo et al. 2011), pero los extractos de muérdago evaluados no presentaron actividad inhibitoria. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de extractos de muérdago ante la inhibición de *C. gloeosporioides*, *Fusarium* sp. y *Curvularia* sp.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

Hojas y flores de muérdago (*P. calyculatus*) se recolectaron en el Área Natural Protegida del

Cerro del Palenque de Purísima del Rincón Guanajuato, México. Las recolecciones de muérdago parasitando dos hospederos identificados mediante sus características morfológicas: mezquite (*P. laevigata*) (Rodríguez-Sauceda et al. 2014) y palo dulce (*E. polystachya*) (González y Camacho 2000). Las cuales luego se transportaron al laboratorio a 4 °C.

El fitopatógeno *C. gloeosporioides* se aisló de trabajos realizados por Xoca-Orozco et al. (2017), mientras que *Fusarium* sp. y *Curvularia* sp. se aislaron de muestras de fruto y hoja de vid, respectivamente, de un viñedo ubicado en Purísima del Rincón Guanajuato, México. La identificación se basó en el análisis de sus características macroscópicas y microscópicas de la colonia y se determinó el género con la ayuda de claves dicotómicas (Barnett y Hunter 1998).

### Obtención de extractos

Para obtener los extractos de hojas (EH) y flores (EF) de muérdago de mezquite (MZ) y palo dulce (PD), de manera independiente, se secaron a temperatura de 60 °C hasta peso constante en un horno Ecoshel HV-20. Para luego triturarlas en una licuadora industrial hasta tener un polvo fino que pasó por un tamiz 0.25 mm para tener una mayor superficie de contacto. Las muestras trituradas se mantuvieron en congelación a -20 °C hasta su uso.

Los extractos de muérdago de hojas y flores se obtuvieron mediante la metodología propuesta por Saura-Calixto et al. (2007) la cual se describe a continuación: se agregó metanol acidificado (8 mL L<sup>-1</sup> HCL) - agua (50-50 v/v) en una proporción de 50 mL g<sup>-1</sup> de muestra, durante 60 min a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 3000 g (15 min, 25 °C). Posteriormente se separaron las fases, conservando el sobrenadante a 4 °C. El precipitado se lavó con acetona-agua (70:30 v/v) (50 mL g<sup>-1</sup> de muestra) durante 60 min y se centrifugó en las mismas condiciones, se combinaron los sobrenadantes obtenidos de cada lavado. A esta mezcla de sobrenadantes se eliminaron los disolventes en atmósfera reducida durante 120 min a 65 °C en un rotavapor DLAB RE100-Pro. Los extractos se almacenaron a 4 °C, en la oscuridad. Se realizó el mismo procedimiento, uti-

lizando las mismas mezclas de solventes, pero sin la muestra de muérdago (SC) para utilizarlo como testigo en la evaluación *in vitro*.

### Perfil fitoquímico

El perfil fitoquímico se determinó de manera cuantitativa para fenoles totales (Xoca-Orozco *et al.* 2018) y flavonoides de acuerdo con la metodología propuesta por Gajula *et al.* (2009), para ello se utilizó una curva de calibración de ácido gálico (de 0 a 0.25 mg de ácido gálico mL<sup>-1</sup>) para fenoles totales y catequina (de 0 a 0.1 mg catequina mL<sup>-1</sup>). Además, se determinó el perfil fitoquímico de manera cualitativa evaluando la presencia de los siguientes compuestos: antocianinas, glucósidos cianogénicos, esteroides, cumarinas, alcaloides, quinonas y antraquinonas, grupos funcionales, azúcares reductores, compuestos grasos y anillos aromáticos mediante los métodos especificados en la Tabla 1. Se determinó la concentración del extracto en base seca por diferencia de peso.

### Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro*

Por cada uno de los diferentes extractos (EH-MZ, EH-PD, EF-MZ y EF-PD) se utilizaron tres concentraciones: 10 mL de agar papa dextrosa (PDA) + 5 mL de extracto (C1 = 0.33 mL extracto mL<sup>-1</sup> medio), 11.5 mL PDA + 3.5 mL extracto (C2 = 0.23 mL extracto mL<sup>-1</sup> medio) y 13 mL PDA + 2 mL extracto (C3 = 0.13 mL extracto mL<sup>-1</sup> medio). Los extractos fueron mezclados con el medio PDA (~40 °C) en cajas petri de 90 mm de diámetro. Después de que el agar se solidificó, se inocularon con discos de 5 mm de diámetro del medio PDA conteniendo crecimiento del fitopatógeno de una colonia con 8 días de incubación, en medio PDA, a 26 °C. Todos los tratamientos se incubaron a 26 ± 2 °C, hasta que las cajas de petri testigo (sin adición de extracto) ocuparan el 100% de crecimiento. Se utilizó un testigo positivo (C) el cual consistió en el fitopatógeno solo en PDA y otro testigo negativo (EC) adicionando 10 mL PDA + 5 mL de SC. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Las variables medidas fueron: crecimiento micelial, porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (%ICM), esporulación final, germinación y la

determinación del efecto fungicida o fungistático, de acuerdo a la metodología propuesta por Xoca-Orozco *et al.* (2019).

### Crecimiento micelial y %ICM

A cada una de las cajas de petri conteniendo los tratamientos y testigos se les realizó la medición del diámetro del crecimiento con ayuda de un vernier, la medición se realizó diario hasta que el testigo EC ocupara el 100% del crecimiento en la cada de petri. Para calcular el %ICM se utilizó la siguiente relación: (Diámetro colonia testigo EC - diámetro colonia tratamiento) / (Diámetro colonia testigo EC - diámetro sacabocados de inoculación) \* 100.

### Esporulación final

Cuando el testigo EC alcanzó el 100% de crecimiento para cada caja de petri (incluyendo los testigos) se obtuvo una suspensión de esporas, adicionando 10 mL de agua destilada estéril y raspando la superficie con una varilla de vidrio estéril, estas suspensiones se filtraron a través de gasas estériles, depositándose en tubos de ensaye estériles. Para el conteo de esporas se tomaron 50 µL de las distintas soluciones colocándolas sobre la cámara de Neubauer, visualizándose a través de un microscopio utilizando el objetivo 40X. Una vez obteniendo el conteo de esporas se transformaron los datos a logaritmos (base 10) y se calculó la reducción de esporas respecto al testigo EG.

### Porcentaje de germinación

A partir de cajas petri conteniendo el fitopatógeno con 8 días de crecimiento, en medio PDA, se realizó una suspensión de esporas. Se tomaron alícuotas para tener una concentración de 1 x 10<sup>6</sup> esporas mL<sup>-1</sup> y se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL conteniendo las mismas concentraciones de extractos y medio papa-dextrosa líquido. Los tubos se incubaron en agitación constante a 26 ± 2 °C, hasta que el testigo EC tuviera un 100% de germinación. Se consideró una espora germinada cuando el tubo germinativo fuera igual al tamaño de la espora. Posteriormente se realizó un conteo de esporas germinadas y no germinadas con ayuda de una cámara

**Tabla 1.** Perfil fitoquímico cuantitativo y cualitativo de los extractos de muérdago de hoja y flor.

Extracto	<sup>1</sup> Concentración (mg mL <sup>-1</sup> )				Cuantificación		
	Total	C1	C2	C3	<sup>2</sup> Fenoles totales (mg ácido gálico /mL extracto)	<sup>2</sup> Flavonoides (mg catequina /mL extracto)	
EH-PD	14.7	4.9	3.4	0.7	15.6 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.28 ± 0.1 <sup>a</sup>	
EH-MZ	14.9	5.0	3.5	0.7	20.9 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.25 ± 0.1 <sup>b</sup>	
EF-PD	14.4	4.8	3.4	0.6	13.3 ± 0.2 <sup>c</sup>	0.72 ± 0.3 <sup>c</sup>	
EF-MZ	15.1	5.0	3.5	0.7	15.9 ± 0.7 <sup>d</sup>	0.46 ± 0.1 <sup>d</sup>	
Objetivo de identificación					Perfil cualitativo		
					Método		
Antocianidinas (Martínez <i>et al.</i> 2008)					Prueba de Shinoda	-	+
Glucósidos cianogénicos (Oliveros-Bastidas <i>et al.</i> 2009)					Prueba con picrato de sodio	+	+
Esteroles (Martínez <i>et al.</i> 2008)					Método Liebermann-Burchard	+	-
Cumarinas (Chaman-Medina <i>et al.</i> 2014)					Prueba con NaOH	+	+
					Dragendorff	+	+
					Wagner	+	+
Alcaloides (Dominguez 1979)					Mayer	+	-
					Erdman	+	-
					Marquis	+	+
Quinonas y antraquinonas (Thomson 1997)					Prueba con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-
Grupos funcionales (Guzmán 2010)					Prueba carbonato de sodio	+	+
Azúcares reductores (Manas <i>et al.</i> 2010)					Prueba de Fehling	+	+
Compuestos grasos (Guzmán 2010)					Prueba con sudan III	+	+
Anillos aromáticos (Guzmán 2010)					Prueba de ácido sulfúrico	+	-

<sup>1</sup>Concentración total = mg extracto /mL volumen final de extracción, Tratamientos C1, C2 y C3 = mg extracto / mL de medio PDA.

<sup>2</sup>Valores con letras iguales no presentan diferencia significativa entre los extractos ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ )

de Neubauer y determinando el porcentaje de germinación.

### Determinación del efecto fungicida o fungistático

Transcurrido el periodo de incubación del ensayo del porcentaje de germinación, los tubos eppendorf se centrifugaron a 2000 g por 5 minutos a 26 °C, se retiró el sobrenadante y se le adicionó 1 mL de agua destilada estéril, este lavado se repitió 3 veces. Finalmente se tomaron 200  $\mu$ L y se colocaron en cajas con medio PDA para registrar el crecimiento micelial. Las cajas que presentaron crecimiento igual que el control se determinaron que tienen efecto fungistático y aquellos que no presentaron crecimiento el efecto fungicida.

### Análisis estadístico

Para determinar si los datos obtenidos cumplen con una distribución de normalidad, se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk ( $p < 0.05$ ) (Tabla 2). Las diferencias entre medias de los datos no paramétricos fueron analizadas mediante la prueba de Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ), mientras que para los datos que cumplen con el supuesto de normalidad se

realizó un análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones de medias por una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ), empleando el paquete estadístico Rstudio.

## RESULTADOS

### Perfil fitoquímico

El perfil fitoquímico cualitativo y cuantitativo mostro que el contenido de fenoles totales (Tabla 1), se presenta en mayor cantidad en el extracto EH-MZ mientras que los flavonoides tuvieron una mayor concentración en EF-PD. El perfil fitoquímico mostró que las antocianidinas fueron positivas en EF-MZ, mientras que esteroles, anillos aromáticos y alcaloides (determinados por los métodos de Mayer y Erdman) solo en EH-MZ, siendo este extracto el de mayor cantidad de positivos en el análisis cualitativo. Para el resto de los componentes no se encontraron diferencias.

### Actividad antifúngica *in vitro*

La cinética de crecimiento *in vitro* muestra que no hubo afecto significativo entre los testigos C y EC

**Tabla 2.** Prueba de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de los datos.

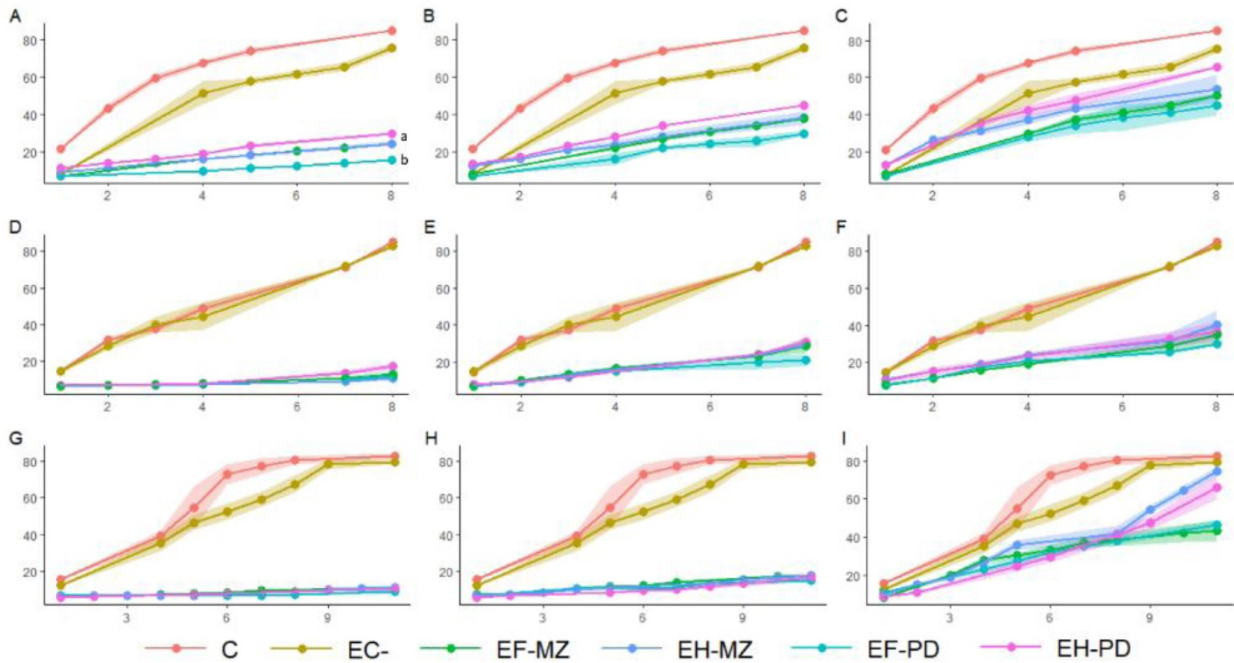
Fitopatógeno	Variable	Estadístico	Valor_p	Normalidad
Crecimiento Micelial				
<i>C. gloeosporioides</i>	T1	0.965	0.042	NO
	T2	0.981	0.337	SI
	T3	0.961	0.025	NO
	C	0.902	0.063	SI
	EC	0.775	0.001	NO
<i>Curvularia</i> sp.	T1	0.784	<0.001	NO
	T2	0.936	0.001	NO
	T3	0.955	0.011	NO
	C	0.912	0.093	SI
	EC	0.911	0.088	SI
<i>Fusarium</i> sp.	T1	0.917	0.017	NO
	T2	0.953	0.170	SI
	T3	0.957	0.220	SI
	C	0.864	0.166	SI
	EC	0.973	0.918	SI
%ICM				
<i>C. gloeosporioides</i>	T1	0.888	0.110	SI
	T2	0.944	0.549	SI
	T3	0.948	0.602	SI
<i>Curvularia</i> sp.	T1	0.919	0.275	SI
	T2	0.935	0.436	SI
	T3	0.908	0.203	SI
<i>Fusarium</i> sp.	T1	0.930	0.381	SI
	T2	0.959	0.772	SI
	T3	0.893	0.129	SI
Esporulación final				
<i>C. gloeosporioides</i>	T1	0.887	0.107	SI
	T2	0.924	0.318	SI
	T3	0.916	0.253	SI
<i>Curvularia</i> sp.	T1	0.736	0.002	NO
	T2	0.935	0.437	SI
	T3	0.808	0.012	NO
<i>Fusarium</i> sp.	T1	0.973	0.942	SI
	T2	0.978	0.975	SI
	T3	0.850	0.037	NO

(Figura 1), así mismo la C1, en todos los extractos presentaron mayor actividad para inhibir el desarrollo *in vitro* de los tres fitopatógenos evaluados. El mayor %ICM se presentó para EF-PD en *C. gloeosporioides* y *Fusarium* sp., y en EH-MZ para *Curvularia* sp., en los tres casos en los tratamientos de mayor concentración (Figura 2). *Curvularia* sp., fue el que presentó mayor sensibilidad a bajas concentraciones presentando un %ICM mayor al 50% con respecto a los testigos.

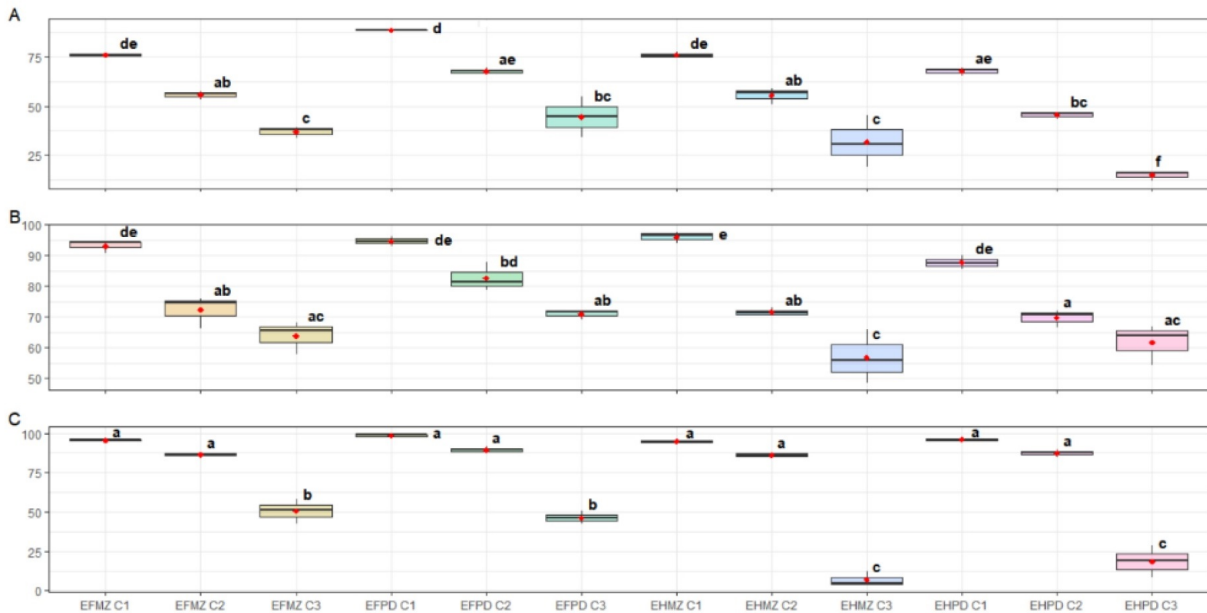
En cuanto a la esporulación final, *C. gloeosporioides* presentó una reducción de 1.2 logaritmos en C1-EF-MZ, siendo esta la menor reducción de

logaritmos alcanzada por los extractos. Mientras que, para *Fusarium* sp., se logró la reducción de 2.4 logaritmos con C1-EH-PD y finalmente *Curvularia* sp., presentó una reducción de más de 3 logaritmos utilizando extractos provenientes de flores de muérdago (Figura 3).

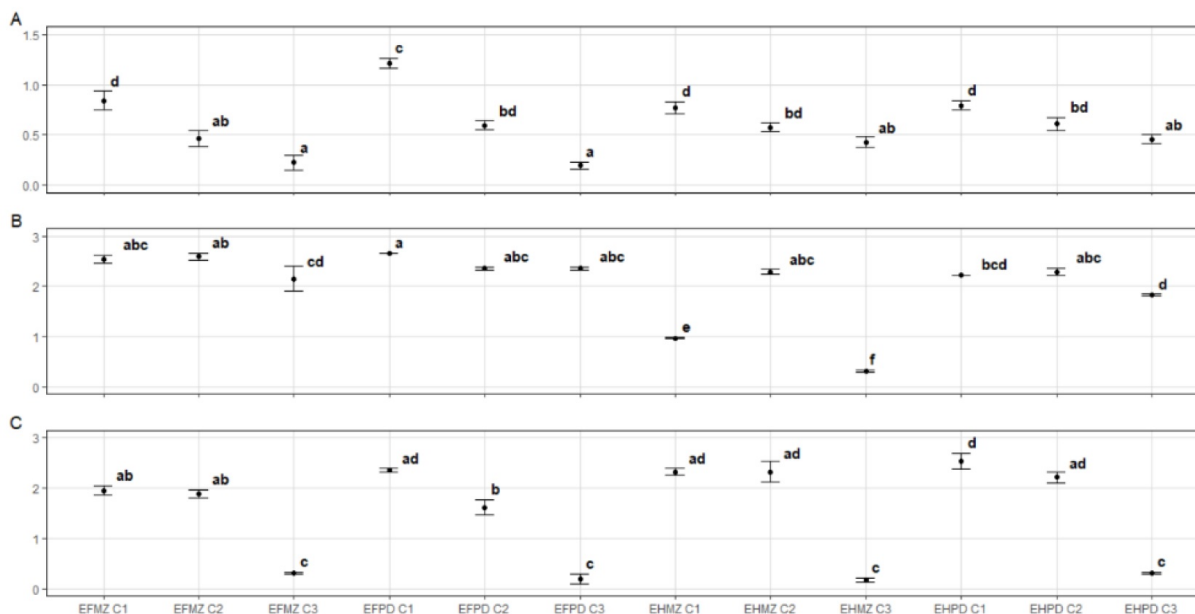
En cuanto a la germinación de los conidios por tratamiento, *C. gloeosporioides* presentó un máximo de 7% de germinación ante EF-M, *Curvularia* sp., 16% ante EF-PD mientras que, en *Fusarium* sp., no presentó germinación en ningún tratamiento (Tabla 3). Una vez eliminado los extractos y volviendo a poner las esporas en medio PDA, el crecimiento ra-



**Figura 1.** Cinética del Crecimiento micelial *in vitro* de *C. gloeosporioides* (A, B, C), *Curvularia* sp., (D, E, F) y *Fusarium* sp., (G, H, I) ante las diferentes concentraciones y extractos de muérdago. Gráficos izquierda concentración C1 (4.9 mg mL<sup>-1</sup>), centro C2 (3.4 mg mL<sup>-1</sup>) y derecha C3 (0.7 mg mL<sup>-1</sup>). Eje y = crecimiento en mm; eje x = días de incubación.



**Figura 2.** Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de las diferentes concentraciones de extractos utilizados. A = *C. gloeosporioides*, B = *Curvularia* sp. y C = *Fusarium* sp. Letras iguales no presentan diferencia significativa entre los diferentes tratamientos evaluados (Tukey,  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ).



**Figura 3.** Reducción de logaritmos respecto al control (EC-) (Eje X) de los diferentes tratamientos para (A) *C. gloeosporioides*, (B) *Curvularia sp.* y (C) *Fusarium sp.* Letras minúsculas iguales no presentan diferencia significativa entre los diferentes extractos para cada concentración evaluada ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ).

**Tabla 3.** Porcentaje de germinación de los diferentes extractos y concentraciones ante los diferentes fitopatógenos.

Concentración	Extracto	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Curvularia sp.</i>	<i>Fusarium sp.</i>
C1	EH-MZ	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	EH-PD	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	EF-PD	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.7	0.0 ± 0.0
C2	EH-MZ	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	EH-PD	0.0 ± 0.0	3.0 ± 0.7	0.0 ± 0.0
	EF-PD	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
C3	EH-MZ	7.3 ± 2.1	1.5 ± 1.1	0.0 ± 0.0
	EH-PD	0.0 ± 0.0	11.9 ± 3.5	0.0 ± 0.0
	EF-PD	0.0 ± 0.0	10.0 ± 4.1	0.0 ± 0.0
	EF-MZ	3.0 ± 1.0	16.3 ± 2.7	0.0 ± 0.0
	EF-MZ	5.3 ± 1.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

dial tuvo la misma cinética que el control por lo que se determinó que el efecto de inhibición es un efecto fungistático. Considerando los resultados, sin tomar en cuenta las características de susceptibilidad de cada fitopatógeno, el análisis estadístico muestra que no existe diferencia significativa (Tukey,  $p < 0.05$ ,  $n = 9$ ), en las diferentes concentraciones de los extractos evaluados (EHMZ, EHPD, EFMZ y EFPD) en la evaluación del %ICM (Tabla 4).

## DISCUSIÓN

En extractos metanólicos de *P. calyculatus* se ha identificado la presencia de cinco ácidos fenólicos (gálico, protocatechico, cafeico, p-cumarico y rosmarínico) y 10 flavonoides (hesperidina, rutina, miricetina, luteolina, (+)-catequina, quercetina, apigenina, naringenina, hesperetina y kaempferol), un alcaloide N-metil-trans-4-hidroxi-L-prolina y dos flavonol glucósidos (isorhamnetina 3-O-B-D-xilopiranosil (1→6)-B-D-glucopiranosida y quercetina-3-O-B-D-xilopiranosil (1→6)-B-D-glucopiranosido)

**Tabla 4.** Comparación del %ICM, entre los diferentes extractos a las diferentes concentraciones.

Concentración	Extracto	<sup>1</sup> %ICM	Comparación / <sup>2</sup> valor P
C1	EFMZ	88.25 ± 9.32	EFPD-EFMZ / 0.60 EHMZ-EFMZ / 0.99
	EFPD	93.87 ± 4.44	EHPD-EFMZ / 0.76
	EHMZ	88.94 ± 9.89	EHMZ-EFPD / 0.69
	EHPD	83.84 ± 12.79	EHPD-EFPD / 0.14 EHPD-EHMZ / 0.67
C2	EHMZ	59.63 ± 6.55	EFPD-EFMZ / 0.58 EHMZ-EFMZ / 0.99
	EFPD	66.82 ± 16.93	EHPD-EFMZ / 0.93
	EFMZ	75.86 ± 8.09	EHMZ-EFPD / 0.54
	EHPD	87.61 ± 2.32	EHPD-EFPD / 0.26 EHPD-EHMZ / 0.95
C3	EHPD	23.91 ± 18.46	EFPD-EFMZ / 0.98 EHMZ-EFMZ / 0.17
	EHMZ	37.80 ± 10.19	EHPD-EFMZ / 0.17
	EFPD	49.89 ± 26.55	EHMZ-EFPD / 0.08
	EFMZ	56.34 ± 8.24	EHPD-EFPD / 0.08 EHPD-EHMZ / 0.99

<sup>1</sup>Promedio ± desviación estándar (n = 9), <sup>2</sup>Valor estadístico P (p < 0.05, TUKEY, n = 9)

(Moustapha *et al.* 2011). En flores se ha determinado la presencia de sucrosa, glucosa y fructosa (presentes en el néctar), aminoácidos (alanina, glicina, leucina, isoleucina, prolina, serina, treonina, oxoprolina y ácido aspártico), compuestos volátiles ( $\beta$ -Ocimene, 2,4-di-tert-butilfenol, geranyl nitrilo, nonanol y  $\beta$ -farnesene), luteína, licopeno y  $\beta$ -caroteno (Quintana-Rodríguez *et al.* 2018). La presencia de algunos de estos compuestos se ve reflejada de manera cuantitativa (fenoles y flavonoides) y cualitativa (antocianinas, glucósidos cianogénicos, esteroides, cumarinas y alcaloides), en los extractos obtenidos tanto en hoja como flor del muérdago de los dos tipos de hospedero (Tabla 2).

Contrario a los resultados encontrados, se ha reportado que los extractos de *P. calyculatus*, ante *P. oxalicum* (Frei *et al.* 1998), *T. belgeii* y en levaduras *C. albicans* y *C. tropicalis*, no presentan actividad inhibitoria (Jacobo-Salcedo *et al.* 2011). Pero estos reportes están basados en extractos etanólicos y evaluados contra otras especies fúngicas. Se ha reportado la presencia de compuestos como alcaloides, antraquinonas, esteroides, leucoantocianinas, saponinas, triterpenos en extractos etanólicos (Sánchez-Arreola *et al.* 2004), sin em-

bargo, los reportes no especifican a detalle los compuestos para comparar con los reportes de extractos metanólicos como el realizado por Moustapha *et al.* (2011). En este sentido, existen evidencias que muestran diferencias entre extractos, obtenidos con metanol y etanol, de algunas actividades biológicas como la antioxidante, el contenido de fenoles y flavonoides en diferentes especies vegetales (Lim *et al.* 2019, Nobossé *et al.* 2018, Xu *et al.* 2018). Considerando los reportes del contenido diferentes compuestos, utilizando solventes como el metanol (Moustapha *et al.* 2011, Quintana-Rodríguez *et al.* 2018), es posible que la metodología de extracción metanol-acetona-agua permitiera extraer compuestos con mayor actividad antifúngica. Esto se ve reflejado en la cinética de crecimiento micelial *in vitro* la cual muestra un menor crecimiento utilizando los tratamientos de mayor concentración (C1 y C2) (Figura 1), siendo *Curvularia* sp. el fitopatógeno más susceptible a concentraciones bajas (Figura 2). El efecto antifúngico de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de muérdago mexicano se asocia principalmente con la ruptura de las membranas citoplasmáticas (Rivero *et al.* 2020) y a la afectación de la función de las membranas de lipopro-



teínas celulares alterando la permeabilidad de la membrana (Pizzolitto *et al.* 2015). Mientras que la acción antifúngica de los flavonoides es por la inhibición diversos procesos biológicos como la formación de la pared celular, la división celular, disfunción mitocondrial, bombas de flujo, DNA/RNA y síntesis de proteínas (Aboody y Mickymaray 2020). Aunado a los fenoles y flavonoides, se suma la actividad antifúngica de las cumarinas que es mediante la interrupción de la síntesis de citocromo, lo que conduce a la inhibición de la respiración y reducción de la biosíntesis de ergosterol (componente principal de la membrana) (Thati *et al.* 2007), la fragmentación de ADN y la condensación nuclear relacionados con la apoptosis (Jia *et al.* 2019).

En este sentido, a pesar de que no se han encontrado reportes sobre la inhibición de hongos fitopatógenos con extractos de muérdago, existen datos sobre la actividad antifúngica de diferentes tipos de extractos vegetales para inhibir fitopatógenos, como los reportados por Velázquez *et al.* (2021) que utilizaron extractos etanólicos de *Pimenta dioica* para inhibir al 100% diferentes cepas de *Colletotrichum*. Al respecto, Guerra *et al.* (2020) reportaron una ICM de 54.9% de *Fusarium oxysporum* aplicando extractos de *Stevia rebaudiana*. Mientras que para *Curvularia lunata* se reporta una inhibición del 69% utilizando extractos acetónicos de hojas de *Lawsonia inermis* (Barupal *et al.* 2019). Los resultados indican una afectación en el proceso de esporulación (Figura 3) y germinación (Tabla 3), procesos claves para el desarrollo de los fitopatógenos, debido a que son estructuras esenciales para su reproducción. La inactivación del proceso de germinación constituye uno de los principales mecanismos de acción del proceso de inhibición de los extractos de muérdago, ya que se obtuvo prácticamente una inhibición al 100% con la concentración más alta

evaluada (C1: 4.9 mg mL<sup>-1</sup>), sin embargo, retirado el extracto el proceso las esporas que no sufrieron daño en su estructura pudieron seguir con el proceso de desarrollo. Esto indica que el efecto de inhibición de los extractos de muérdago se debe a un efecto fungistático. Debido a que los diferentes extractos, a una misma concentración, sin hacer distinción entre el género del hongo fitopatógeno, no presentaron diferencia significativa (Tukey,  $p < 0.05$ ,  $n = 9$ ) (Tabla 4), por lo que se puede establecer que el efecto de %ICM es independiente al hospedero en el que se encuentre el muérdago (mezquite o palo dulce), así como a la estructura de la que sea obtenido el extracto (hoja o flor).

## CONCLUSIONES

Este es el primer reporte sobre la inhibición de fitopatógenos de importancia para la agricultura con extractos de muérdago mexicano. Los resultados muestran alta actividad antifúngica de extractos del muérdago mexicano, de hoja y flor, para inhibir el crecimiento micelial, esporulación y germinación de tres fitopatógenos de importancia económica para la agricultura. Así mismo, se muestra una aplicación potencial del muérdago mexicano y proporciona una estrategia para establecer a futuro medidas para un control sostenible de esta especie parásita.

## AGRADECIMIENTOS

Al TecNM-ITSPR por los recursos económicos otorgados para el financiamiento de los proyectos TecNM-10408.21-PD (2021) y TecNM-13689.22-PD (2022).

## LITERATURA CITADA

- Aboody M, Mickymaray S (2020) Anti-fungal efficacy and mechanisms of flavonoids. *Antibiotics* 9(2): 1-45. DOI: 10.3390/antibiotics9020045.
- Azpeitia F, Lara C (2006) Reproductive biology and pollination of the parasitic plant *Psittacanthus calyculatus* (Loranthaceae) in central Mexico. *Journal of the Torrey Botanical Society* 133: 429-438.

- Barnett HL, Hunter BB (1998) Illustrated genera of imperfect fungi. 4a Edición. APS Press. St. Paul. 254p.
- Barupal T, Meena M, Sharma K (2019) Inhibitory effects of leaf extract of *Lawsonia inermis* on *Curvularia lunata* and characterization of novel inhibitory compounds by GC - MS analysis. Biotechnology Reports 23: 1-15. DOI: 10.1016/j.btre.2019.e00335.
- Chaman-Medina M, Morales MM, Rodríguez EF, Prentice MY (2014) Detección de coumarinas en *Asparagus officinalis* L. (Liliaceae). Sagasteguiana 2: 135-138.
- Cuevas-Reyes P, Pérez-López G, Maldonado-López Y, González-Rodríguez A (2017) Effects of herbivory and mistletoe infection by *Psittacanthus calyculatus* on nutritional quality and chemical defense of *Quercus deserticola* along mexican forest fragments. Plant Ecology 218: 687-697.
- Dominguez X (1979) Métodos de investigación fitoquímica. 1ra ed. Limusa. México. 98p.
- Frei B, Heinrich M, Bork PM, Herrmann D, Jaki B, Kato T, Kuhnt M, Schmitt J, Schühly W, Volken C, Sticher O (1998) Multiple screening of medicinal plants from Oaxaca, Mexico: ethnobotany and bioassays as a basis for phytochemical investigation. Phytomedicine 5: 177-186.
- Gajula D, Verghese M, Boateng J, Walker LT, Shackelford L, Mentreddy SR, Cedric S (2009) Determination of total phenolics, flavonoids and antioxidant and chemopreventive potential of basil (*Ocimum basilicum* L. and *Ocimum tenuiflorum* L.). International Journal of Cancer Research 5: 130-143.
- González KV, Camacho MF (2000) Test on growing media for *Eysenhardtia polystachya*, a promising species for planting on degraded areas of Mexico. Seed Science and Technology 28: 271-275.
- Guerra P, Guerra D, Zavaleta E, Aranda S, Nava C, Rojas R (2020) Extracts of *Stevia rebaudiana* against *Fusarium oxysporum* associated with tomato cultivation. Scientia Horticulturae 259: 1-6. DOI: 10.1016/j.scienta.2019.108683.
- Guzmán D (2010) Guía de prácticas de Química Forestal. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Ciencias Forestales. Dpto. Industrias Forestales. La Molina, Perú. 54p.
- Infante SD, Lara C, Arizmendi M, Eguiarte LE, Ornelas JF (2016) Reproductive ecology and isolation of *Psittacanthus calyculatus* and *P. auriculatus* mistletoes (Loranthaceae). PeerJ 2016: 1-29. DOI: 10.7717/peerj.2491.
- Jacobo-Salcedo MDR, Alonso-Castro AJ, Salazar-Olivo LA, Carranza-Alvarez C, González-Espíndola LA, Domínguez F, Maciel-Torres SP, García-Lujan C, González-Martínez MDR, Gómez-Sánchez M, Estrada-Castillón E, Zapata-Bustos R, Medellín-Milán P, García-Carrancá A (2011) Antimicrobial and cytotoxic effects of mexican medicinal plants. Natural Product Communications 6: 1925-1928
- Jia C, Zhang J, Yu L, Wang C, Yang Y, Rong X, Xu K and Chu M (2019) Antifungal Activity of Coumarin Against *Candida albicans* Is Related to Apoptosis. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 8: 445. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00445.
- Kabera JN, Semana E, Mussa AR, He X (2014) Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. Journal of Pharmacy and Pharmacology 2: 377-392.
- Lim S, Choi A, Kwon M, Joung E, Shin T, Lee S, Kim N, Kim H (2019) Evaluation of antioxidant activities of various solvent extract from *Sargassum serratifolium* and its major antioxidant components. Food Chemistry 278: 178-184.
- Manas B, Rajesh Y, Kumar VR, Praveen B, Mangamma K (2010) Extraction, phytochemical screening and *in-vitro* evaluation of anti-oxidant properties of *Commicarpus chinesis* (aqueous leaf extract). International Journal of Pharma and Bio Sciences 1: 537-547.

- Martínez A, Valencia GA, Jimenez N, Mesa M, Galeano E (2008) Manual de prácticas de laboratorio de farmacología y fitoquímica. Universidad de Antioquia Facultad de Química Farmacéutica Departamento de Farmacia, Colombia. 96p.
- Moustapha B, Marina GAD, Raúl FO, Raquel CM, Mahinda M (2011) Chemical constituents of the mexican mistletoe (*Psittacanthus calyculatus*). *Molecules* 16: 9397-9403.
- Nobossé P, Fombang EN, Mbofung CMF (2018) Effects of age and extraction solvent on phytochemical content and antioxidant activity of fresh *Moringa oleifera* L., leaves. *Food Science & Nutrition* 6: 2188-2198.
- Oliveros-Bastidas ADJ, Carrera C, Marín D (2009) Estudio por espectrofotometría UV-VIS de la reacción entre los iones cianuro y picrato. Un ejemplo práctico de aplicaciones analíticas y estudios cinéticos. *Revista Colombiana de Química* 38: 61-82.
- Ortega-Cervantes JM, López-Ramírez V, Adame-Alvarez RM, Quintana-Rodríguez E (2016) Actividad antimicrobiana de extractos de hoja de muérdago *Psittacanthus calyculatus*. *Jóvenes en la Ciencia* 1: 25-29.
- Pizzolitto RP, Barberis CL, Dambolena JS, Herrera JM, Zunino MP, Magnoli CE, Rubinstein HR, Zygodlo JA, Dalcero AM (2015) Inhibitory effect of natural phenolic compounds on *Aspergillus parasiticus* growth. *Journal of Chemistry* 2015: Article ID 547925. DOI: 10.1155/2015/547925.
- Queijeiro-Bolaños ME, Malda-Barrera GX, Carrillo-Angeles IG, Suzán-Azpiri H (2020) Contrasting gas exchange effects on the interactions of two mistletoe species and their host *Acacia schaffneri*. *Journal of Arid Environments* 173: 104041. DOI: 10.1016/j.jaridenv.2019.104041.
- Quintana-Rodríguez E, Ramírez-Rodríguez AG, Ramírez-Chávez E, Molina-torres J, Camacho-Coronel X, Carter C, Quintana-Rodríguez E (2018) Biochemical traits in the flower lifetime of a mexican mistletoe parasitizing mesquite biomass. *Frontiers in Plant Science* 9: 1-13. DOI: 10.3389/fpls.2018.01031.
- Rivero CL, Quiñones-Gálvez J, Terylene A, Martínez P, Carvajal C (2020) *In vitro* antimicrobial activity of foliar ethanolic extracts of *Moringa oleifera* Lam., against phytopathogenic fungi. *Revista de Protección Vegetal* 35: 1-8.
- Rodríguez-Sauceda EN, Rojo-Martínez GE, Ramírez-Valverde B, Martínez-Ruiz R, Cong-Hermida MDLC, Medina-Torres SM, Piña-Ruiz HH (2014) Análisis técnico del árbol del mezquite (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. ex Willd.) en México. *Ra Ximhai* 10: 173-194.
- Sánchez-Arreola E, Maiti R, Trujillo-Pérez B (2004) Morpho-anatomical characters and secondary metabolites from *Psittacanthus calyculatus* (Loranthaceae). *Phyton-International Journal of Experimental Botany* 73: 119-121.
- Saura-Calixto F, Serrano J, Goñi I (2007) Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry* 101: 492-501.
- Thomson RH (1997) Anthraquinones. In: *Naturally occurring quinones IV: Recent advances* (ed) Springer Dordrecht. University of Aberdeen Scotland. Scotland. pp: 309-483.
- Velázquez A, Robles L, Barrera L (2021) Chemical profile and antifungal activity of plant extracts on *Colletotrichum* spp isolated from fruits of *Pimenta dioica* (L.) Merr. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 179: 1-10. DOI: 10.1016/j.pestbp.2021.104949.
- Xoca-Orozco LA, Aguilera-Aguirre S, Vega-Arreguín J, Acevedo-Hernández G, Tovar-Pérez E, Stoll A, Herrera-Estrella L, Chacón-López A (2019) Activation of the phenylpropanoid biosynthesis pathway reveals a novel action mechanism of the elicitor effect of chitosan on avocado fruit epicarp. *Food Research International* 121: 586-592.

- Xoca-Orozco LA, Cuellar-Torres EA, González-Morales S, Gutiérrez-Martínez P, López-García U, Herrera-Estrella L, Vega-Arreguín J, Chacón-López A (2017) Transcriptomic analysis of avocado Hass (*Persea americana* Mill) in the interaction system fruit-chitosan-*Colletotrichum*. *Frontiers in Plant Science* 8: 1-13. DOI: 10.3389/fpls.2017.00956.
- Xoca-Orozco LA, Zamora-Gasga V, Espinosa-Alonso G, Velázquez-Estrada RM, López-García U, Sáyago-Ayerdi S, Chacón-López A (2018) *In vitro* antioxidant and antifungal activities of carambola (*Averrhoa carambola* L.), extracts. *Biocencia* 20: 104-109.
- Xu K, He G, Qin J, Cheng X, He H, Zhang D, Peng W (2018) High-efficient extraction of principal medicinal components from fresh *Phellodendron bark* (*Cortex phellodendri*). *Saudi Journal of Biological Sciences* 25: 811-815.