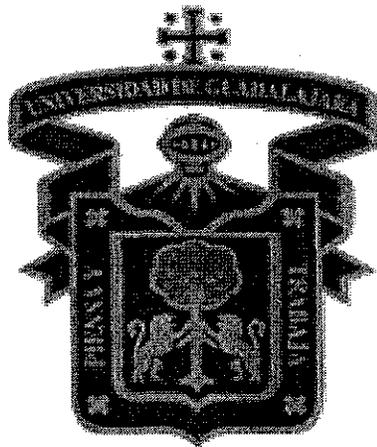


UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS



**ACTIVIDAD FUNGICIDA *In vitro* DE EXTRACTOS CON ALTO
CONTENIDO DE ALCALOIDES OBTENIDOS DE *LUPINUS SILVESTRES*
(FABACEAE) Y ESPARTEÍNA SOBRE ALGUNOS HONGOS
FITOPATÓGENOS**

ARTEMIZA BERNAL ALCOCER

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS AGRÍCOLAS Y FORESTALES

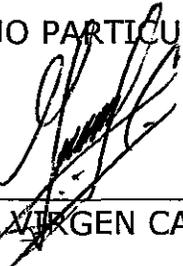
Zapopan, Jalisco, Septiembre del 2004

Esta tesis titulada "ACTIVIDAD FUNGICIDA *In vitro* DE EXTRACTOS CON ALTO CONTENIDO DE ALCALOIDES OBTENIDOS DE *LUPINUS SILVESTRES* (FABACEAE) Y ESPARTEÍNA SOBRE ALGUNOS HONGOS FITOPATOGENOS" fue realizada bajo la dirección del consejo particular indicado ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS Y FORESTALES

CONSEJO PARTICULAR

TUTOR:


DR. GILVIRGEN CALLEROS

ASESOR:


M. C. JUAN FRANCISCO ZAMORA NATERA

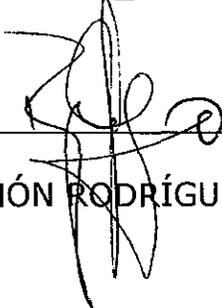
ASESOR:


M. C. RICARDO NUÑO ROMERO

ASESOR:


DR. JOSÉ LUIS MARTÍNEZ RAMÍREZ

ASESOR:


M.C. RAMÓN RODRÍGUEZ RUVALCABA

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, Septiembre del 2004.

DEDICATORIAS

A mi madre, que aunque no esta presente físicamente su corazón y sabiduría están conmigo.

A mi padre por su amor, enseñanzas y sabiduría.

A mis hermanos por su apoyo y amor, Gracias Hugo, Saúl y Paty.

A mi Tía Coco, por su cariño y comprensión.

A mis amigos por aguantarme en las buenas y en las malas, saben que son parte de la familia.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gil Virgen por permitirme iniciarme en la investigación en su laboratorio y su interés en formar nuevos investigadores.

A Francisco Zamora por su apoyo, sus sabios consejos y creer en mi.

Al Dr. Mario Ruiz por permitirme trabajar en su laboratorio y por la experiencia de haber formado parte de su equipo.

Al Maestro Ricardo Nuño por su apoyo en la interpretación de los datos y su experiencia.

Al Dr. Juan Francisco Casas Salas por sus consejos y apoyo en todo momento.

A mi ALMA MATER por la oportunidad de formarme como investigador.

A mis maestros por sus enseñanzas.

A mis compañeros del Posgrado por todos los momentos compartidos.

A Carlos, Hector, Guillermo y Quique por su ayuda en el laboratorio.

A cada una de las personas que hicieron posible la culminación de este proyecto.

**ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA
DEL DEPARTAMENTO DE BOTANICA Y ZOOLOGIA Y EL LABORATORIO
DE FITOPATOLOGIA DEL DEPARTAMENTO DE PRODUCCION AGRICOLA.**

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
RESÚMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Manejo de enfermedades.....	4
2.1.1. Métodos de control.....	5
2.1.2. Control químico	5
2.1.3. Control físico.....	5
2.1.4. Control cultural.....	6
2.1.5. Control biológico.....	7

2.3. Uso de extractos vegetales para el control de enfermedades en plantas	7
2.3. Clasificación e importancia del género <i>Lupinus</i>	10
2.3.1. Descripción morfológica.....	11
2.3.2. Antecedentes históricos y distribución geográfica.....	13
2.3.3. Alcaloides.....	14
2.3.4. Síntesis de alcaloides.....	18
2.3.5. Métodos de extracción.....	18
2.4. Actividad biológica del genero <i>Lupinus</i>	19
2.4.1. Alelopatía y herbicida.....	21
2.4.2. Acarostático.....	23
2.4.3. Nematostático.....	24
2.4.4. Insectistático.....	24
2.4.5. Bacteriostática y bactericida.....	25
2.1.7. Fungistático y fungicida.....	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. Material Vegetal para la obtención de extractos.....	28
3.2. Cuantificación de alcaloides totales.....	28
3.3. Preparación de extractos.....	29
3.4. Alcaloides puros.....	30

3.5. Aislamiento, identificación y multiplicación de los hongos fitopatógenos.....	30
3.6. Bioensayos.....	30
3.6.1. Evaluación de la actividad fungicida de los extractos sobre los hongos.....	30
3.6.2. Evaluación de la actividad fungicida de la Esparteína sobre los hongos.....	31
3.7. Diseño Experimental.....	32
3.8. Análisis estadísticos.....	32
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
4.1. Concentración de alcaloides.....	34
4.2. Efecto del extracto sobre los hongos.....	35
4.2.1. Extracto de <i>L. exaltatus</i>	35
4.2.2. Extracto de <i>L. rotundiflorus</i>	38
4.2.3. Extracto de <i>L. montanus</i>	42
4.3. Efecto de la esparteína sobre los hongos.....	45
6. CONCLUSIONES.....	48
7. LITERATURA CITADA.....	49

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Porcentaje del contenido de alcaloides principales en relación con el contenido total de alcaloides.....	17
Cuadro 2. Tratamientos utilizados para la inhibición del crecimiento micelial de hongos fitopatógenos.....	32
Cuadro 3. Porcentaje total de alcaloides en 3 especies de <i>Lupinus</i> silvestres.....	34
Cuadro 4. Inhibición <i>in vitro</i> del peso seco del micelio de hongos fitopatógenos con extracto de <i>L. exaltatus</i>	36
Cuadro 5. Inhibición <i>in vitro</i> del peso seco del micelio de hongos fitopatógenos con extracto de <i>L. rotundiflorus</i>	40
Cuadro 6. Inhibición <i>in vitro</i> del peso seco del micelio de hongos fitopatógenos con extracto de <i>L. montanus</i>	43
Cuadro 7. Inhibición <i>in vitro</i> del peso seco del micelio de hongos fitopatógenos con Esparteína.....	46

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Hojas, flores y vainas de *L. montanus*.....
- Figura 2. Estructura química de algunos alcaloides quinolizidínicos que se encuentran en los lupinos.....
- Figura 3. Porcentaje de inhibición *in vitro* del extracto de *L. exaltatus* sobre el peso seco del micelio de diferentes hongos fitopatógenos.....37
- Figura 4. Porcentaje de inhibición *in vitro* del extracto de *L. rotundiflorus* sobre el peso seco del micelio de diferentes hongos fitopatógenos.....41
- Figura 5. Porcentaje de inhibición *in vitro* del extracto de *L. montanus* sobre el peso seco del micelio de diferentes hongos fitopatógenos.....44
- Figura 6. Porcentaje de inhibición *in vitro* de esparteína sobre el peso seco del micelio de diferentes hongos fitopatógenos.....47

RESUMEN

Se determinó la concentración de alcaloides en semillas de *Lupinus exaltatus* Zucc., *L. rotundiflorus* M. E. Jones y *L. montanus* HBK. (Fabacea) y se evaluó la actividad fungicida *in vitro* de los extractos y esparteína (alcaloide puro). El mayor contenido de alcaloides fue de 2.42% para *L. rotundiflorus*, *L. exaltatus* con 1.93% y *L. montanus* con 1.84%. Se evaluaron concentraciones de 0, 2500, 5000, 7500, 10,000 y 20,000 ppm, para los extractos, con esparteína las concentraciones fueron de 0, 10,000, 20,000 y 30,000 ppm, sobre el crecimiento del micelio de *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*, se determinó el peso seco del micelio. El extracto con mayor actividad antifúngica fue *L. exaltatus*, al mostrar actividad significativa ($p < 0.01$) contra los cuatro hongos y una inhibición casi del 100% en 2500 ppm para *S. rolfsii*. El extracto de *L. rotundiflorus* también mostró actividad fungicida significativa a 2500 y 7500 ppm contra *R. solani* y *S. rolfsii* respectivamente. Con el extracto de *L. montanus* solo se observó actividad fungicida contra *S. rolfsii*. Por otro lado, la esparteína solo mostró actividad significativa sobre *R. solani* a 20,000 ppm, estimulando el crecimiento de *S. rolfsii*, *A. solani* y *F. oxysporum*.

ABSTRACT

The contents of alkaloids in seeds of *Lupinus exaltatus* Zucc., *Lupinus rotundiflorus* M.E. Jones and *Lupinus montanus* HBK. (Fabaceae) were determined. The fungicide activity *in vitro* of extracts rich in alkaloids was also evaluated. We found alkaloids contents of *L. rotundiflorus* were 2.42 %, followed by *L. exaltatus* with 1.93 % and *L. montanus* with 1.84 % in the last place. We also evaluated 0, 2500, 5000, 7500, 10,000 y 20,000 ppm concentrations of extracts, and from sparteine evaluated 0, 10,000, 20,000 y 30,000 ppm concentrations from the mycelia growth of *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*. We quantified the dry weight of mycelium. The extracts having major fungicide activity were found to be those from *L. exaltatus*, which exhibited significant activity ($p < 0.01$) against the four fungi, and inhibition of almost 100% in the 2500 ppm extract acting on *S. rolfsii*. The extract of *L. rotundiflorus* also exhibited significant fungicide activity at 2500 and 7500 ppm against *R. solani* and *S. rolfsii*, respectively. It was found that the extract of *L. montanus* only showed significant activity against *S. rolfsii*. By side, the sparteine exhibited significant fungicide activity at 20,000 ppm againts *R. solani*,

1. INTRODUCCIÓN

Para el control de plagas y enfermedades la utilización de agroquímicos sintéticos como insecticidas, bactericidas y fungicidas continúan siendo los más importantes a la hora de aumentar el rendimiento de los cultivos. Sin embargo la utilización masiva y a veces indiscriminada de estos productos ha conducido a la creciente aparición de organismos fitopatógenos resistentes, originando esto un aumento significativo de los costos de producción y problemas graves de contaminación ambiental. Esta situación ha llevado a investigadores de todo el mundo a buscar nuevos compuestos que representen alternativas en la protección de los cultivos contra la acción de microorganismos fitopatógenos, cuya actividad, selectividad y seguridad ambiental sea adecuado. En este sentido, no es de extrañar que los productos naturales derivados de las plantas sean una fuente atractiva de potenciales productos químico-biológicos para el control de organismos fitopatógenos, no solo por su diversidad en estructuras químicas, si no por su acción biológica específica y su carácter inocuo, a priori sobre el ambiente (Kloepper, 1999). En el caso de microorganismos fitopatógenos existe información de cerca de 400 especies de plantas con propiedad fungicida y se estima que esta propiedad es una característica que se presenta frecuentemente en algunos metabolitos secundarios (Grainge y Ahmed, 1988). Investigaciones recientes indican que extractos de plantas que contienen aceites esenciales muestran mayor actividad fungicida, (Montes, 1996; Bravo *et al.*, 1998; Wilkinson *et al.*, 2003 y Carpinella *et al.*, 2003), sin embargo en los últimos años se han realizado estudios con la intención de evaluar la fungicida de otros metabolitos secundarios como los alcaloides, los cuales se acumulan en cerca del 20% de todas las especies de plantas y se ha elucidado la estructura química de aproximadamente 12000 (De Luca & Laflamme, 2001). Por la importancia que representan

los alcaloides quinolizidinicos (AQ) en las especies del genero *Lupinus* (Fabaceae), como defensa química contra patógenos (hongos, bacterias, nematodos, virus) se han realizado investigaciones con la intención de evaluar su actividad contra organismos fitopatógenos (Wink, 1994). Existen antecedentes reportados sobre la actividad fungicida *in vitro* de alcaloides puros (Gramina y Esparteína) obtenidos de lupinos amargos sobre cuatro hongos, ellos observaron mayor actividad con Gramina a concentraciones de 40mM sobre *Phytium aphanidermatum* y *Botrytis cinerea*, en el caso de la Esparteína solo mostró cierto efecto sobre *Phytium aphanidermatum* (De la cuadra *et al.*, 1994). El efecto *in vitro* de extractos ricos en alcaloides obtenidos de *L. angustifolius* y *L. luteus* ha sido evaluado contra los hongos fitopatógenos *Alternaria solani*, *Collantotrichum coccodes*, *Fusarium coeruleum* y *Rhizoctonia solani*, concluyendo que ambos extractos tienen un efecto fungistático (Sas-piotrowaska *et al.*, 1997) Por otro lado, también se ha estudiado la actividad bactericida del genero *Lupinus*, así los alcaloides puros (Lupanina y Lupinina) así como extractos crudos obtenidos de *Lupinus albus* y *Lupinus luteus* a diferentes concentraciones, mostraron actividad bactericida, y Lupinina mostro mayaoor actividad que Lupanina a concentraciones desde 5mM a 10mM sobre *Erwinia carotovora* var. *carotovora*, *Pseudomona syringae* P.V. *phaseolicola*; *Pseudomona syringae* P.V. *tomato*; *Pseudomona putida* (De la Vega *et al.*, 1996).

En México existen unas 300 especies de *Lupinus*, de las cuales en el Estado de Jalisco se encuentran alrededor de 12, de las más abundantes encontramos *L. exaltatus*, *L. rotundiflorus* y *L. montanus* las cuales representan una fuente importante de alcaloides (Ruiz *et al.*, 1999). En este sentido y como una forma de explorar nuestros recursos vegetales con propiedades antimicrobianas y la búsqueda de alternativas a los productos químico-sintéticos para el control de enfermedades; se realizó esta investigación cuyos objetivos fueron determinar la concentración de

alcaloides en semillas de *L. exaltatus*, *L. rotundiflorus* y *L. montanus* y evaluar la actividad antifúngica de extractos ricos en alcaloides sobre *Sclerotium rolfii*, *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1 Manejo de enfermedades.

La agricultura en muchas formas representa la antítesis de las comunidades biológicas naturales. Los requerimientos esenciales de los sistemas económicamente viables están en conflicto básico con la mayoría de los métodos de control de los patógenos. Por ejemplo: el monocultivo, la incorporación de fertilizantes y el control del clima dentro de los invernaderos tienden a favorecer a aquellos patógenos que pueden sacar provecho de los nichos o situaciones así creadas. Como consecuencia, aunque la enfermedad es la excepción, el potencial para la propagación súbita de un determinado patógeno aumenta considerablemente en comparación con las comunidades naturales.

Sin embargo el uso de fungicidas confrontan un dilema: aunque juegan un papel mayor en la producción de alimentos, hasta ahora son un tanto tóxicos y contaminantes. Así la constitución de métodos no-químicos dentro de los programas de control de enfermedades nos facilita un paso a este dilema; esto incluye el uso de cultivos resistentes y vástagos, control biológico, métodos culturales, manipulación de fungicidas o respuesta a hospederos, etc., incluyendo la reducción de dosis de fungicidas integrando esto al programa de Manejo Integrado de Enfermedades (Katan, 2000).

Así el hombre ha tenido que desarrollar métodos de control que ofrezcan una solución, aunque sea temporal. Desafortunadamente, el éxito de muchas de las medidas de control ha sido a corto plazo. El logro de una solución final al problema de las enfermedades sigue siendo una necesidad no satisfecha; el fracaso de los compuestos químicos y programas de

fitomejoramiento en brindar resultados permanentes ha centrado la atención en la aplicación de principios ecológicos en el control de enfermedades.

2.2 Métodos de control.

2.2.1 Control químico.

Aunque el control químico es de los más empleados para la protección de los cultivos de alto valor económico, en ocasiones su uso no es adecuado.

Existen diferentes métodos químicos que se emplean para el buen control de las enfermedades, éstos pueden ser preventivo, curativo o erradicativo; el primero se aplica antes de que se observen síntomas en la planta, esto se limita a dar tratamiento cuando la planta este en peligro por las condiciones propias para el desarrollo del patógeno al impedir al hongo hospedarse en la planta. El método curativo consiste en la aplicación al cultivo durante el periodo de incubación del patógeno. El método erradicativo consiste en aplicar después del periodo de incubación y como su nombre lo indica es con el fin de erradicar al patógeno. Recientemente se han introducido diferentes métodos para el control de fitopatógenos como alternativas al uso de fungicidas, esto incluye desde los inorgánicos que han sido reemplazados por químicos orgánicos sintéticos (Wheeler, 2002)

2.2.2 Control Físico.

Los agentes físicos como el calor, la energía solar y radiación pueden ser usadas como tratamiento al suelo, solo antes de la plantación, estas herramientas ocupan un lugar relevante en el control de enfermedades en plantas. Sin embargo su uso puede involucrar algunas dificultades por

ejemplo, problemas tecnológicos relacionados para la transferencia de agentes para el suelo con el acolchado, la dificultad para que el inóculo llegue a todos los sitios del suelo y éste muera, y además el costo que implica su uso. El calor es una de las herramientas físicas de mayor uso para la desinfección del suelo. Los métodos físicos pueden ser usados también para la desinfección del material de propagación, en recientes años para el tratamiento de productos agrícolas en el manejo post cosecha.

Uno de los principios básicos es que el calor sea efectivo para el control de patógenos, malezas y artrópodos, usualmente la temperatura que se aplica es de 70 °C por 30-60 min es suficiente para erradicar más patógenos, pero no ciertos virus como el TMV; el vapor es el agente usado generalmente para la desinfectación de suelo (Kaatán, 2000).

2.2.3 Control Cultural.

Por centurias, las prácticas culturales han sido usadas principalmente y son solo técnicas que ayudan a reducir la incidencia o daño causado por patógenos de suelo y otras plagas. Los métodos culturales incluyen desde fertilización mineral, irrigación y residuos, efectos de componentes bióticos y abióticos del suelo, recientemente incrementan o decrementan en la zona de la raíz de la planta, y en las hojas sobre la incidencia y severidad del daño causado por patógenos de suelo. Esto podría depender del método empleado, la naturaleza del patógeno, la planta hospedera, el organismo de suelo, y la incidencia del daño. Un ejemplo frecuente es, el daño causado por zoosporas del hongo *Phytophthora* spp. Este es aumentado por exceso de agua o por irrigación, el ajustar la irrigación puede servir como una herramienta para el manejo del daño en ciertos casos y para agrandar el daño en otros casos (Kaatán, 2000).

Otra práctica cultural es la rotación de los cultivos usada para mantener la fertilidad del suelo y su estructura, pero con el conocimiento que la baja frecuencia de rotación hace un cultivo susceptible. Las prácticas culturales pueden ser evaluadas de acuerdo algunos criterios: que sean efectivas y tengan un amplio espectro de control, de fácil aplicación, reproducibilidad, simplicidad en el rango de aplicación y costo (Kaatán, 2000).

2.2.4 Control biológico

Una de las alternativas para el control químico de plantas dañadas es el control biológico basado sobre aplicaciones de microorganismos antagonistas, antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo, lisis enzimática), e inducción de resistencia. Los suelos supresivos constituyen un buen potencial como reservorio de agentes de control biológico. Sin embargo hay que tener en cuenta, la alta relación de densidad de inóculo de microorganismos, para modificar en orden el equilibrio microbiológico, ya que de lo contrario esto representaría un desequilibrio en el medio ambiente (Alabouvette, 2000).

Aunque mayormente se piensa sobre control biológico en términos solo de organismos contra especies particulares. Sería interesante probar cócteles de bioagentes y múltiples blancos a atacar (Wall, 2000).

2.3 Uso de extractos vegetales para el control de enfermedades en plantas

El uso de extractos vegetales es un método no convencional para el control de las enfermedades que puede ser incluido dentro de los métodos de control utilizados para un manejo integrado de enfermedades. En relación a hongos fitopatógenos existen antecedentes que validan las

propiedades antifúngicas de los metabolitos secundarios, es un fenómeno frecuente (De la Cuadra *et al.*, 1992; 1994; Wink, 1994; Montes, 1996; Sas-Piotrowska *et al.*, 1997; Arias *et al.*, 1999; Zamora *et al.*, 2002 Pitarroliki *et al.*, 2003).

En el caso de los alcaloides quinolizidínicos de *Lupinus* su actividad biológica se le atribuye mayormente a los alcaloides quinolizidínicos tetracíclicos con un núcleo quinolizidínico y con núcleo piridínico (Aniszewski, 1994). Los alcaloides tienen la más importante función biológica en la planta, es a ellos a quien corresponde la defensa química y bioquímica, protección de reproducción generativa, son la fuente de nitrógeno, almacenamiento de nitrógeno y estimulación del crecimiento. Después de la síntesis en el estroma de los cloroplastos, en las hojas, los alcaloides son transportados y usados en el metabolismo de la planta (Aniszewski, 1994).

En este sentido, la diversidad de hongos fitopatógenos también genera diversidad de respuestas al interactuar con los vegetales (Montes, 1996). Por esto un aspecto importante para tomar en cuenta es la habilidad de una planta para responder a una infección, ya que es determinada por rutas genéticas en ambos, el patógeno y el huésped. Algunos mecanismos de resistencia son específicos para la planta y ciertas cepas de patógenos: la planta reconoce los genes de resistencia patógeno-derivados de moléculas resultando para expresión de los así llamados genes de avirulencia, el cual a menudo dispara una señal cargada primero en cascada para rápido matar la célula huésped. Otro de los niveles para inducir resistencia al huésped, comúnmente llamada "resistencia sistémica adquirida" (SAR) esta expresada por todas partes después de localizada la necrosis es inducida por patógenos o no patógenos. Un nuevo aprovechamiento en el control de daño, puede consistir en el uso de compuestos para activar la respuesta SAR en plantas (Gullino *et al.*, 2000).

Así como estos metabolitos secundarios de las plantas, podemos encontrar un sin número de ellos que han evolucionado contra la evolución de las especies; modificando sus estructuras químicas influenciados por los cambios de temperatura, modificación de la composición del suelo entre otros y por ende modificando su actividad biológica.

Sin embargo, la industria de los agroquímicos probablemente no este muy convencida de apostar a esta opción de usar productos de origen vegetal. Si analizamos el impacto ecológico que el uso de agroquímicos tiene sobre el medio ambiente es una consideración que esta industria también tiene que tomar en cuenta, sin embargo no es de las principales a tomar en cuenta por esta misma.

A continuación algunas de las consideraciones que toma en cuenta la industria de agroquímicos para el uso de productos naturales en el control de enfermedades en plantas (Rice *et al.*, 1998):

- ❖ ¿Como trabaja?
- ❖ ¿Este es seguro?
- ❖ ¿Es patentable?
- ❖ ¿Puede reproducirse a grandes escalas?
- ❖ ¿Puede ser suficiente y para no agotarse?
- ❖ ¿Puedo tener dinero haciendo esto.

En este sentido los bioensayos son una buena herramienta para contestar algunas de las preguntas anteriormente mencionadas, la autobiografía combina TLC (Cromatografía de capa fina) con bioensayos *in situ*, permite la localización de compuestos activos en el extracto de la planta. Las esporas del hongo son dispersadas en la placa, *Aspergillius*, *Penicillium* y *Cladosporium* spp. en un medio nutritivo; después de la incubación, las zonas de inhibición aparecen donde el hongo es inhibido por el compuesto activo de la planta. Esta técnica de contacto autobiográfico reside sobre la transferencia de los compuestos activos a la fase estacionaria dentro de la capa de agar (conteniendo los

microorganismos) por un proceso de difusión (Hostettmann y Wolfender, 1997). Esta técnica ha permitido el aislamiento de numerosos productos naturales como fungicidas.

Sin embargo una vez encontrado el compuesto activo, nos encontramos con otra de las interrogantes, ¿Como obtener una producción a gran escala para su comercialización? Una alternativa puede ser el cultivo celular de la planta (Rice *et al.*, 1998). Aun cuando se desarrolla investigación, falta mucho por investigar para desarrollar nuevos productos que mejoren la calidad e inocuidad de los alimentos y el impacto al medio ambiente.

2.4 Clasificación e importancia del genero *Lupinus*.

Takhtajan (1987), ubica a los lupinos en las siguientes categorías sistemáticas:

División	Magnoliophyta (Angiospermae)
Clase	Magnoliopsida (Dicotyledone)
Subclase	Rosidae
Superorden	Fabanae
Orden	Fabales
Suborden	Leguminosinae
Familia	Leguminosae (Fabaceae)
Subfamilia	Papilionaceae
Tribu	Genisteae
Subtribu	Genistinae
Género	<i>Lupinus</i>
Especie	spp.

La utilidad de las leguminosas no se restringe solo al terreno de la alimentación, existen especies que se utilizan como abono verde, para el control de la erosión, ornamentales, como insecticidas, maderables y muchas de ellas son excelentes fuentes de materia prima para colorantes, para obtener taninos, fenoles, gomas, ceras o bien como portadoras de materias primas para la industria química y farmacéutica (laxantes, esteroides y antioxidantes) (Aykroyd, 1964).

Otra peculiaridad de enorme importancia, es la capacidad que tienen muchas especies de asociarse con bacterias del género *Rhizobium* las cuales forman nódulos en las raíces de las plantas. Estas bacterias fijan nitrógeno atmosférico convirtiéndolo en amoníaco y así queda disponible para otros cultivos en un sistema de rotación de cultivos (López-Bellido, 1991; Cubero & Moreno, 1983).

En este sentido, Martínez (1991) señaló que en México hay varios géneros de leguminosas que se deben estudiar e impulsar su utilización como son *Phaseolus*, *Centrosema*, *Desmodium*, *Acacia* y *Lupinus*.

2.4.1 Descripción morfológica.

Este género se caracteriza por presentar hojas palmíticas, compuestas de 5-17 folíolos (Figura 1); estipulas adnadas a la base de los pecíolos, y racimos terminales que presentan flores dispuestas de forma dispersa o en verticilos; fruto dehiscente más o menos compreso lateralmente, con diversos tipos de pubescencia, (Dunn, 1979; Sánchez, 1979; McVaugh, 1987).

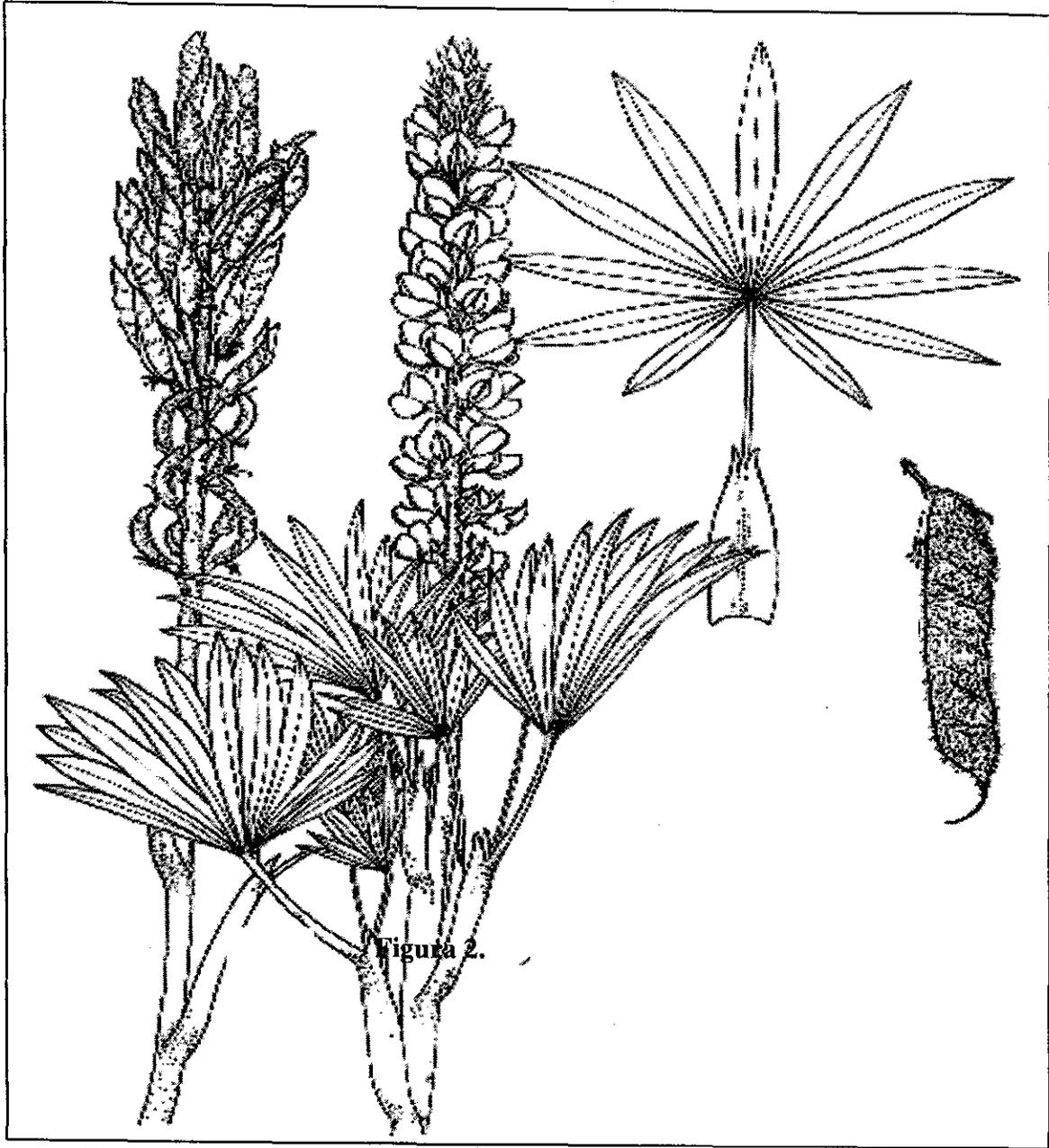


Figura 2.

Figura 1. Hojas, flores y vainas de *L. montanus*.

2.4.2. Antecedentes históricos y distribución geográfica.

Tournefort usó el nombre *Lupinus* para el género por primera vez en 1694, proviene del latín *Lupus*, que significa lobo, ya que estas plantas eran asociadas a los lugares salvajes y bosques donde habitan lobos. Posteriormente en 1753 Lineo incluyó al género en su obra *Species plantarum* (Planchuelo, 1994).

Dependiendo de la región, al género *Lupinus* se le conoce vulgarmente como: lupino, altramuz, Chocho o Tarwi.

De acuerdo con Gross (1986) existen dos grandes regiones de origen para el género *Lupinus*, que son:

1. La cuenca Mediterránea, desde el sur de Europa hasta África central (incluyendo Grecia, Turquía, España, Portugal y terrenos montañosos de África).
2. El continente Americano, (En las regiones montañosas del oeste de Norteamérica, desde Alaska hasta México; en las tierras altas de los Andes en Perú y regiones vecinas como Uruguay, Argentina y Brasil, exceptuando las húmedas llanuras tropicales y la cuenca del Amazonas).

Mientras que la región del mediterráneo comprende escasamente una docena de especies, de las que se cultivan comercialmente *L. albus*, *L. luteus* y *L. angustifolius*; en la región de América existen varios cientos de especies.

Deben haber entre 300 a 400 especies de lupino en América, con una estrecha relación citogenética, lo que las hace morfológicamente más similares entre sí que las especies del viejo mundo, sin embargo, a pesar de esta gran diversidad de especies de América, solo se ha domesticado y cultivado a *L. mutabilis*. Existen tres centros de distribución: uno es la zona norte y centro de América, otra en Sudamérica y la última en la costa del Mediterráneo (Planchuelo, 1994).

Algunos estudios señalan a la parte central de México y California como el centro de diversidad de los lupinos del Nuevo Mundo (Simmonds, 1976). Estas especies son muy dinámicas y ocupan hábitats desde el nivel del mar hasta tundra alpina arriba de los 4000 msn, (Gross, 1986; Planchuelo, 1994).

México se caracteriza por tener una riqueza extraordinaria de especies nativas del género *Lupinus*, se reportan cerca de 110 especies, desde el nivel del mar hasta los 4000 metros, distribuyéndose desde Baja California hasta Chiapas, de las especie mas abundantes se encuentran; *L. exaltatus*, *L. campestris*, *L. elegans*, *L. hartwegii*, *L. mexicanus*, *L. montanus*, (Bermúdez *et al.*, 1999). La mayor biodiversidad del género se encuentra en la parte central de México, especialmente en el Eje Neovolcánico, en el cruce de la Sierra Madre Occidental; principalmente en espacios abiertos del bosque de pino o pino-encino, en pastizales, a orilla de los caminos y campos de cultivo, así como en regiones semiáridas, particularmente en el estado de Jalisco crecen aproximadamente 15 especies (Ruiz *et al.*, 1999).

2.4.3 Alcaloides.

En *Lupinus* se han detectado más de 100 alcaloides quinolizidínicos (AQ), entre los principales están la lupanina, esparteína, 13-OH-lupanina, lupanina, angustifolina y anagirina; el contenido de alcaloides en las diferentes especies del género *Lupinus* es variable y está determinado por la especie, cultivar, etapa fenológica, condiciones climáticas, edáficas entre otros. Así por ejemplo, en semillas el contenido fluctúa desde 0.02 % en variedades dulces y domesticadas; hasta un 5% en especies silvestres de alcaloides totales (Kinghorn *et al.*, 1980; Mankinen *et al.*, 1975; Hatzol *et al.*, 1983).

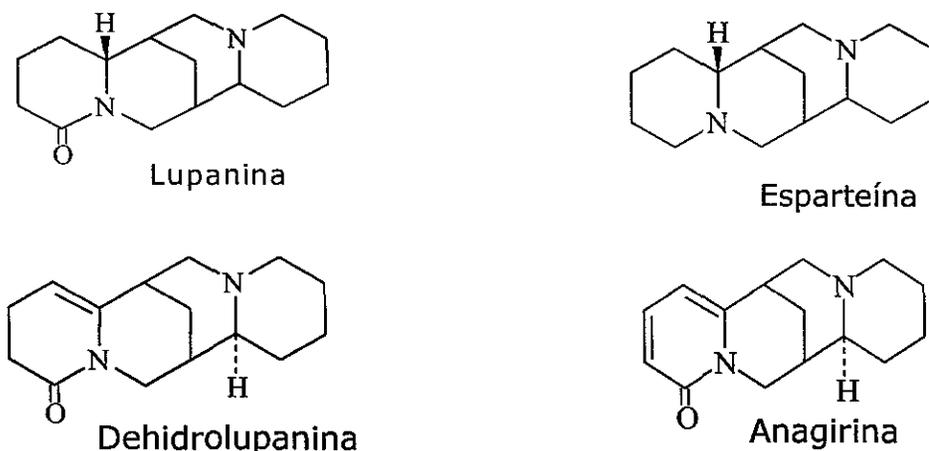


Figura 2. Estructura química de algunos alcaloides quinolizidínicos que se encuentran en los lupinos.

La estructura base de estos alcaloides (Figura 2) es su anillo quinolizidínico, que pueden ser bicíclicos, tricíclicos, tetracíclicos o alifáticos; y se encuentran como base terciaria y como N-óxidos según Wink (1993).

Estudios recientes muestran que los alcaloides quinolizidínicos no son exclusivos del género *Lupinus* ya que éstos se han encontrado en otras tribus de leguminosas, tales como Sophoreae, Dalbergieae, Euchrestae, Thermopsidae, Genisteae, Bossiaeeae, Brongniartieae, Podalyrieae, Liparieae y Crotalarieae, todas estas consideradas como primitivas. Sin embargo, se han reportado también en otras familias no relacionadas con las leguminosas, como Berberidaceae, Solanaceae, Ranunculaceae, Chenopodiaceae y Rubiaceae (Wink, 1993). Los AQ representan cerca del 2 por ciento de los 7000 alcaloides conocidos en plantas. (Aniszewski, 1994)

Los alcaloides quinolizidínicos (AQ) en el género *Lupinus* pueden encontrarse en concentraciones que varían desde 0.01% niveles indetectables en variedades dulces genéticamente mejoradas, hasta un 4% en especies amargas principalmente silvestres (Swiecicki y Jach, 1980).

La presencia de los AQ en cada especie de lupinos es muy particular y aunque se presentan varios de ellos en una misma especie, uno de ellos suele ser mayoritario. En este sentido el que se encontró en mayor concentración en las especies domesticadas tanto de Europa y Asia, como de América fue la lupanina (Muzquiz, 1988).

En un estudio realizado en 56 especies de EUA, Canadá, Sudamérica y Europa se detectaron más de 100 alcaloides quinolizidínicos y piperidínicos. Así mismo se observó que los alcaloides tetracíclicos (lupanina, esparteína e hidroxilupanina) se encontraron en todas las especies analizadas; los bicíclicos, como la lupinina, multiflorina y los derivados de ambos, son especialmente abundantes en los lupinos de Europa, Asia y/o África, lo que hace suponer que tienen una estrecha relación genética y probablemente tuvieron un ancestro común. La generación de estos datos puede ayudar a resolver problemas de tipo taxonómico, sobre todo en los lupinos americanos, ya que presentan una estrecha relación citogenética por lo que morfológicamente son muy similares (Wink *et al*; 1995).

En cuanto al perfil de alcaloides de los *Lupinus* de México, reportado por Prizbylak *et al* (2004), determino la composición de alcaloides en *L. exaltatus*, *L. montanus* y *L. rotundiflorus* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Porcentaje del contenido de alcaloides principales en relación con el contenido total de alcaloides.

Alcaloides Mayoritarios	<i>L. rotundiflorus</i>	<i>L. montanus</i>	<i>L. exaltatus</i>
Lupanina	62.2	18.7	47.3
Esparteína		16.8	
13-hidroxylyupanina		24.6	
α -isolupanina	18.6		10.6
3 β -hidroxylyupanina	7.7	1.1	7.1
11,12-dehidrolupanina			1.1
5,6-dehidro- α -isolupanina			1.2
Epiafilina			11.9
Afilidina	1.5		
Afilina			5.4
Tetrahidrorombifolina		13.6	
13 α -angeloiloxylyupanina		11.6	
13 α -tigloiloxylyupanina		8.0	
N. i. 4		1.6	
N.i. 12			3.7
N. i. 15	1.4		
N. i. 20	1.2		7.8
Alcaloides minoritarios	<1% (15)	<1% (5)	<1% (9)
Contenido total de alcaloides (%)	3.5	2.6	2.7

2.4.4. Síntesis de alcaloides.

Wink y Hartmann (1982) evaluaron la distribución de alcaloides en varios órganos de plantas en floración de *Lupinus polophyllus* y encontraron que la más alta proporción se encontró en las raíces con 38-45%, en relación al total de alcaloides, mientras que en hojas fue de 27-31%.

Con relación a lo anterior, Wink (1993) señaló que los alcaloides se encuentran distribuidos en toda la planta, pero el sitio de mayor síntesis de alcaloides en los lupinos son las raíces y principalmente las hojas (en los cloroplastos), ya que son los órganos de mayor actividad fisiológica, de ahí son transportados vía floema a otras partes de la planta especialmente a las semillas. Se sabe que los alcaloides no son importantes en el metabolismo primario de las plantas que los sintetizan, en el caso de las especies del género *Lupinus* aunque no son consideradas como sustancias indispensables para las funciones vitales, sí son importantes para que las plantas puedan sobrevivir en un medio natural, ya que generalmente son considerados como mecanismos de defensa que la planta usa contra el ataque de sus depredadores herbívoros, vertebrados e invertebrados, así como microorganismos patógenos como hongos, bacterias y virus (Wink, 1994).

2.4.5. Métodos de extracción

El método de extracción a utilizar depende de la composición química de la semilla de Lupino. La extracción de alcaloides esta generalmente basada en un hecho que normalmente ocurre dentro de la planta como sales y en su basicidad, en otras palabras en la solubilidad diferencial de las bases y sales en agua y solventes orgánicos. Existen diferentes formas de extracción que van desde las ácidas (Karara, 1987, Muzquiz *et al.*, 1994, Wink *et al.*, 1995), con muchas variaciones, alcalinas (Wysocka *et al.*, 1989) hasta alcohólicos (Gulewicz, 1986, Ciesiolka *et al.*, 1988) y otros

innovadores como la utilización de bacterias removedoras de AQ (Santana *et al*, 2002). En el caso de las extracciones alcohólicas, el desamargado de semillas, usando condiciones de pH cerca de 7.0 facilita la extracción de alcaloides en forma de sales, con su propio anion. Este hecho es importante para el reconocimiento y planeación de experimentos con propiedades biológicas de alcaloides y sus aplicaciones en diferentes campos de la ciencia humana.

2.5. Actividad biológica del genero *Lupinus*.

Stobiecki *et al* (1992) indicaron que los métodos de separación y extracción de alcaloides de las especies amargas de *Lupinus* son interesantes, ya que simultáneamente durante el proceso de extracción se generan fracciones ricas en proteínas, carbohidratos estructurales (fibra dietética), aminoácidos y alcaloides que por sus propiedades farmacológicas, antimicrobianas y estimulantes del crecimiento, constituyen subproductos utilizables en la industria farmacéutica y agrícola.

De acuerdo con Aniszewski (1994), la ruta metabólica es uno de los factores para que se presente esta actividad biológica en los alcaloides quinolizidínicos, pues los alcaloides no son un producto final del metabolismo secundario del lupino; otro factor es la ocurrencia de los alcaloides, aunque su ocurrencia en la cosecha de plantas es limitada, la ocurrencia de los alcaloides esta conectada con su papel, pues se ha observado que, los alcaloides son compuestos amargos que actúan como factores antipalatabilidad para herbívoros. La división de los alcaloides de acuerdo a sus propiedades químicas, esta división podría ser interesante si sus bases biológicas fueran sobre la biogénesis o biotoxicidad. En este sentido Aniszewski (1994), concluye que los alcaloides quinolizidínicos tetracíclicos con núcleo piridina son los más tóxicos y peligrosos, y estos mismos son la base de inmunidad de los lupinos. Sin embargo el desarrollo

de variedades dulces ha implicado una reducción en la concentración de AQ y por lo tanto en su defensa química natural contra sus depredadores para el consumo humano. Así, las variedades dulces de *L. albus* y *L. angustifolius* cultivados extensivamente en Alemania y Australia son muy susceptibles al ataque de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal de la enfermedad denominada antracnosis, que hace necesario el uso de pesticidas químicos para su protección lo cual representa problemas económicos y ambientales (López-Bellido y Fuentes, 1991).

Villalobos (1996) considera que la defensa es una importante adaptación fitoquímica de las plantas y por lo tanto, es razonable pensar que de ellas se podrán aislar compuestos biocidas.

Lo anterior ha sido comprobado en diversos estudios (De la Cuadra *et al.*, 1992; Stobiecki *et al.*, 1992, Peretiatkowics *et al.*, 1994; Wink, 1994 De la cuadra *et al.*, 1994; De la Vega *et al.*, 1996; Sas-piotrowaska *et al.*, 1997; Wysocki *et al.*, 2001 Zamora *et al.*, 2002), en donde se ha reportado que los alcaloides presentan las siguientes propiedades biológicas:

- a) Son tóxicos para varias especies de insectos.
- b) Inhiben: la multiplicación viral, el crecimiento de bacterias y hongos patógenos.
- c) Presentan propiedades amebicidas.
- d) Tienen actividad alelopática.
- e) Incrementan el rendimiento de otros cultivos

Asimismo se ha detectado una actividad farmacológica como antiarrítmico, depresora del sistema nervioso central, hipotensivas, hipoglicémicas y antiinflamatoria. (Szcawinska *et al.*, 1994; Muzquiz *et al.*, 1994; Wink, 1994).

2.5.1. Alelopatía.

Los alcaloides quinolizidínicos que se encuentran en los lupinos y otras fabáceas han mostrado tener efecto alelopático contra plantas, esto se ha demostrado con las investigaciones realizadas por diferentes investigadores, en 1983, Wink encontró que una mezcla de alcaloides de *Lupinus* sp. inhiben la germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) y pastos. Cwojdzinski *et al* (1989) estimaron los valores nutritivos de proteína obtenidos de plantas tratadas con extracto de *Lupinus*, el valor biológico de proteína para todas las especies de cebada y papa, fueron más altos que el grupo control, en el caso de triticale, el efecto fue diferente al bajar el valor biológico de proteína en comparación con el grupo control.

Muzquiz *et al* (1994) obtuvieron extractos de *L. albus* y *L. hispánicus*. En *L. albus* se determinó un contenido de alcaloides del 3.6% siendo el alcaloide mayoritario la lupanina; mientras que en *L. hispánicus*, con un contenido de alcaloides de 1.5%, la lupinina resultó ser mayoritario. También obtuvieron en forma pura lupanina y lupinina. Considerando lo anterior y con el objetivo de evaluar el efecto antigerminativo de los alcaloides en semillas de diferentes especies vegetales, se ensayaron los siguientes tratamientos (T):

T1=5,10 y 14 mM de extractos alcaloideos de *L. albus*.

T2=5,10 y 14 mM de extractos alcaloideos de *L. hispánicus*.

T3=10 y 14 mM de Lupanina pura.

T4=10 y 14 mM de Lupinina pura.

Las semillas utilizadas en los ensayos fueron de tres especies silvestres, *Vicia villosa* Kunth, *Avena sterillis* L. y *Chenopodium* sp. y de tres cultivadas, *Pisum sativum* L., *Triticum aestivum* L. y *Lycopersicum sculentum* Mill.

Se encontró un alto efecto antigerminativo cuando utilizaban la lupanina sobre las semillas de *Avena sterillis*, pero fue mayor el efecto por

el extracto alcaloideo, a una dosis de 14 mM con lupanina como alcaloide mayoritario. Cwojdzinski *et al* (1991). Estudiaron la influencia de extracto amargo de *Lupinus* en campo sobre diferentes cultivos, en cultivos de invierno la cebada cv. Popiel resulto con 59% rendimiento mayor en la dosis de 100 lt/ha que las otras dos cebadas, con respecto al testigo, otro cultivo de invierno fue tricale con un incremento de 66% a la dosis de 12.5 lt/ha con respecto al testigo; en los cultivos de primavera el incremento fue menor con cebada (14%) y trigo (9%), en otros cultivos como papa y caña, se confirma que el incremento en campo depende sobre la ontogenesis de la planta y sobre la fertilización de Nitrógeno; en el caso de cebolla no se observo efecto alguno.

Stobiecki *et al.*, (1992) incorporó extractos de lupinos por aspersion sobre el follaje de especies cultivadas y encontraron un claro incremento en el rendimiento de los cultivos. Por lo que la utilización de los extractos de lupinos amargos podrían ser considerados como una fuente de valor importante de productos naturales. En 1993 Stobiecki *et al* publicaron un estudio sobre compuestos fenólicos aislados de un extracto de semillas de *Lupinus* y sus efectos inhibitorio sobre la germinación y crecimiento de semillas de lechuga, a las 24 h ya inhibe la germinación de las semillas de lechuga, pero después de las 72 h ya es comparable con el control. Otra investigación realizada por Michalski *et al* (1996) donde ellos estudiaron el efecto de diferentes extractos de lupinus sobre el cultivo de *Lupinus angostifolius*, se evaluaron dosis de 5, 10, 20, 40 y 80 kg d. w. /ha, con la var. Emir y var. Mirela.

Muzquiz *et al.*, (1994) evaluaron alcaloides comerciales como esparteína y gramina en dosis de 5, 10 y 15 mM y confirmaron que los extractos alcaloideos, donde la lupanina es el alcaloide mayoritario, mostraron un efecto antigerminativo de las semillas de *A. sterillis* considerada una maleza importante en cultivos de España. En el caso de la

esparteína y gramina no mostraron efecto antigerminativo, pero se detectó una inhibición del crecimiento de plántulas en estado de post-emergencia.

Por su parte Peretiatkowicz *et al.*, (1994) observaron que los extractos de *Lupinus angustifolius* var. Mírela estimulan el desarrollo vegetativo de especies vegetales cultivadas. Un estudio reciente realizado por Prizbylak *et al* (2004) realizaron un perfil de alcaloides de *Lupinus exaltatus* una especie silvestre de lupino Mexicana y evaluaron el efecto de este extracto sobre el crecimiento y cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.) con 4 tratamientos sobre fruto y parte vegetativa los resultados fueron los siguientes, en fruto el incremento de masa fresca (g/1 planta) fue significativo ($p < 0.05$) desde la dosis de 320 y 1600 mg / pot con respecto al testigo, el incremento en el cultivo se observa en todas las dosis (80, 320 y 1600 mg / pot).

2.5.2. Acarostático

Siete variedades de *Lupinus luteus* fueron examinadas en experimentos seleccionados para observar la resistencia para alimentar al acaro de pierna roja (*Halotydeus destructor*). Tres fueron estables presentando resistencia y la fracción de alcaloides para estas variedades fue una fuerte amenaza cuando se alimento al acaro. Los alcaloides que componen el extracto, lupinina, un número de Acil derivados de lupinina y esparteína fueron evaluadas para observar su actividad. La esparteína fue la más potente, con actividad significativa al 0.001% de concentración, se cuantificaron las cantidades de alcaloides no polares en los cotiledóneos y hojas de once variedades por cromatografía de gases acoplada a masa. Una correlación inversa fue encontrada entre las concentraciones de estos alcaloides y el daño causado a los acaros; variedades con cantidades <100 g/g (peso fresco) mostraron un alto índice de daño (Wang *et al.*, 2000)

2.5.3. Nematostático

Los alcaloides quinolizidínicos se encuentran ampliamente distribuidos en las leguminosas, con más de 170 estructuras reportadas para estas plantas (Wink, 1994). Zhao (1999), estudio la actividad nematocida de aloperina, citosina, N- metilcitosina y matrina fue probada en el método agar algodón balón y en medio agar, los resultados de los dos métodos mostraron que la actividad nematocida de la aloperina fue larga, expresada como $\log (1/ID_{50})$ (8.67) en comparación con trabajos reportados previamente de actividad nematocida con siete alcaloides quinolizidínicos.

2.5.4. Insecticida.

La inhibición de la alimentación y el crecimiento son los principales daños que provoca la aplicación de *Lupinus*, como insecticida.

Gross y Baer (1977) reportaron que los campesinos de la región andina utilizaban el agua del desamargado de las semillas de *L. mutabilis* para controlar ectoparásitos de animales lanados, como son las llamas, las alpacas y las ovejas.

Por su parte, Jiménez (1982) señaló que con el agua obtenida después de reducir la concentración de alcaloides en las semillas de *L. mutabilis*, más la adición de keroseno y jabón se controlaba el parasitismo externo de la falsa garrapata del ovino (*Melpaghus ovinus*) en un 90%, así como la piojera del ganado vacuno (*Bosphilus spp*) entre 70 y 100%.

Salustio y Troncoso (1982) en condiciones de laboratorio evaluaron extractos acuosos crudos de *L. mutabilis* como pesticidas para controlar parásitos en cerdos, bovinos, ovinos y alpacas. De acuerdo con los resultados obtenidos recomendaron la siguiente emulsión: 1% de alcaloides totales, 10% de keroseno, 2% de jabón y 87% de agua.

Peretiatkowicz *et al.*, (1994) evaluaron el efecto insecticida de un extracto obtenido de semillas de lupino (*Lupinus angustifolius* var. Mírela).

Para llevar a cabo el estudio, se colocaron 20 larvas del escarabajo de la papa en fase L₂ en vasos durante cuatro días. Estas se alimentaron con hojas a las cuales se les adicionaron los extractos por aspersión. Al finalizar el experimento se observó un menor número de hojas consumidas y un mayor número de larvas muertas en el tratamiento con las hojas que recibieron el extracto.

Stobiecki *et al.*, (1992) aplicaron extractos de alcaloides en forma de aspersión sobre el follaje de diferentes especies cultivadas y encontraron que las plantas que no recibieron el extracto fueron más susceptibles al ataque de insectos en comparación a las plantas que si lo recibieron y concluyeron que los alcaloides mostraron efecto repelente contra insectos. También encontraron que un extracto obtenido de semillas amargas de *L. angustifolius* var. Mírela fue efectivo contra afidos que parasitaban a crisantemos reduciendo, el número de insectos hasta un 75%.

2.5.5. Bacteriostático y/o bactericida.

Algunos estudios realizados han probado la actividad bactericida de esta especie *Lupinus*, ya sea como una mezcla de alcaloides (extractos) y como alcaloides puros con buenos resultados.

Tyski *et al.*, (1988) evaluaron el efecto bacteriostático de extractos de *L. angustifolius* var Mirela y *L. luteus* var mirela, los aislados de alcaloides 13-OH-lupanina, angustifolina y lupanina, además de esparteína como alcaloide puro (comercial) se evaluaron sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*. El extracto etanólico presentó un efecto sobre las bacterias a la concentración de 5.6 mg/ml al inhibir su crecimiento y con 8.4 mg/ml el efecto fue bactericida por completo. Los aislados de los alcaloides y el alcaloide puro mostraron una inhibición del crecimiento de las bacterias a concentraciones mayores, lo que demuestra que los extractos contienen además de alcaloides otros compuestos que presentan una actividad mayor en comparación con los

alcaloides en forma pura fue menor en comparación con los antibióticos comerciales.

Posteriormente Muzquiz *et al.*, (1996) estudiaron el efecto bactericida de extractos crudos de *L. albus* y *L. luteus*, los cuales contenían principalmente Lupanina y Lupinina, y fueron utilizados en diferentes concentraciones contra *Pseudomonas syringae* P.V. *Phaseolicola*; *Pseudomonas* P.V. *tomato*; *Pseudomonas putida* y *Erwinia carotovora* var. *carotovora*. El resultado indicó que lupinina tuvo un mayor efecto bactericida sobre las cuatro especies de bacterias estudiadas.

2.5.6. Fungistático y/o Fungicida.

En 1988 De la Cuadra *et al.*, iniciaron los trabajos preliminares de la búsqueda de posibles vías de utilización de los alcaloides de lupinos amargos, evaluando la capacidad fungicida de estos mismos. Se probó el sulfato de esparteína sobre *Pythium aphanidermatum*; agregado al medio de cultivo (PDA) con rangos de concentraciones de 0 y 40 mM con intervalos de 5 mM con 10 repeticiones por concentración; comprobando el efecto que el sulfato de esparteína tiene como agente limitante del crecimiento a 40 mM (51.4 mm) sobre *P. aphanidermatum*.

Por otro lado, De la Cuadra *et al.*, (1992; 1994) evaluaron *in vitro* la capacidad inhibidora de lupanina, aislada de *L. albus*, esparteína y gramina (SIGMA) sobre el desarrollo de cuatro especies de hongos patógenos en cultivos agrícolas, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium solani*, *Pythium aphanidermatum* y *Botrytis cinerea*. El estudio incluyó un rango de concentraciones de alcaloides entre 0 y 40 mM. Se encontró que la gramina es el alcaloide con mayor inhibición sobre los hongos patógenos estudiados, principalmente sobre *Pythium aphanidermatum* y *Botrytis cinerea* a concentraciones de 40 mM casi un 90% de inhibición en el crecimiento micelial.

Sas-piotrowaska *et al.*, en 1997 evaluaron el efecto *in vitro* de extractos ricos en alcaloides obtenidos de *L. angustifolius* var. *Mirela* y *L. luteus* var. *Milfontes* sobre los hongos fitopatógenos de papa tanto de dulo como de follaje *Alternaria solani*, *Collerotrichum coccodes*, *Fusarium coeruleum* y *Rhizoctonia solani*, concluyendo que ambos extractos tienen un efecto fungistático sobre los fitopatógenos en papa.

Estudios realizados con una especie silvestre mexicana mostraron los siguientes resultados, evaluaron la actividad antifungica del extracto de *Lupinus montanus* y lupanina sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, con cuatro concentraciones (0, 150, 300 y 450 ppm) encontrando la mejor respuesta del extracto contra el hongo a 450 ppm, decreciendo el número de las estructuras de reproducción y el crecimiento del hongo; mientras que para lupanina y el extracto a las concentraciones bajas el crecimiento es muy similar al control(Zamora *et al.*,2002)

Otros estudios realizados con Bacterias obtenidas de paja de Lupino amargos y de composta han demostrado que son antagonistas a fitopatógenos de suelo (Gulewicz and Trojanowska, 1995; Czaczyk *et al.*, 2000). Existen antecedentes sobre la estimulación de los extractos de lupino, en el caso de la especie *L. angustifolius* var. *Mírela* que adicionados al medios de cultivo, favorecieron el crecimiento y desarrollo de biomasa del hongo *Fusarium moniliforme* para la producción de ácido giberelico (Stobiecki *et al.*, 1992).

3. MATERIALES Y METODOS:

3.1 Material vegetal para la obtención de extractos

Colecta de semillas de especies de *Lupinus*.

Las semillas utilizadas para la elaboración de los extractos de alcaloides fueron de las especies *L. exaltatus*, *L. montanus* y *L. rotundiflorus* estas se colectaron en Nevado de Colima y el Municipio de Atemajac de Brizuela, Jalisco. Las plantas fueron identificadas taxonómicamente por personal del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara.

3.2 Cuantificación de alcaloides totales.

Esta determinación se realizó por triplicado de acuerdo a la técnica descrita por Wysocka (1989). Las semillas se molieron en un molino marca Willey, pasando por una malla de 1 mm, 50 g de harina seca fue desgrasada con hexano, se tomaron 5 g de harina y se le adicionó 7.5 ml de KOH al 25 % se dejó en reposo durante 3 hrs. La masa alcalinizada se mezcló homogéneamente con 4.5 g de tierras diatomeas y fue transferida a una columna cromatográfica (2.0 cm. de diámetro y 35 cm. de altura) previamente empacada con 2 cm. de arena purificada y 5 g de tierras diatomeas alcalinizadas. Los alcaloides fueron eluidos de la columna utilizando cantidades de diclorometano que fluctuaron de 200 a 350 ml dependiendo de la especie sometida a la extracción (utilizando el reactivo de Dragendorff como indicador de la presencia alcaloides). La fase

orgánica con los alcaloides se recuperó en matraces previamente tarados y se concentró a un volumen de aproximadamente 20 ml que se hicieron pasar por un papel filtro con 1 g de sulfato de sodio (NaSO_4) anhidro. Posteriormente se purificó pasándolo a través de una columna de menor tamaño (1 cm de diámetro y 6 cm de altura) previamente empacada con 0.5 g de arena purificada y 0.5 g de óxido de aluminio (Al_2O_3) neutral (actividad grado III). Finalmente el extracto se concentró a sequedad con un evaporador a vacío y se pesó nuevamente para determinar por diferencia el contenido de alcaloides totales expresado en porcentaje de acuerdo a la siguiente fórmula.

$$\% \text{ total de alcaloides} = \frac{W_f - W_i}{W_x} * 100$$

donde: W_f = Peso final del matraz (g).

W_i = Peso inicial del matraz (g).

W_x = Gramos de muestra (g).

3.3 Preparación de extractos.

Se realizó la extracción de acuerdo con el método de Gulewicz, (1991) el cual consistió en mezclar en un matraz Erlenmeyer de 500 ml 100 gr de harina con etanol al 48% en relación 1:3 (P/V) después de las 72 horas de agitación a temperatura ambiente la mezcla se centrifugó a 3500 rpm separando el sobrenadante (Extracto crudo), posteriormente este se fraccionó mediante lavados con solventes de polaridad creciente (hexano, diclorometano), la fracción de alcaloides se evaporó en rotavapor

para la obtención del extracto rico en alcaloides, guardándose a -4°C hasta su posterior utilización en los experimentos.

3.4 Alcaloides puros

Los alcaloides puros gramina y esparteína, fueron comprados de la marca comercial SIGMA-Aldrich, La esparteína se utilizo en forma de sal y la gramina con una pureza de 99% y al igual que los extractos también fueron pasteurizados de la misma forma

3.5 Aislamiento y multiplicación de los hongos fitopatógenos

Se utilizaron los siguiente hogos *S. rolfsii* aislado de chile, *A. solani* de tallo de jitomate, *R. solani* aislado de papa y *finalmente F. oxysporum* mismo que se aisló de plantas Agave. Las cepas de todos los fitopatógenos se cultivaron en medio papa-dextrosa-agar acidificándolo con ácido láctico al 80%(50 gotas /Lt) (PDAA), las cuales se incubaron a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ los periodos de incubación fueron diferentes para cada hongo, *S. rolfsii*, y *R. solani* 5 días, *A. solani* 6 días s y *F. oxysporum* 8 días.

3.6. Bioensayos

3.6.1 Evaluación de la actividad fungicida de los extractos sobre los hongos.

Para cada especie de hongo se evaluaron cinco concentraciones del extracto 0, 2500, 5000, 7500, 10,000 y 20,000 ppm, tomando al extracto como 100% de concentración de alcaloides, como control positivo se utilizo gramina comercial a 5000 ppm este alcaloide es de origen vegetal y ha sido reportado con actividad fungicida (Muzquiz *et al.*, 1994). Los extractos ricos en alcaloides de cada una de las especies de *Lupinus* previamente pasteurizados se incluyeron en medio papa-dextrosa (PDB)

agitando vigorosamente. El proceso consistió en pesar, disolver el extracto en caldo de papa y pasteurizar (con la finalidad de eliminar microorganismos en el extracto) a 70° C por 30 min. descendiendo la temperatura hasta 4° C, agregando 5 ml de extracto en matraces de 25 ml conteniendo 5ml de medio esterilizado, para un total de 10ml por repetición, cuando la temperatura fue aproximadamente de 50° C, fueron inoculadas con discos de micelio, en activo crecimiento con 5 días de edad, de 5 mm de diámetro y se incubaron en la oscuridad a 25 ± 2° C, con agitación orbital constante a 100 rpm, los periodos de incubación variaron de acuerdo al hongo utilizado. Después de los días de incubación se determino el peso seco del micelio.

3.6.2 Evaluación de la actividad fungicida de la Esparteína sobre los hongos.

Para cada especie de hongo se evaluaron tres concentraciones de esparteína 0, 10,000, 20,000 y 30,000 ppm, como control positivo se utilizo gramina comercial a 5000 ppm alcaloide de origen vegetal con actividad fungicida. La Esparteína previamente pasteurizada se incluyo en medio papa-dextrosa (PDB) agitando vigorosamente. El proceso consistió en pesar, disolver la esparteína en caldo de papa y pasteurizar (con la finalidad de eliminar microorganismos en el alcaloide) a 70° C por 30 min. descendiendo la temperatura hasta 4° C, agregando 5 ml de cada una de las concentraciones de esparteína en matraces de 25 ml conteniendo 5ml de medio esterilizado, para un total de 10 ml por repetición, cuando la temperatura fue aproximadamente de 50° C, fueron inoculadas con discos de micelio, en activo crecimiento con 5 días de edad, de 5 mm de diámetro y se incubaron en la oscuridad a 25 ± 2° C, con agitación orbital constante a 100 rpm, los periodos de incubación variaron de acuerdo al

hongo utilizado. Después de los días de incubación se determino el peso seco del micelio.

3.7 Diseño Experimental

Los extractos, esparteína y las diferentes concentraciones que se probaron para la inhibición de los hongos se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Tratamientos utilizados para la inhibición del crecimiento micelial de hongos fitopatógenos.

Tratamientos	Concentraciones (ppm)	Fitopatógenos
<i>L.exaltatus</i>	0, 2,500, 5,000, 7,500, 10,000,	<i>S. rolfsii</i> , <i>R. solani</i> , <i>A.</i>
	20,000 y gramina (control positivo)	<i>solani</i> y <i>F. oxysporum</i>
<i>L.rotundiflorus</i>	0, 2,500, 5,000, 7,500, 10,000,	<i>S. rolfsii</i> , <i>R. solani</i> , <i>A.</i>
	20,000 y gramina (control positivo)	<i>solani</i> y <i>F. oxysporum</i>
<i>L. montanus</i>	0, 2,500, 5,000, 7,500, 10,000,	<i>S. rolfsii</i> , <i>R. solani</i> , <i>A.</i>
	20,000 y gramina (control positivo)	<i>solani</i> y <i>F. oxysporum</i>

El experimento se condujo bajo un diseño completamente al azar; con 3 tratamientos, 6 concentraciones y tres repeticiones; además se determinó el porcentaje de inhibición calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{Ca - Ta}{Ca} * 100$$

Donde:

Ca = Peso seco en el testigo después de la incubación

Ta = Peso seco en el tratamiento después de la incubación

3.8 Análisis estadísticos

Se aplicó un análisis de varianza ANOVA y comparación de medias por Tukey's ($\alpha=0.05$) y ($\alpha=0.01$), utilizando el Programa Estadístico Minitab.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Concentración de alcaloides.

La concentración total de alcaloides de las tres especies de *Lupinus* en estudio se muestra en el Cuadro 2. El contenido de alcaloides en las tres especies varió de 1.84 a 2.42 %, valores que se encuentran entre los rangos reportados por la literatura, así por ejemplo Kurlovich *et al.*, (2000) y Muzquiz *et al.*, (1994) señalaron que en semillas de *Lupinus* el contenido de alcaloides fluctúa desde 0.02 % en variedades dulces y domesticadas; hasta un 5% en especies silvestres; el mayor contenido de estos metabolitos se encontró en *L. rotundiflorus* (2.42%) y el menor en *L. montanus* (1.84 %).

Cuadro 2. Porcentaje total de alcaloides en 3 especies de *Lupinus* silvestres.

Especie	Porcentaje total de alcaloides*
<i>L. exaltatus</i>	1.93±0.023
<i>L. rotundiflorus</i>	2.42±0.061
<i>L. montanus</i>	1.84±0.064

* Promedio de tres repeticiones ± error de la media

Una tendencia similar fue reportada por Przybylak *et al.* (2004) en estas especies pero con mayor concentración de alcaloides (3.5 y 2.6 % respectivamente). Esta variación en la concentración de alcaloides dentro de una misma especie se debe probablemente a diferencias en las condiciones climáticas (precipitación, luz, temperatura, etc.) entre sitios y fechas de colecta. La determinación del contenido de alcaloides por el método gravimétrico, es catalogado como el mejor para la extracción de alcaloides (Wysocka, 1989). De acuerdo a estudios previos, entre los alcaloides mayoritarios de las especies de *L. exaltatus*, *L. montanus* y *L.*

isolupanina, 13-hidroxilupanina, esparteína, epiafilina (Przybylak *et al.*, 2003).

4.2. Efecto del extracto sobre los hongos.

4.2.1. Extracto de *L. exaltatus*

El análisis de varianza para el peso seco del micelio obtenido de los hongos en estudio presentó diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) por efecto de las concentraciones evaluadas del extracto de *L. exaltatus*. El peso promedio del micelio obtenido en las diferentes concentraciones se muestra en el Cuadro 3. En este cuadro se puede observar que el peso del micelio de *S. rolfsii* y *A. solani* en todas las concentraciones fue menor al que se registro en el testigo, pero sin diferencias significativas entre las concentraciones. Esta concentración (2500 ppm) representó un porcentaje de inhibición de casi un 100% para *S. rolfsii* y 67% para *A. solani*, (Figura 3), mientras que para *R. solani* solo las concentraciones de 10,000 y 20,000 ppm mostraron una inhibición casi del 100%; no así para *F. oxysporum* que solo mostró inhibición del crecimiento a la concentración de 20,000 ppm. Estos resultados indican que el extracto *L. exaltatus* tiene un efecto superior al que se ha reportado con el extracto obtenido de *L. angustifolius* var. Mirela ya que solo mostró actividad fungistática contra los hongos, *R. solani* y *A. solani*, (Sas-piotrowska *et al.*, 1996), al igual que ha ocurrido en otros estudios con diferentes especies de *Fusarium*; *F. oxysporum* mostró menor susceptibilidad al extracto ya que solo con la concentración de 20,000 ppm se observó un efecto inhibitorio (Zamora *et al.*, 2002; Gulewicz K. & Trojanowska K., 1995). Resultados obtenidos por Arias *et al.*, (2000) para *Fusarium* sp. aislado de *Agave* var. Azul con los extractos de *L. exaltatus* y *L. montanus*, donde mostraron que el extracto que muestra mayor actividad es *L. montanus* a diferencia de *L. exaltatus* que estimula el crecimiento del hongo.

Cuadro 4. Inhibición *in vitro* del peso seco del micelio de diferentes fitopatógenos con extracto de *L. exaltatus*.

Concentraciones ppm	Peso seco del micelio (g) *			
	<i>S. rolfsii</i> +	<i>A. solani</i> ^	<i>R. solani</i> +	<i>F. oxysporum</i> ⌘
Gramina	0.0028 b*	0.0135 b	0.0003 d	0.0082 b
0	0.0746 a	0.0374 a	0.0604 a	0.0417 a
2500	0.0061 b	0.0179 b	0.0419 b	0.0671 a
5000	0.0066 b	0.0138 b	0.0368 b	0.0581 a
7500	0.0140 b	0.0105 b	0.0366 b	0.0615 a
10000	0.0070 b	0.0110 b	0.0039 c	0.0322 a
20000	0.0041 b	0.0093 b	0.0041 c	0.0069 b

*Promedio de tres repeticiones; Periodos de incubación: +5 días; ^ 6 días; ⌘8 días. ** Tukey's ($\alpha=0.01$)

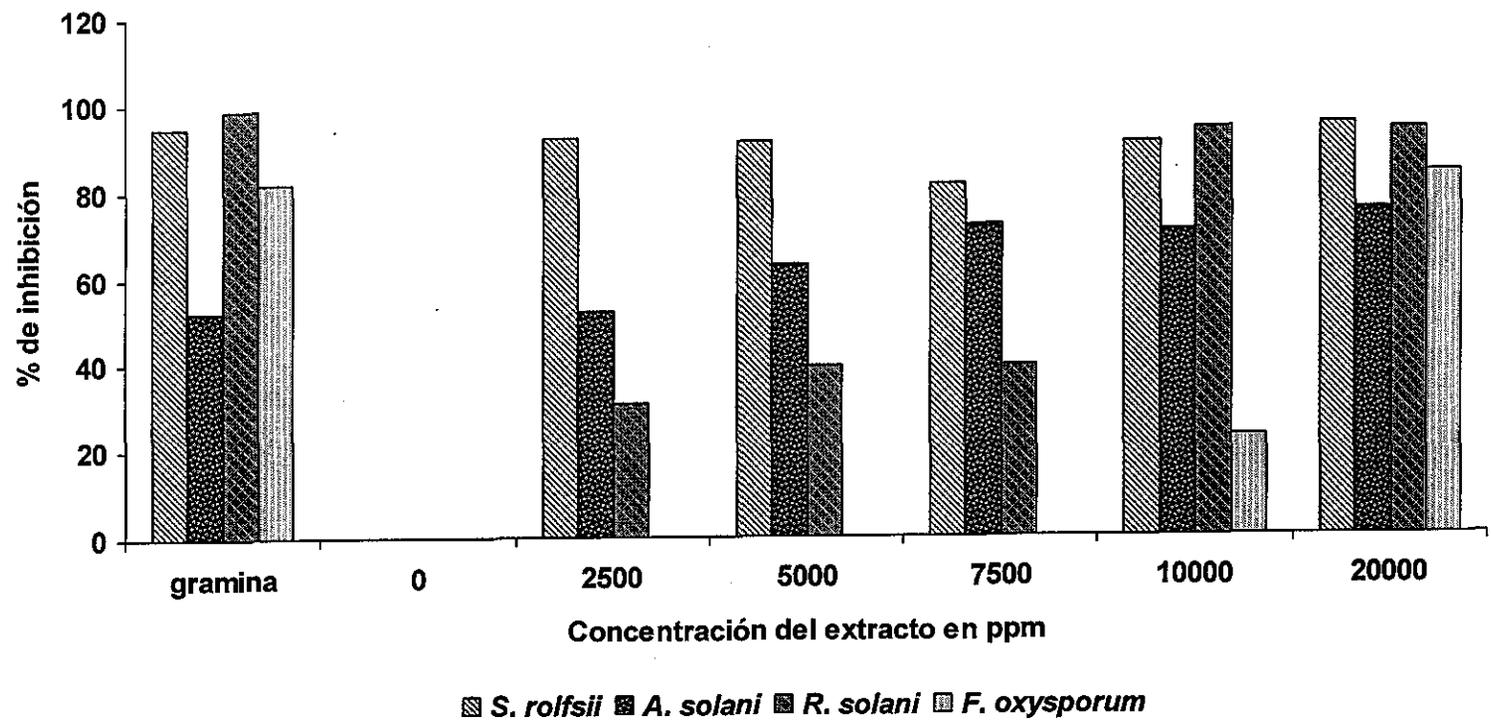


Figura 3. Porcentaje de inhibición *in vitro* del extracto de *L. exaltatus* sobre el peso seco del micelio de diferentes

Además sus porcentajes de inhibición son menores, comparando las concentraciones equivalentes a las utilizadas en esta investigación a los resultados obtenidos en este trabajo; aunque su técnica de extracción de alcaloides fue alcalina y no etanólica como la aquí descrita, de acuerdo a Muzquiz *et al.*, (1994) comprobando que la extracción etanólica mantiene su acción biológica al no modificar las estructuras de los alcaloides conservando su propio anión (Ciesiolka *et al.*, 1988). Y así ser una alternativa atractiva de productos naturales químico-biológicos para el control de hongos fitopatógenos, por su acción biológica y su carácter inocuo sobre el ambiente (Kloepper, 1999).

4.2.2. Extracto de *L. rotundiflorus*

Con el extracto de *L. rotundiflorus*, se observaron diferencias significativas en la inhibición de *S. rolfsii*, *R. solani*, *A. solani* ($p < 0.01$), no así para *F. oxysporum*; en las concentraciones evaluadas la inhibición del micelio (Cuadro 5), sobre *R. solani* resultó ser el hongo más susceptible al extracto de *L. rotundiflorus* (2500 ppm) mostrando un comportamiento uniforme con la mayoría de las concentraciones evaluadas, al observar que el peso promedio del micelio en todas las concentraciones fue menor al testigo, sin diferencias entre estas, representando un porcentaje de inhibición de casi el 100% (Figura 4). Para el caso de *S. rolfsii* con el extracto de *L. rotundiflorus* se encontró diferencias entre las concentraciones con respecto al testigo mostrando un porcentaje de inhibición casi del 100% desde 7500 ppm. Sin embargo para *A. solani* y *F. oxysporum* el extracto de *L. rotundiflorus* no mostró una actividad de inhibición significativa, para *A. solani* solo hay diferencia en la concentración de 20,000 ppm, ya que estimuló el crecimiento significativamente de este hongo.

Estos resultados confirman que las especies silvestres de Jalisco mostraron mayor actividad que algunas de las especies amargas más estudiadas en Europa, esto se puede deber a que el contenido de alcaloides es menor en las especies europeas; algunos estudios en *L. angustifolius* var. *Mirela* y *L. luteus* muestran que su contenido de alcaloides es menor (Ciesiolka *et al.*, 1988) a las especies silvestres mexicanas.

Cuadro 5. Inhibición *in vitro* del peso seco del micelio de diferentes fitopatógenos con extracto de *L. rotundiflorus*.

Concentraciones ppm	Peso seco del micelio (g)			
	<i>S. rolfsii</i> ⁺	<i>A. solani</i> [^]	<i>R. solani</i> ⁺	<i>F. oxysporum</i> [✕]
Gramina	0.0028 c	0.0135 c	0.0003 c	0.0082 b
0	0.0746 a*	0.0374 a	0.0604 a	0.0417 a
2500	0.0409 a	0.0299 a	0.0022 b	0.0496 a
5000	0.0132 b	0.0294 a	0.0022 b	0.0316 a
7500	0.0018 c	0.0287 a	0.0046 b	0.0439 a
10000	0.0028 c	0.0268 a	0.0011 b	0.0416 a
20000	0.0031 c	0.0545 b	0.0010 b	0.0430 a

*Promedio de tres repeticiones; Periodos de incubación: +5 días; ^ 6 días; ✕8 días. ** Tukey's ($\alpha=0.01$)

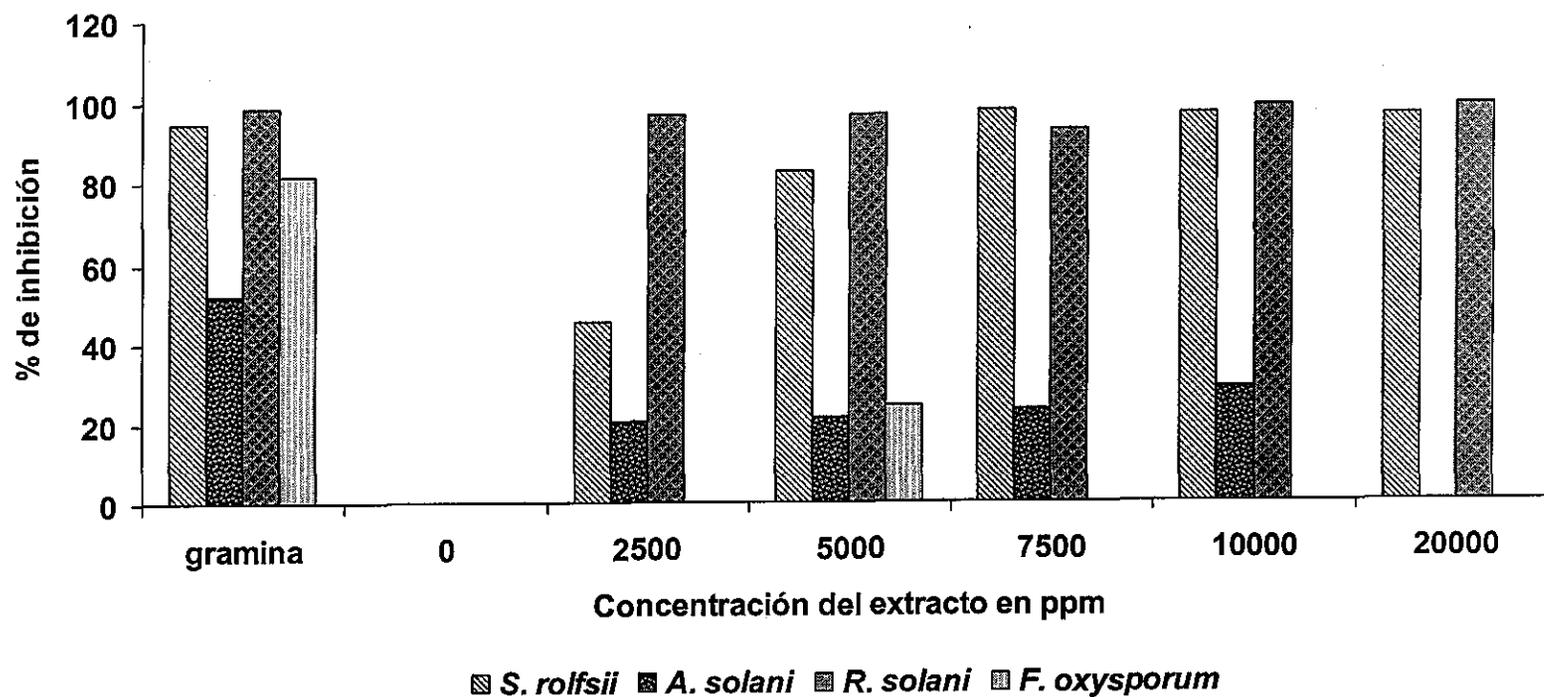


Figura 4. Porcentaje de inhibición *in vitro* del extracto de *L. rotundiflorus* sobre el peso seco del micelio de diferentes hongos fitopatógenos.

4.2.3. Extracto de *L. montanus*

Respecto al extracto de *L. montanus*, este mostró diferencias altamente significativas para *S. rolfsii*, *A. solani*, *R. solani* y al igual que con *L. rotundiflorus* para *F. oxysporum* no mostró significancia. La inhibición del micelio con *L. montanus*, mostró para *S. rolfsii* y *R. solani* que el peso seco del micelio en todas las concentraciones fue menor al testigo, sin diferencias significativas entre las concentraciones (Cuadro 6); dando un porcentaje de inhibición de casi el 100% para *S. rolfsii* (Figura 5) y solo un efecto mínimo inhibitorio para *R. solani*; en el caso de *A. solani* solo mostró un efecto de inhibición del crecimiento en la concentración de 20,000 ppm, este extracto también estimuló el crecimiento de *F. oxysporum*.

El hecho de que los extractos de *L. exaltatus* y *L. rotundiflorus* mostraron mayor actividad en la inhibición del crecimiento micelial se debió probablemente al conjunto de alcaloides mezclados en estas especies, ya que cuatro de los alcaloides presentes en *L. rotundiflorus*, lupanina, epiafilina, α -isolupanina, 3β -hidroxilupanina, se encuentran en *L. exaltatus*, variando las concentraciones en cada especie, además *L. exaltatus* presenta más alcaloides como afilina y 11,12-dehidrolupanina, mientras que la composición del extracto obtenido de *L. montanus* es muy diferente en concentración y composición de alcaloides (Przybylak *et al.*, 2003), pero antecedentes de De la Cuadra *et al.*, (1992) donde prueba los alcaloides puros gramina, lupanina y esparteína encontraron que la gramina presenta una mayor actividad fungicida al actuar contra los cuatro hongos, sin embargo esparteína inhibe el crecimiento de los hongos *Phytium aphanidermatum* y *Botrytis cinerea* desde 5 mM hasta 40 mM; a diferencia de la lupanina que estimula el crecimiento de los hongos.

Cuadro 6. Inhibición *in vitro* del peso seco del micelio de diferentes fitopatógenos con extracto de *L. montanus*.

Concentraciones ppm	Peso seco del micelio (g)			
	<i>S. rolfsii</i>	<i>A. solani</i>	<i>R. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>
Gramina	0.0028 b	0.0135 b	0.0003 c	0.0082 b
0	*0.0746 a	0.0374 a	0.0604 a	0.0417 a
2500	0.0246 b	0.0525 a	0.0444 b	0.0388 a
5000	0.0121 b	0.0503 a	0.0371 b	0.0452 a
7500	0.0271 b	0.0554 a	0.0361 b	0.0506 a
10000	0.0243 b	0.0577 a	0.0430 b	0.0441 a
20000	0.0064 b	0.0141 b	0.0317 b	0.0492 a

*Promedio de tres repeticiones; Periodos de incubación: +5 días; ^ 6 días; x8 días. ** Tukey's ($\alpha=0.01$)

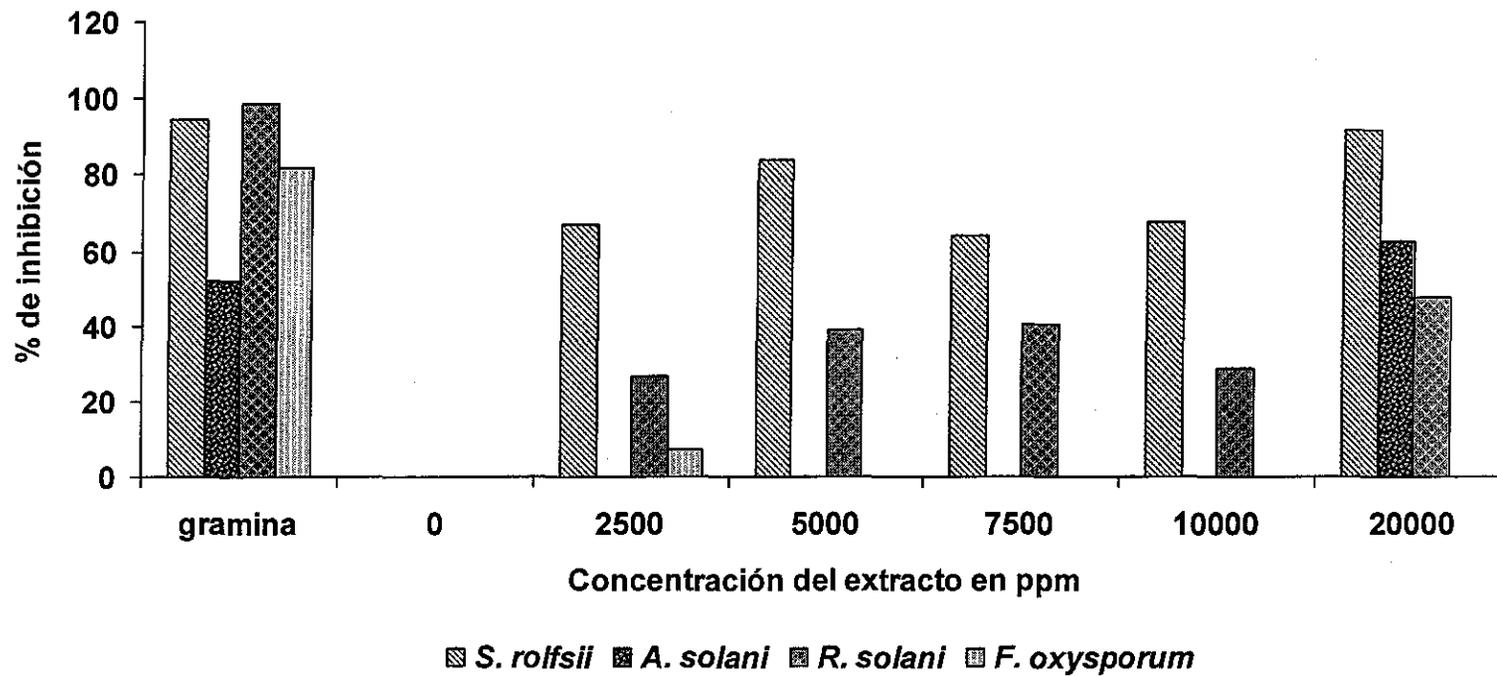


Figura 5. Porcentaje de inhibición *in vitro* del extracto de *L. montanus* sobre el peso seco del micelio de diferentes hongos fitopatógenos.

4.3. Efecto de la esparteína sobre los hongos.

En el Cuadro 7 podemos observar que la esparteína solo muestra actividad significativa ($p < 0.05$) contra *R. solani* entre 10,000 y 20,000 ppm, con respecto al testigo, con una inhibición en el crecimiento del micelio de 45 % (Figura 6); respecto a *S. rolfsii* y *A. solani* este alcaloide puro estimulo el crecimiento, si comparamos con estudios realizados anteriormente por De la Cuadra *et al.*, (1992) donde la esparteína si mostró mayor actividad con concentraciones desde 5 mM a 40 mM afectando el crecimiento del micelio de los hongos *Fusarium solani*, *Fusarium avenaceum*, *Pythium aphanidermatum* y *Botritis cinerea*. Estas concentraciones son más bajas que las utilizadas en el presente trabajo, con esto podemos observar que la interacción de los alcaloides para con cada especie de hongo es muy variable.

Cuadro 7. Inhibición *in vitro* del peso seco del micelio de hongos fitopatógenos con Esparteína.

Concentraciones		Peso seco del micelio (g)			
ppm	<i>S. rolfsii</i>	<i>A. solani</i>	<i>R. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	
Gramina	0.0028 b	0.0135 b	0.0003 c	0.0082 b	
0	*0.0746 a	0.0374 a	0.0604 a	0.0417 a	
10000	0.1147 a	0.0550 a	0.0408 b	0.0354 a	
20000	0.0904 a	0.0829 a	0.0327 b	0.0416 a	
30000	0.1255 a	0.1057 a	0.0337 b	0.0437 a	

*Promedio de tres repeticiones; Periodos de incubación: +5 días; ^ 6 días; x8 días. ** Tukey's ($\alpha=0.01$)

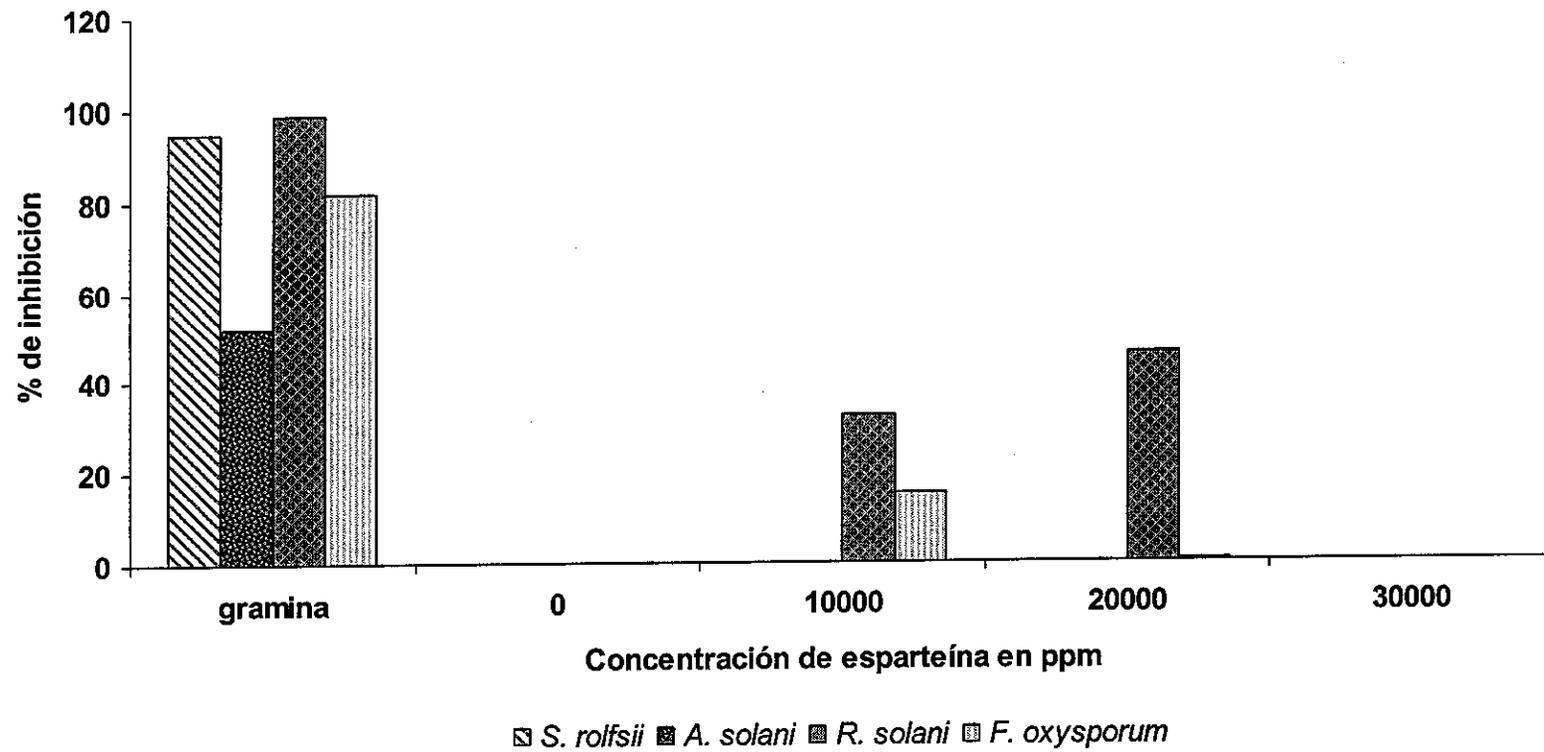


Figura 6. Porcentaje de inhibición *in vitro* de esparteína sobre el peso seco del micelio de diferentes hongos fitopatógenos.

5. CONCLUSIONES

El hongo más susceptible fue *S. rolfsii* a las tres especies de Lupinos en casi todas las concentraciones, seguido de *R. solani*. La menor actividad de las tres especies de *Lupinus* se presentó con *A. solani* seguido por *F. oxysporum*.

El extracto con mayor actividad fungicida de las tres especies fue *L. exaltatus* para los cuatro hongos, seguido por *L. rotundiflorus*.

La mayoría de los extractos mostraron actividad fungicida significativa en la concentración de 2500 ppm sobre *S. rolfsii*.

En el caso de *R. solani* fue inhibido casi al 100 % con 10,000 ppm con el extracto de *L. exaltatus*, a diferencia de *L. rotundiflorus* que inhibió desde 2500 ppm cerca de un 100 % a este mismo hongo, sin embargo con el extracto de *L. montanus* no mostró actividad fungicida importante para *R. solani*.

Para el hongo *A. solani* solo el extracto de *L. exaltatus* mostró actividad significativa a 2500 ppm, seguido de *L. montanus* a 20,000 ppm y *L. rotundiflorus*, estimuló el crecimiento del hongo.

Para el caso de la esparteína podemos concluir que a dosis altas (10,000, 20,000 y 30,000 ppm) la esparteína estimula el crecimiento de los hongos en estudio.

Estos resultados preliminares de las tres especies silvestres de *Lupinus* y el alcaloide puro (esparteína) nos llevan a otras líneas de investigación para definir probar aislar los alcaloides puros que no son comerciales y se encuentran presentes en los Lupinos, además directrices futuras busquen la actividad *in vivo* de los componentes más activos en condiciones de campo. Con esto concluir que no todas las especies de hongos pueden ser susceptibles a los extractos de las diferentes especies de *Lupinus*, al igual que para la esparteína.

6. REVISION DE LITERATURA

- Alabouvette C. L. 2000. Biological control of plant diseases and the environment. Symposium on plant protection and the environment: pesticides and their alternatives. Rehovot, Israel. *Phytoparasitica*. 28:2.
- Aniszewski T. 1994. The biological basis of quinolizidine alkaloids. *The Science of Legumes*. 1:1-24.
- Arías G. A., García L. P., Ruiz L. M., Pineda J. B. & Monteon J. A. 1999. Fungicide effect of Mexican alkaloid lupin extracts. In: Abstract 9th International. Lupin Conference. Klink/Müritz. Alemania. pp.11-12.
- Aykoryd W. R. 1964. Las leguminosas en la Alimentación Humana. FAO. ROMA. pp. 9-14
- Bermúdez T. K., Robledo N., Martínez J., Tei A. & Wink M. 1999. Biodiversity of the genus *Lupinus* in México. In: *Lupin, an Ancient Crop for the New Millennium*. Proceedings of the 9th International Lupin Conference. E. van Santen, M. Wink, S. Weissmann & P. Roemer (Eds). June 20-24. Klink/Müritz, Germany.
- Bravo L. L., Bermúdez T. K. & Montes B. R. 1998. Inhibición del crecimiento micelial y esporulación de *Fusarium moniliforme* Sheld mediante aceites esenciales vegetales y algunos de sus componentes químicos. *Revista Mexicana. Fitopatología*. 16 (1):18-23.
- Carpinella C. M., Giorda M. L., Ferrayoll G. C. & Palacios M. S. 2003. Antifungal effects of different organic extracts from *Melia azederach* L. on phytopathogenic fungi and their isolated active components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Vol. 51:2506-2511.

- Ciesiolka D., Kolanowska A., Markiewicz M., Michalski Z., Peretiatkowicz M., Wojtaszek P., Gulewicz K. 1988. A new approach to the debittering of bitter lupine seeds. *Bulletin of Polish Academy of Biological Sciences* 36:1-3:23-33.
- Cubero J. I. & T. Moreno. 1983. *Leguminosas de grano*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. pp.12-19
- Cwojdzinski W., Michalski Z., Nowak K. & Gulewicz K. 1991. Studies on the influence of bitter lupine extract on the yield of different cultivated plants. *Lupin NewsLetter* 14:46-54.
- Cwojdzinski W., Michalski Z. & Gulewicz K. 1989. The estimation of nutritive value of protein obtained from plant treated with lupin extract. *Lupin NewsLetter* 13:59-65.
- Czaczyk K., Stachowiak B., Trojanowska K. & Gulewicz K. 2000. Antifungal activity of *Bacillus* sp. Isolated from compost *Folia Microbiology*. 45(6), 552-554.
- De La Cuadra C., Tello J. C., Muzquiz M. & Calvo R. 1994. Poder fungicida *in vitro* de esparteína y gramina, alcaloides del lupino amargo. *Studia Botanica* 1 3:99-101.
- De La Cuadra C., Tello J. C., Muzquiz M. & Calvo R. 1992. Antifungal Effect of quinolizidine alkaloids from *Lupinus* spp. 1^{er} Conference Europeenne on Grain Legumes. Sur Les Proteagineux. Angers, France. p 341-342.
- De La Vega R., Gutiérrez M. P., Sanz C., Calvo R., Robredo L. M., De La Cuadra C. & Muzquiz M. 1996. Bactericide like effect of *Lupinus* alkaloids. *Industrial Crops and Products*. Vol. 5(2) pp. 141-148.
- De Luca V. & Laflamme P. 2001. The expanding universe of alkaloid biosynthesis. *Plant Biology*. 4:225-233.

- Dunn D. B. 1979. *Lupinus* In: Flora fanerogamica del Valle de México. Rzedowski J. & Rzedowski G. C. (eds.) p. 326-328. México, D. F.
- Gaugler R. 1997. Alternative paradigms for commercializing biopesticides. *Phytoparasitica*. 25:3.179-182.
- Grainge M. & Ahmed. 1988. S. Handbook of plants with pest control properties. John Wiley. p. 470.
- Gross R. 1982. El cultivo y utilización del tarwi *Lupinus mutabilis* Sweet. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. 141-197.
- Gross R. 1986. Lupins in the old and new world. A biological culture coevolution. Proceedings. IV International. Lupine Conference. Geraldton, Western Australia. Pp. 244-277.
- Gross R. y E. V. Baer. 1977. Posibilidad del *Lupinus mutabilis* y *Lupinus albus* en los países andinos. *Arch. Latinoam Nutr.* 2: 451-467.
- Gulewicz K. 1991. Method of lupin seeds debittering. Polish patent no. 1527438.
- Gulewicz K., Trojanowska K. 1995. Suppressive effect of preparations obtained from bitter Lupin straw against plant pathogenic fungi. *The Science of Legumes* 2:141-148.
- Gullino L. M., Leroux P. & Smith M. C. 2000. Uses and challenges of novel compounds for plant diseases control. *Crop Protection*. 19: 1-11.
- Hatzold T., I. Elmedfa, R. Gross, M. Wink, T. Hartmann and L. Witte. 1983. Quinolizidine alkaloids in seeds of *Lupinus mutabilis*. *J. Agric. Food Chem.* 31: 934-938.
- Hostettmann K. & Wolfender J. L. 1997. The search for biologically active secondary metabolites. *Pesticide Science*. 51:471-482.

- Jiménez S. 1982. Formas de utilización del tarwi. En: Memorias del Tercer Congreso Internacional de Cultivos Andinos, IBTA, CIID. La Paz, Bolivia.
- Juárez S. 1982. Formas de utilización del tarwi. En: Memorias del Tercer Congreso Internacional de Cultivos Andinos, IBTA, CIID. La Paz, Bolivia.
- Karara A. H. 1987. An efficient method for the extraction of alkaloids from bitter Lupin seed. *Fat Science Technology*.89:11.
- Katan J. 2000. Physical and cultural methods for the management of soil-borne pathogens. *Crop Protection* 19:725-731.
- Kinghorn D. A., Selim M.A. & Smolenski S.J. 1980. Alkaloid distribution in some new world *Lupinus* species. *Phytochemistry*. 19:1705-1710.
- Kleopfer W. J. 1999. Visión general de las bacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPR) y control de enfermedades. Memoria del IX Congreso Nacional de Productores de papa. León, Guanajuato. México.
- Kurlovich, B. S., Heinänen, J., Kartuzova, L. T., Benken, I., Chmeleva, Z. V., Bernatskaya, M. L. 2003. Diversity of lupin (*Lupinus* L.) based on biochemical composition. *Plant Genetic Resources Newsletter*. 134:42-57.
- López B. L., & Fuentes G. M. 1991. El altramuz. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Córdoba, España. 48-57
- Mankinen C. B., Herding J. & Elliot M. 1975. Genetics of *Lupinus* VIII. Variations in the occurrence of alkaloids in natural populations of *Lupinus nanus*. *Taxonomy*. 24(4):425-429.
- Martínez, A. M. 1991. Cinco familias de plantas con potencial económico y genético para México. En: Avances en el estudio de los

recursos fitogenéticos de México. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A. C. Chapingo, México. pp. 53-62.

- McVaugh, R. 1987. Flora novogaliciana.. A descriptive account of the vascular plants of western Mexico. Vol. V. leguminosae *Ann Arbor the University of Michigan Press*. USA.
- Meazza G., Dayan E. F. & Wedge E. D. 2003. Activity of quinonas on *Colletotrichum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Vol. 51:3824-3828.
- Michalski Z., Gromadzinski A., Markiewicz M. & Gulewicz K. 1996. The effects of lupin extracts of varied chemical composition on the yield of *Lupinus angustifolius*. *Lupin NewsLetter* 9:32-37.
- Montes-Belmont R. 1996. Productos naturales de origen vegetal para el combate de fitopatógenos. *Revista Mexicana. Fitopatología*. 14 (1):9-14.
- Muzquiz, M. 1988. Factores Antinutritivos y tóxicos que afectan a la utilización de las Semillas del *Lupinus hispanicus* Boiss et Reut para uso Alimentario. Tesis Doctoral. Madrid, España. 333 p.
- Muzquiz, M. & De la Cuadra C. 1988. Antigermination capacity of *Lupinus* (L.) alkaloids. In: *Proceedings 5th International Lupin Conference*. Poznan, Poland.
- Muzquiz M., Rodenas I., Villaverde J. & Casinello M. 1982. Valoración cuantitativa de los alcaloides en semillas del género *Lupinus*. L. En: *Actas. II Conferencia Internacional del Lupino*. Madrid, España. pp.191-195.
- Muzquiz M., De La Cuadra C., Cuadrado C., Burbano C. & Calvo R. 1994. Herbicide-like effect of *Lupinus* alkaloids. *Industrial Crops and Products* 2: 273-280.
- Muzquiz M., De la Vega R., Gutiérrez P., Calvo M., Robredo M. & De la Cuadra C. 1996. Bactericide Effect of alkaloids present in

Lupinus. Proceedings 8th International Lupin Conference. U.S.A. pp. 540-544.

- Peretiatkowicz M., Ciesiolka D., Stobiecki M. & Gulewicz K. 1994. Biological activity of extract from bitter lupin seeds. In: Advances in Lupin Research. Proc. VIIth Inter. Lupin Conf. Evora, Portugal. pp. 197-200.
- Pichersky E. & Gang R. D. 2001. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. Trends in Plant Science. 5 (10): 439-445.
- Pitarrokili D., Tzakou O., Loukis A. & Harvala C. 2003. Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in soilborne pathogens. Journal of Agricultural and Food Chemistry Vol. 51:3294-3301.
- Planchuelo, A. M. 1994. Wild lupins distribution and its implication as germoplasm resources. In: Advances in Lupin Research. Proc. VIIth Inter. Lupin Conf. Evora, Portugal. pp. 65-68.
- Prizbylak K. J., Ciesiolka D., Wysocka W. García L. P. M., Ruiz L. M. A. & Gulewicz K. 2004. Alkaloid profiles of Mexican wild lupin and an effect of alkaloid preparation from *Lupinus exaltatus* seeds on growth and yield of paprika (*Capsicum annuum* L.) Industrial Crops and Products. En Prensa.
- Rice M. J. Legg M. & Powell A. K. 1998. Natural Products in agriculture-A view from the industry. Pesticide Science. 52:184-188.
- Ruiz M. J. J., Ruiz M. A. & Zamora J. F. 1999. The genus *Lupinus*: taxonomy and distribution in Jalisco, México. p. 297-300. In: Lupin, an Ancient Crop for the New Millennium. Proceedings of the 9th International Lupin Conference. E. van Santen, M. Wink, S Weissmann & P. Roemer (Eds). June 20-24. Klink/Müriz, Germany.

- Rzedowski J. & G. Calderón. 1979. Flora fanerogámica del Valle de México. Vol. I. Editorial C.E.C.S.A. México. pp. 326-338.
- Salustio J & A. Troncoso. 1982. Alcaloides del *Lupinus mutabilis* como pesticida. En: Actas. II Conferencia Internacional del Lupino. Madrid, España. pp. 258-260.
- Sánchez S. O. 1979. *Lupinus* L. In: Flora del Valle de México. Editorial La Prensa. p. 208-209. México, D. F.
- Santana C. F. M., Pinto T., Fialho M. A., Correia S. I. & Empis A. J. M. 2002. Bacterial removal of quinolizidine alkaloids and other Carbon sources from a *Lupinus albus* aqueous extract. Journal of Agricultural and Food Chemistry Vol. 50:2318-2323.
- Sas-Piotrowska B., Aniszewski T., Gulewicz K. 1997. Evidence for fungistatic activity of some preparations from alkaloid-rich lupin seeds on potato pathogenic fungi. Bulletin of Polish Academy of Biological Sciences 44:1-2:41-47.
- Simmonds N. W. 1976. Evolution of crop plants. Published by Longman Inc. New York. EUA. pp. 15-19.
- Stobiecki M., D. Ciesiolka, M. Peretiatkowicz, and K. Gulewicz. 1993. Phenolic compounds isolated from bitter lupine seeds and their inhibitory effects on germination and seedling growth of lettuce. Journal of Chemical Ecology, Vol. 19, No. 2.
- Stobiecki M., M. Markiewicz., M. Zbigniew, K. Gulewicz. 1992. New Concept of Bitter Lupin Seeds Utilization. In: Proceedings. 1er. European Conference on Grain Legumes. Francia. pp. 423-424.
- Swiecicki W. & K. Jach. 1980. Variation and evolution of alkaloid complex in yellow lupine (*Lupinus luteus* L.) during domestication. Act Bot. 33: 177-195.
- Szczawinska K., K. Bobkiewicz., K. Kozaryn., M. Peretiatkowicz & K. Gulewicz. 1994. Some pharmacological properties of an extract from bitter Lupin (*L. angustifolius*) seeds. In: Advances in

- Lupin Research. Proceedings. VII International Lupin Conference. Evora, Portugal 18-23 april 1993. pp 201-203.
- Takhtajan A. 1987. *Systema magnoliophytorum*. Officina editora Nauka. Sectio Leninopolitana. Leninopoli, Russia.
- Tyski S., Markiewicz M., Gulewicz K. & Twardowski T. 1988. The effect of lupin alkaloids and ethanol extracts from seeds of *lupinus angustifolius* on selected bacterial strains. *Journal Plants Physiology*. Vol. 133. pp. 240-242.
- Villalobos P. M. 1996. Plaguicidas naturales de origen vegetal: Estado actual de la investigación. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentación (INIA). Madrid, España. p. 37
- Wall R. E. 2000. Perceptions of biological controls. *Phytoparasitica*. 28(1):3-5.
- Wang S. F., Liu a. y., Ridsdill S. & Ghisalberti E. L. 2000. Role of alkaloids in resistance of yellow lupin to red-legged earth mite *Halytides destructor*. *Journal of Chemical Ecology*. 26(2): 429-441.
- Wheeler W. B. 2002. Role of research and regulation in 50 years of pest management in agriculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Vol. 50:4151-4155.
- Wilkinson M. J, Hipwell M., Ryan T. & Cavanagh A. H. M. 2003. Bioactivity of *Backhousia citriodora*: Antibacterial and Antifungal Activity *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Vol. 51: 76-81.
- Wink M., & T. Hartmann 1982. Localization of the enzymes of quinolizidine alkaloid biosynthesis in leaf chloroplasts of *Lupinus polyphyllus*, *Plant Physiol*. Vol. 70: 767-775.
- Wink M. 1993. Quinolizidine alkaloids. In *Methods in plant biochemistry*. Ed. Academic press. Vol. 8:197-239.

- Wink M. 1994. Biological Activities and Potential Applications of Lupin Alkaloids. In: Advances in Lupin Research. Proceeding. VII Inter Lupin Conference. 161-178 Evora, Portugal 18-23.
- Wink M., C. Meißner. & L. Witte. 1995. Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. *Phytochem.* 1 (38): 139-153
- Wink M. 1998. Modes of action of alkaloids. Chap 12. In: Alkaloids. Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications. Edited by Roberts M.F. and Wink M. Plenum Press, New York.
- Wysocka W., Brukwicki T., Jaloszynski R. & Hoffmann K. 1989. A new and efficient method of extraction of alkaloids form Lupin seed *Lupin NewsLetter* 13:59-65.
- Wysocki W., Gulewicz P., Aniszewski, T., Ciesiolka D. Gulewicz K. 2001. Bioactive preparations from alkaloid-rich lupin. Relation between chemical composition and biological activity. *Bulletin of Polish Academy of Biological Science*. Vol. 49 No. 2.
- Zamora N: F., Virgen C. G., Bernal A. A., Faust G. S. & Ruiz L. M. 2002. *In vitro* antifungal of *lupinus montanus* extract and lupanine on *fusarium oxysporum* f. sp *melonis*. In Abstract Book. Tenth International Lupin Conference. Laugarvatn, Iceland, June 19-24.
- Zhao G. B. 1999. Nematicidal activity of quinolizidine alkaloids and the functional group pairs in their molecular structure. *Journal of Chemical Ecology*. Vol.25 No. 10:2205-2214.