



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

“Potencial de plantas productoras de aleloquímicos con aplicación
plaguicida en cultivos de jitomate en el estado de Tlaxcala”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en B. MARIANA MIRANDA ARÁMBULA

TUTOR: DR. RICARDO REYES CHILPA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ANA LUISA ANAYA LANG
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM.

DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

Ciudad Universitaria, CD. MX., Diciembre

2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado

Presidente: Dr. Mario Alberto Serrano Ortega

Secretario: Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Vocal: Dr. Víctor Luis Barradas Miranda

Vocal: Dra. María del Rocío Cruz Ortega

Vocal: Dra. Alejandra Rojas Molina

Tutor:

Dr. Ricardo reyes Chilpa

Sustentante:

M. en B. Mariana Miranda Arámbula

El presente trabajo de tesis fue realizado en la
Universidad Nacional Autónoma de México en:

Instituto de Química de la U.N.A.M.; Departamento de
Productos Naturales

Con la dirección del
Dr. Ricardo Reyes Chilpa

y en el

Instituto de Ecología de la U.N.A.M, Departamento de
Ecología Funcional, en el Laboratorio de Alelopatía.

con la asesoría de la
Dra. Ana Luisa Anaya Lang

Agradecimientos

Agradezco al Instituto Politécnico Nacional (I.P.N.) por la Licencia para realizar estudios de doctorado; así como también al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo con la beca otorgada para la realización de mis estudios de Doctorado (agosto del 2010 a junio de 2014) y especialmente agradecemos el apoyo de la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.) a través del proyecto PAPIIT (IG200514) para el financiamiento del proyecto. Un agradecimiento muy especial a la Unidad de Administración del posgrado (UAP) de la UNAM por su valioso apoyo. A mi comité tutor integrado por el Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dra. Ana Luisa Anaya Lang y Dra. Martha L. Macías Rubalcava por su apoyo para la realización de este trabajo, por sus enseñanzas, amistad y comprensión.

Un agradecimiento especial al Dr. Guillermo E. Delgado Lamas (Laboratorio de productos Naturales 4, del Depto. Productos Naturales del Inst. Química, UNAM), por su invaluable apoyo y asesoría para la realización de este trabajo. Agradecemos de forma muy especial a la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava (Lab. de Productos Naturales, Inst. Química) por su apoyo durante todo el proceso de la realización de este trabajo. Especial agradecimiento a Teresita Caudillo Estrada y la Biol. Blanca E. Bautista, por el apoyo técnico en el laboratorio de Alelopatía, Instituto de Ecología. U.N.A.M.

Agradeciendo de manera muy especial, a todos los integrantes del comité revisor por su tiempo y valiosas sugerencias y aportaciones para la mejora del presente trabajo, a todas las personas que de alguna manera contribuyeron a mi formación y a todos mis maestros mi reconocimiento y gratitud por siempre.

Dedicatoría

A mi hijo por ser lo más importante de mi vida, por ser un ejemplo de esfuerzo, lucha y tenacidad.

Te adoro hijo.

A mis padres: Mario Miranda y Josefina Arámbula, por ese inmenso apoyo y amor que siempre nos han brindado.

Los amo.

A mis hermanos: Josefina, Gerardo, Pedro, Luisa, Mauricio, Elena, Clara, Silvia e Iván.

Gracias!...por su amor y apoyo incondicional.

Con mucho cariño a mis sobrinos: Indira, Luis Mario Aram, Gerardo, Johan e Liza.

A mis amigas: Pili y Sandy que siempre cuento con su cariño y apoyo incondicional.

Las quiero mucho.

A mis Amigos: Marco, Felipe y José Luis.

Los quiero mucho.

A mis amig@s y compañer@s del Instituto de Ecología por su apoyo, paciencia y tiempo compartido: Blanca E., Selene, Aurora, Caro, Ana, Adán, Pau, Emma, Teresita

Mil gracias.

A mis amig@s y compañer@s del Instituto de Química por su valioso colaboración, paciencia y apoyo: Rocío (Chío), Rosita, Mayela, Jose Luis, Laurita, Yoselín, las "Pau", Karla, Dulce, a todo el "Chilpa-Lab".

Gracias por su apoyo y cariño.

A mis amig@s y compañer@s del PDCB, UNAM: Rocío (Chío), Rosita, Mayela, Peter, Marisol, Diana, Ytzel, Daniel y muchos más que sus nombres escapan de mi memoria.

Mil gracias, por todos esos momentos bellos que compartimos.

A mis amig@s y compañer@s de CIBA, IPN: Laurita, Ada, Fernando, Javier, Alinne, Elizabeth, Reyna, Raúl, MaryCarmen, Magda.

Mil gracias por todo su cariño y apoyo.

Un especial agradecimiento:

A la Dra. Ana Luisa, por su guía, amistad, comprensión y apoyo,

Gracias doctora!!!

Al Dr. Ricardo, por su invaluable apoyo, guía y paciencia.

De corazón gracias!!!

A la Dra. Rocío, por su apoyo, guía y amistad.

Muchísimas gracias!!!

A la Dra. Martha L, por su consejos e invaluable apoyo.

Gracias... gracias.

Al Dr. Fernando López Valdéz, por su amistad y apoyo incondicional

Gracias,,,Fer!

*A todos aquell@s amig@s y compañer@s que me brindaron su apoyo, amistad y consejo
para culminar esta meta....Gracias!!!*

“Desafortunadamente es difícil escuchar lo que la Naturaleza dice, no siempre la Naturaleza habla claro, por lo que; se deben buscar experimentos de tal manera que pueda mejorar su dicción”

B.C. Clarke

Contenido

	Pág.
Índice	VIII
Índice de figuras	X
Índice de tablas	XII
Resumen	1
Abstract	3
1. Introducción	5
2. Antecedentes	8
2.1. Metabolitos secundarios	
2.1.1. Definición de metabolitos secundarios.	8
2.1.2. Aleloquímicos.	9
2.1.3. Alelopatía.	9
2.2. Aspectos generales del jitomate.	10
2.2.1. Producción mundial.	11
2.2.2. Producción nacional y local (Tlaxcala).	11
3. Justificación e hipótesis.	13
4. Objetivo general.	15
4.1 Objetivos específicos.	24
5. Materiales y métodos.	
5.1. Material biológico.	
5.1.1. Material vegetal.	16
5.1.2. Microorganismos.	16
5.1.3. Insectos.	17
5.2. Obtención de extractos acuosos y orgánicos.	
5.2.1. Extractos acuosos.	
5.2.1.1. Extractos acuosos de plantas frescas (EAF)	18
5.2.1.2. Extractos acuosos de plantas secas (EAS)	18
5.2.2. Extractos orgánicos.	18
5.2.3. Fraccionamiento biodirigido	
5.2.3.1. Fraccionamiento biodirigido del extracto <i>BsII</i> (DCM-MeOH [1:1]) de <i>B. salicifolia</i>	19

Continua...	Pág.
5.2.3.2. Análisis por CLAR acoplada a Espectrometría de Masas	26
5.3. Bioensayos.	
5.3.1. Ensayos de fitotoxicidad.	
5.3.1.1. <i>in vitro</i>	26
5.3.1.2. Invernadero.	27
5.3.2. Ensayos contra hongos fitopatógenos <i>F. oxysporum</i> y <i>P. infestans</i>	
5.3.2.1. Con extractos acuosos y orgánicos.	27
5.3.3. Ensayos contra <i>B. tabaci</i> .	
5.3.3.1. Invernadero.	28
5.3.4. Análisis estadístico.	29
6. Resultados.	
6.1. Actividad fitotóxica inducida por extractos acuosos y orgánicos	
6.1.1. Inhibición en la germinación de semillas.	30
6.1.2. Inhibición en la elongación de la radícula.	32
6.1.3. Fitotoxicidad de extractos en plántulas de jitomate.	36
6.1.4 Análisis por CLAR acoplada a espectrometría de masas de los extractos acuosos de <i>B. salicifolia</i> y <i>L. virginicum</i>	36
6.2. Efecto tóxico de los extractos acuosos (2%) y orgánicos (2%) sobre el fitopatógeno <i>Fusarium oxysporum</i>	
6.2.1. Efecto sobre el crecimiento radial en <i>F. oxysporum</i>	39
6.2.2 Efecto del Fraccionamiento dirigido del extracto orgánico de <i>B. salicifolia</i> sobre el crecimiento radial de <i>F. oxysporum</i>	39
6.3. Efecto de los extractos acuosos, orgánicos y del fraccionamiento biodirigido sobre el oomiceto <i>P. infestans</i> .	
6.3.1. Efecto de los extractos acuosos y orgánicos sobre el crecimiento radial del fitopatógeno <i>P. infestans</i>	43
6.3.2. Fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico de <i>B. salicifolia</i>	44
6.4. Análisis químico de fracciones bioactivas del fraccionamiento biodirigido.....	46
6.5. Actividad Insecticida: Efecto de los extractos acuosos sobre <i>Bemisia tabaci</i> ...	50
7. Discusión	52

a) Actividad fitotóxica inducida por los extractos acuosos y orgánicos	53
b) Actividad oomicida y fungicida inducida por los extractos acuosos y orgánicos	
b.1 <i>Phytophthora infestans</i>	54
b.2 <i>Fusarium oxysporum</i>	54
c) Composición química de los extractos acuosos y orgánicos con potencial plaguicida (<i>Baccharis salicifolia</i>).....	55
8. Conclusiones.	58
9. Referencias Bibliográficas y Bibliografía.	59
10. Anexos	
10.1. Material suplementario.	64
10.2. Artículo de requisito.	65

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1 Aspecto morfológico de <i>Fusarium oxyaporium</i> y <i>Phytophthora infestans</i> .	16
Figura 2 Protocolo de manejo #1 para <i>Bemisia tabaci</i> en cámaras de crecimiento.	17
Figura 3 Protocolo de manejo #2 para <i>Bemisia tabaci</i> en cámaras de crecimiento.	17
Figura 4 Estrategia general para la obtención de extractos acuosos y orgánicos con polaridad ascendente en cinco especies alelopáticas de Tlaxcala	19
Figura 5 Perfil en cromatografía de capa fina (CCF) de los extractos orgánicos de <i>B. salicifolia</i> en dos diferentes colectas	20
Figura 6 Grupos del fraccionamiento primario del extracto de <i>B. salicifolia</i> en DCM-MeOH, 1:1.	21
Figura 7 Perfil en CCF de las fracciones primarias <i>BsIIFpXI</i> y <i>BsIIFpXII</i> del extracto orgánico (DCM:MeOH; 1:1) de <i>B. salicifolia</i>	21
Figura 8 Grupos del fraccionamiento secundario de la fracción primaria <i>BsIIpXI</i> de <i>B. salicifolia</i>	22
Figura 9 Grupos del fraccionamiento secundario de la fracción primaria <i>BsIIpXII</i> de <i>B. salicifolia</i>	23
Figura 10 Grupos del fraccionamiento terciario del grupo <i>BsIIFpXII</i> Fs38 de <i>B.</i> <i>salicifolia</i>	24

Figura 11 Grupos del fraccionamiento terciario del grupo <i>BsIIFpXII</i> Fs41 de <i>B. salicifolia</i>	24
Figura 12 Esquema general del fraccionamiento (primario, secundario y terciario) del extracto orgánico completo (DCM-MeOH, 1:1) de <i>B. salicifolia</i>	25
Figura 13 Fraccionamiento y purificación del grupo <i>BsIIFpXII</i> Fs41Ft16 de <i>B. salicifolia</i>	25
Figura 14 Ensayo de inhibición de la germinación en las plantas modelo con EAF (10%) y EAS (1%), de las cinco plantas ruderales seleccionadas.	31
Figura 15 Inhibición de la germinación en las tres plantas modelo (amaranto, lechuga y jitomate) por EAS de <i>B. salicifolia</i> y <i>L. virginicum</i>	32
Figura 16 Ensayo de inhibición de la elongación de la radícula en las plantas modelo con EAF (10%) y EAS (1%)	33
Figura 17 Ensayo de inhibición de la elongación de la radícula en las plantas modelo con los extractos orgánicos de las cinco plantas ruderales	35
Figura 18 Efecto en la biomasa de plántulas de jitomate (8 y 12 semanas) por EAS 1 y 2% de <i>B. salicifolia</i> y <i>L. virginicum</i> en invernadero.	36
Figura 19 Cromatograma HPLC-ESI-QTOF-MS, del extracto acuoso liofilizado de <i>Baccharis salicifolia</i>	37
Figura 20 Cromatograma HPLC-ESI-QTOF-MS, del extracto acuoso liofilizado de <i>Lepidium virginicum</i>	38
Figura 21 <i>Fraccionamiento primario biodirigido del extracto DCM-MeOH [1:1] de B. salicifolia mediante cromatografía de columna abierta para bioensayos sobre F. oxysporum y P. infestans.</i>	41
Figura 22 <i>Fraccionamiento secundario biodirigido del grupo BsIIFpXI de B. salicifolia mediante cromatografía de columna abierta para bioensayos sobre F. oxysporum y P. infestans.</i>	41
Figura 23 <i>Fraccionamiento secundario biodirigido del grupo BsIIFpXII de B. salicifolia mediante cromatografía de columna abierta para bioensayos sobre F. oxysporum y P. infestans.</i>	42
Figura 24 Efecto de los grupos terciarios (Ft7 y Ft9) del grupo <i>BsIIFpXII</i> Fs38 en ambos fitopatógenos	43

Figura 25 Efecto del grupo <i>BsIIFpXIIFs41</i> sobre el crecimiento radial de ambos fitopatógenos comparado con plaguicida comercial.....	45
Figura 26 Efecto de los grupos del fraccionamiento terciario (Ft10, Ft15 y Ft16) del grupo <i>BsIIFpXIIFs41</i> con actividad en ambos fitopatógenos.	45
Figura 27 Cristales de espinasterol	46
Figura 28 Estructura química del espinasterol	46
Figura 29 Espectro de RMN ¹³ C del espinasterol (RRC-0963)	47
Figura 30 Espectro de RMN ¹ H del espinasterol (RRC-0653)	49
Figura 31 Espectro de Masas del espinasterol (RRC-1315).	50
Figura 32 Supervivencia de insectos adultos, protocolo 1	51
Figura 33 Eclosión de huevecillos (2 ^o y 3 ^{er} instar) de <i>B. tabaci</i> . Protocolo 2.	51
Figura 34 Estructura química de la Sakuranetina, una flavanona metoxilada.	53
Figura 35 Estructuras químicas reportadas para el genero <i>Baccharis</i> sp.	56
Figura 36 Estructura química de Sinigrina, un glucosinolato	56

Índice de Tablas	Pág.
Tabla 1 Especies alelopáticas y sus estructuras seleccionadas para preparar los extractos acuosos y orgánicos.	16
Tabla 2 Anexo: Material suplementario	64
Tabla 3 Efecto de los extractos acuosos (2%) y de los extractos orgánicos (200 µg/mL) sobre <i>Fusarium oxysporum</i>	39
Tabla 4 Efecto de las fracciones terciarias del grupo <i>BsIIFpXIIFs38</i> y <i>BsIIFpXIIFs41</i> en sobre ambos fitopatógenos.	42
Tabla 5 Efecto de los extractos acuosos (2 %) y de los extractos orgánicos (200 µg/mL) sobre <i>Phytophthora infestans</i>	44
Tabla 6 Valores experimentales y reportados (RMN ¹³ C) para espinasterol.	48
Tabla 7 Valores experimentales y reportados (RMN ¹ H) para espinasterol	49

Resumen

Al cultivo de jitomate (*Solanum lycopersicum* -*Solanaceae*) se le aplica plaguicidas sintéticos para proteger y aumentar la producción de frutos, sin embargo, esto conlleva riesgos al ambiente así como a la salud humana y animal. Este problema ha motivado numerosos esfuerzos para encontrar alternativas ecológicas para el control de plagas y enfermedades, tratando de obtener productos agrícolas orgánicos (libres de agroquímicos sintéticos) mediante el uso sustentable de los recursos naturales. La alelopatía podría ser una de las soluciones para resolver varios problemas agrícolas, por ello planteamos la siguiente hipótesis: los extractos de plantas ruderales locales poseen potencial para el control de malezas, hongos e insectos, con posibles aplicaciones en agroecología y la agricultura orgánica. Para tal fin, se siguieron metodologías convencionales para la preparación de extractos orgánicos y acuosos (1, 2 y 10% m/v) con las partes aéreas frescas (EAF) y secas (EAS) de cinco especies ruderales silvestres que crecen en zonas aledañas a los cultivos de jitomate en Tlaxcala, México. Dichas especies fueron: *Argemone mexicana* L. (*Papaveraceae*), *Baccharis salicifolia* Pers. (*Asteraceae*), *Lepidium virginicum* L. (*Brassicaceae*), *Leucena leucocephala* S. Zárate (*Fabaceae*) y *Reseda luteola* L. (*Resedaceae*). Su actividad fitotóxica se evaluó *in vitro* con las semillas de tres plantas modelo (amaranto, lechuga y jitomate). La actividad fungitóxicas se evaluó contra dos tipos de fitopatógenos (*Fusarium oxysporum* y *Phytophthora infestans*). La actividad insecticida se evaluó en mosquita blanca (*Bemisia tabaci*). Nuestros resultados, indicaron que los extractos acuosos de *B. salicifolia* y *L. virginicum* (1% m/v) mostraron el mayor potencial como herbicidas naturales, pues inhibieron 100% la germinación de las semillas y la elongación de la radícula en las tres plantas modelo, pero no afectaron el crecimiento de las plántulas de jitomate de 8 y 12 semanas de edad en condiciones de invernadero. Ambos extractos, analizados mediante HPLC-ESI-QTOF-MS, presentaron dos picos mayoritarios: *B. salicifolia* con *m/z* 432.9 y 725.4 y *L. virginicum* con *m/z* 532.9 y 527.1. El potencial antifúngico, el extracto acuoso de *L. virginicum* fue el más prometedor pues inhibió *in vitro* el crecimiento (100%) de *F. oxysporum*, seguido por los extractos orgánicos de *B. salicifolia* con una inhibición de 35-39%. El extracto orgánico (DCM-MeOH, 1:1) de *B. salicifolia* se eligió para realizar fraccionamiento bio-dirigido y se seleccionó la inhibición del crecimiento radial del micelio de los fitopatógenos (*F. oxysporum* y *P. infestans*) como la variable de respuesta a medir. Al evaluar la actividad biológica de las fracciones obtenidas a partir de los fraccionamientos primario, secundario y terciario del extracto orgánico de *B. salicifolia*, se

observó que una fracción obtenida en el segundo fraccionamiento (*grupo BslIFpXlIFs40*) inducía una inhibición del 96% en el crecimiento radial de *F. oxysporum* y 100% en *P. infestans*. Algunas fracciones primarias, secundarias y terciarias se analizaron por RMN H¹ y C¹³ logrando identificar al α -*espinasterol*, sin embargo, aún están pendientes por caracterizar otros compuestos con probablemente mayor actividad biológica. Los extractos de *B. salicifolia* que mostraron ser los más prometedores como fitotóxicos y fungicidas, también se evaluaron como insecticidas en larvas en estadio 2do y 3er *instar* y en adultos de la mosquita blanca *Bemisia tabaci*, así como en la eclosión de huevecillos. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas significativas respecto al tratamiento control. Como conclusiones consideramos, que los extractos acuosos de las plantas ruderales locales *B. salicifolia* y *L. virginicum* (1% m/v) son potenciales fitotóxicos y fungicidas naturales, sin efectos dañinos en plántulas cultivadas de jitomate. Estos resultados sugieren que los extractos de *B. salicifolia* podrían tener aplicaciones como herbicidas y fungicidas en la producción orgánica de cultivos de jitomate, pero no contra algunos insectos como *B. tabaci*. Finalmente, se destaca, que en trabajos previos se ha reportado que *B. salicifolia* posee actividad bactericida y nematocida; sin embargo, este es el primer trabajo, donde se demuestra su actividad contra fitopatógenos como *P. infestans*. Esta planta alelopática, es la más prometedora de las evaluadas, con potencial plaguicida contra algunos fitopatógenos del cultivo de jitomate.

Abstract

Synthetic pesticides are applied to the tomato crop (*Solanum lycopersicum* -Solanaceae) to protect and increase fruit production, but also carries risks to the environment, as well as to human and animal health. This has motivated numerous efforts to find ecological alternatives for the control of pests and diseases to obtain organic agricultural products (free of synthetic agrochemicals) through the sustainable use of natural resources. Allelopathy could be one of the solutions to solve several agricultural problems, therefore we propose the following hypothesis: aqueous and organic extracts and some, their fractions of local ruderal plants have potential for the control of weeds, fungi and insects, with possible applications in agroecology and organic agriculture. Conventional methodologies were followed to prepare organic and aqueous extracts (1, 2 and 10% m/v) with fresh (EAF) and dry (EAS) aerial parts of five wild ruderal species that grow in areas surrounding the tomato crops in Tlaxcala, México. Such species were: *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae), *Baccharis salicifolia* Pers. (Asteraceae), *Lepidium virginicum* L. (Brassicaceae), *Leucena leucocephala* S. Zárate (Fabaceae) and *Reseda luteola* L. (Resedaceae). The phytotoxic activity of the extracts was evaluated *in vitro* on the seeds of three model plants (amaranth, lettuce and tomato). The fungitoxic activity was evaluated against two types of phytopathogens (*Fusarium oxysporum* and *Phytophthora infestans*). The insecticidal activity was evaluated in whiteflies (*Bemisia tabaci*). Our results showed that the aqueous extracts of *B. salicifolia* and *L. virginicum* (1% m/v) had the greatest potential as natural herbicides, since that they inhibited 100% seed germination and radicle elongation in the three model plants, but the extracts did not affect the growth of tomato seedlings of 8 and 12 weeks old under in greenhouse conditions. Both extracts were analyzed by HPLC-ESI-QTOF-MS, and the extract obtained from *B. salicifolia* showed two major peaks at m/z 432.9 and 725.4, while the extract prepared from *L. virginicum* showed peaks at m/z 532.9 and 527.1. Regarding the antifungal potential, the aqueous extract of *L. virginicum* was the most promising inhibiting growth (100%) of *F. oxysporum* under *in vitro* conditions followed by the organic extracts of *B. salicifolia* with an inhibition of 35-39%. The organic extract (DCM-MeOH, 1:1) of *B. salicifolia* was selected to carry out bio-directed fractionation and the inhibition of the radial growth of the mycelium of the phytopathogens (*F. oxysporum* and *P. infestans*). When evaluating the biological activity of the primary, secondary and tertiary fractionations of the organic extract of *B. salicifolia* was determined fractions obtained from the second fractionation (group *BsIIIFpXIIIFs40*) inhibited by 96% the growth of *F. oxysporum* and by 100% the growth of *P. infestans*. Some fractions that were obtained primary,

secondary and tertiary fractionation were analyzed by NMR H¹ and C¹³, which led to the identification of *α-spinasterol*, however, other compounds with highest potential biological activity are still pending to be characterized. Since the extracts of *B. salicifolia* were the most promising as phytotoxic and fungicides, these were also evaluated as insecticides in 2nd and 3rd instar stage larvae and in adults of the whitefly *Bemisia tabaci*, as well as in the hatching of eggs. However, no statistically significant differences were found with respect to the control treatment. As conclusions we consider the aqueous extracts of local rural plants *B. salicifolia* and *L. virginicum* (1% m/v) are potential phytotoxic and natural fungicides, without harmful effects on tomato seedlings. These results suggest that *B. salicifolia* extracts could have applications as herbicides and fungicides in the organic production of tomato crops, but not against some insects such as *B. tabaci*. Finally, it stands out that *B. salicifolia* is a plant that has reported its biological activity, demonstrating its bactericidal and nematocidal activity in previous works; however, this is the first work, which shows its activity against phytopathogens such as *P. infestans*. This allelopathic plant has a pesticide potential against some phytopathogens of tomato crop.

1. Introducción

En las últimas dos décadas, el jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) se convirtió en el séptimo cultivo de la producción mundial (Bergougnoux 2014). Este cultivo se ve afectado por más de 200 plagas y enfermedades como bacterias, hongos, virus (Bergougnoux 2014) y malezas, que pueden reducir los rendimientos del 20 al 70% (Bakht & Khan 2014, Adisa *et al.* 2018), resaltando que las principales malezas para este cultivo son las especies de la familia *Amaranthaceae* (Palacios *et al.* 2010, De Coninck *et al.* 2015). Los agricultores utilizan masivamente los agroquímicos convencionales contra plagas y enfermedades; sin embargo, esta práctica agrícola ha mostrado efectos negativos al ambiente, como residuos de plaguicidas, desarrollo de poblaciones de patógenos resistentes y riesgos potenciales para la salud humana y animal (Abdel-Monaim *et al.* 2011, Scavo *et al.* 2020). Aunque algunos plaguicidas sintéticos son efectivos, la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos, EE. UU.) no los considera generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) (De Rodríguez *et al.* 2011, Da Cruz *et al.* 2013); por lo tanto, no son aceptados por consumidores que buscan productos agrícolas y cultivos orgánicos seguros. Por esta razón, es necesario encontrar alternativas efectivas contra plagas que sean seguras para la salud (Talibi *et al.* 2012, Moshi & Matoju 2017). Según Korres *et al.* (2018), la alelopatía se define como el estudio de los efectos directos o indirectos de los metabolitos producidos por plantas o microorganismos sobre el crecimiento, desarrollo y distribución de otras plantas y microorganismos en ecosistemas naturales y agrícolas. Actualmente, existe un interés creciente en extractos de plantas y metabolitos secundarios (aleloquímicos) con actividad bactericida, insecticida, herbicida y fungicida. Algunas de estas plantas se han descrito por su uso en la medicina tradicional, pero se han investigado poco como especies alelopáticas, sin embargo, los diversos sistemas agroecológicos basados en el uso de estas plantas ofrecen una buena alternativa para encontrar tecnologías apropiadas que permitan obtener una producción sustentable con un deterioro mínimo del ambiente (Anaya *et al.* 1987). Varios extractos de plantas, como los de caléndula mexicana (*Tagetes minuta* L.), cadillo (*Bidens pilosa* L.), mostaza negra (*Brassica nigra* L.) y otros, pueden ser una alternativa para el manejo y control de algunas especies dominantes de malezas como *Avena fatua* L., *Cyperus difformis* L., *Echinochloa crus-galli* L. (monocotiledóneas) y *Amaranthus* spp. (dicotiledóneas) para cultivos de trigo, algodón y arroz. Otras especies como *Brassica juncea* L., *B. rapa* L., *Hordeum vulgare* L., *Artemisia annua* L., *Azadirachta indica* L., entre otras, han mostrado potencial para

el control de algunos hongos fitopatógenos como *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Meloidogyne javanica* (Farooq *et al.* 2011, Scavo *et al.* 2020). Los extractos de plantas muestran varias ventajas ecológicas, como ser específicos para los organismos objetivo, ser biodegradables y reducir los riesgos para el medio ambiente y la salud humana (Farooq *et al.* 2011). El estudio de este tipo de alelopáticos con esta propiedad, contribuye al hallazgo y aplicación de plaguicidas naturales con potencial para el control de plagas y enfermedades, las cuales pueden ser devastadoras para los cultivos de jitomate como es el caso de algunas malezas (o mejor dicho arvenses, ver Ilustración 1) y de fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora infestans*, responsables del marchitamiento y pudrición de la corona en el cultivo de jitomate. Estos organismos pueden causar severos daños en los rendimientos y en la calidad del producto, además de importantes pérdidas económicas (Corpeño 2004; Liu & Huang 2011, Sánchez 2009, Valenzuela 2010). Por ello, los agricultores, para contrarrestar los daños por plagas y enfermedades e incrementar sus rendimientos y mantener la calidad del cultivo, aplican en forma masiva agroquímicos convencionales y diferentes plaguicidas efectivos, que no son considerados GRAS y a los cuales se les ha revocado el registro para aplicarse en los cultivos agrícolas (Da cruz *et al.* 2013, De Rodríguez *et al.* 2011). Por otro lado, se ha incrementado el interés en la flora por ser una fuente de metabolitos (aleloquímicos) con propiedades que ya se han mencionado (bactericidas, insecticidas, fungicidas, etc.) y su estudio es atractivo para el aprovechamiento de sus propiedades plaguicidas, por lo que, se podría considerar como una estrategia diferente para el manejo y control de plagas en los cultivos agrícolas sin afectar organismos benéficos (polinizadores), resaltando que la mayoría de los aleloquímicos son biodegradables, específicos para organismos blanco y no representan un riesgo a la salud humana y al ambiente (Moshi *et al.*, 2017, Talibi *et al.* 2012, Farooq *et al.* 2011). La propiedad plaguicida de algunas plantas, específicamente contra patógenos agrícolas ya se ha reportado (De Rodríguez *et al.* 2011, Talibi *et al.* 2012, Farooq *et al.* 2011, Rongai *et al.* 2012) como es el caso de algunas plantas de las familias Asteraceae (Talibi *et al.* 2012, Farooq *et al.* 2011, Rongai *et al.* 2012, Rosas-Burgos *et al.* 2009), Brassicaceae (Farooq *et al.* 2011) y Fabaceae (Talibi *et al.* 2012), entre otras. Algunas de estas especies alelopáticas se han descrito por su uso en la medicina tradicional, pero poco se han investigado en cuanto a sus propiedades bioactivas como plaguicidas. Por lo que, investigar la actividad alelopática de nuevos compuestos naturales

Las arvenses, son especies de plantas que en forma espontánea, crecen en los terrenos de cultivo agrícola y son consideradas indeseables denominandolas como malas hierbas o malezas (Blanco *et al.* 2007). Maleza se deriva del latín *malitia*: malo o maldad, y esto es por la relación que establece el hombre a las plantas que obstaculizan el desarrollo de sus cultivos (Sunshine Florio de Real 2013).

explorando los ecosistemas, promete ser una alternativa para encontrar una tecnología apropiada que nos lleve a obtener una producción sustentable (Anaya *et al.* 1987). En este trabajo planteamos, si algunas arvenses de las inmediaciones del estado de Tlaxcala (México), como *Argemone mexicana* (Papaveraceae), *Baccharis salicifolia* (Asteraceae), *Lepidium virginicum* (Brassicaceae), *Leucaena leucocephala* (Fabaceae) y *Reseda luteola* (Resedaceae), tienen el potencial de actuar como plaguicidas y de esta forma ser una alternativa ecológica para el control y manejo de algunas plagas y enfermedades del cultivo de jitomate. En este trabajo, se evaluó la actividad alelopática de extractos acuosos, orgánicos y algunas de sus fracciones de las plantas *A. mexicana*, *B. salicifolia*, *L. virginicum*, *L. leucocephala* y *R. luteola*, sobre plantas modelo (amaranto, lechuga y jitomate), relacionadas con algunas arvenses del cultivo de jitomate; sobre el insecto *B. tabaci* y sobre los hongos fitopatógenos *F. oxysporum* y *P. infestans*. En nuestros resultados, se observó que los extractos acuosos (1% m/v) de *B. salicifolia* y de *L. virginicum* inhibieron 100% la germinación de amaranto, actuando como posibles herbicidas pre emergentes. Los extractos acuosos (1% m/v) de *L. virginicum* inhibieron 100% a ambos hongos fitopatógenos (*F. oxysporum* y *P. infestans*), sin embargo, los extractos orgánicos no mostraron efectos tóxicos contra las especies evaluadas. Los extractos orgánicos de *B. salicifolia* inhibieron significativamente el crecimiento de ambos fitopatógenos, resaltando que al fraccionar estos extractos se incrementó su actividad. La fracción *BsIIIFpXIIIFs38Ft7*, tuvo el mismo efecto de inhibición (83%) contra ambos fitopatógenos y la fracción *BsIIIFpXIIIFs41Ft16* mostro ser las más efectiva, con una inhibición del 100% contra el oomiceto *P. infestans*. Este es el primer reporte de efecto herbicida, fungitoxico y oomitoxico, de extractos de *B. salicifolia*, y con ello, se destaca la posibilidad de aplicar los conocimientos generados de los estudios en alelopatía, como una estrategia alternativa para el control de plagas y enfermedades del cultivo de jitomate en condiciones experimentales, lo que ofrece una nueva estrategia para encontrar una tecnología apropiada que nos lleve a obtener una producción sustentable con un deterioro mínimo del ambiente, sin que represente riesgos a la salud humana y animal.

2. Antecedentes

La importancia de sustituir los plaguicidas convencionales deriva del impacto negativo que estos productos han ocasionado por más de 50 años, considerando que el control de plagas en los diferentes cultivos se realiza con un amplio espectro de herbicidas, fungicidas, insecticidas, entre otros, y en su mayoría son sustancias sintéticas que son persistentes y recalcitrantes en el ambiente (Farooq *et al.* 2011). Esta forma de manejar las plagas y enfermedades en los cultivos agrícolas ha provocado una serie de problemas tanto al ambiente como a la salud humana, situación que ha motivado a los sectores gubernamentales, académicos y a la sociedad en general, a buscar estrategias más amigables para el ambiente e inocuas para nuestra salud. Por lo anterior, han surgido diversas propuestas y estrategias de manejo y control de plagas, una de estas estrategias es la aplicación del conocimiento generado a través de estudios de Alelopatía, donde los extractos vegetales con potencial plaguicida son prometedores para la agricultura orgánica (Abbas *et al.*, 2017; Vyvyan 2002). Por ello a continuación definimos conceptos que integran este trabajo de investigación.

2.1. Metabolitos secundarios

2.1.1. Definición de Metabolitos Secundarios

Las plantas se componen principalmente de proteínas, carbohidratos, lípidos, aminoácidos, ácidos nucleicos, los cuales son parte estructural de las células y de las plantas completas (Ali 2021). Estas sustancias químicas y su amplia diversidad estructural, pueden ser clasificadas en dos categorías principalmente, en metabolitos primarios y secundarios. Estos también son denominados especializados (Arellano 1995, Fang *et al.* 2019). Los metabolitos primarios están directamente involucrados en el crecimiento, desarrollo y reproducción de los organismos y los metabolitos especializados son derivados biosintéticos del metabolismo primario y frecuentemente tienen una función importante en la defensa vegetal contra herbívoros y otras especies (Arellano 1995, Fang *et al.* 2019). Los metabolitos secundarios o especializados pueden tener efectos biológicos positivos y/o negativos (alelopáticos) en otros organismos por lo cual se les ha denominado también como aleloquímicos (Abbas *et al.* 2017, Chaïb *et al.* 2021, Scognamiglio *et al.* 2014)

2.1.2. Aleloquímicos

Son compuestos naturales obtenidos de plantas y/o microorganismos que tienen actividad alelopática. Estos compuestos en las plantas se liberan como exudados de raíz, pueden ser volátiles, por procesos naturales de descomposición de la materia orgánica y por lixiviados foliares, entre otros (Li *et al.* 2014). Estos compuestos se han clasificado en tres clases principales, alcaloides, fenoles y terpenos. *i)* Los alcaloides, son los compuestos más importantes, en relación a sus propiedades medicinales o farmacéuticas y se pueden identificar compuestos nitrogenados derivados de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, etc.) y no aromáticos, también compuestos fenólicos con la contribución de las vías de biosíntesis del ácido shikímico y malónico. Algunos ejemplos de alcaloides de importancia son la morfina, la cocaína, cafeína, Nicotina, entre otros (Evert & Eichhorn 2013) ; *ii)* En los fenoles, se incluyen a los flavonoides, taninos, Ligninas y el ácido salicílico. En este grupo se conocen un amplio rango de compuestos con grupos hidroxilos (-OH) unidos a anillos aromáticos (de seis carbonos con tres dobles ligaduras) y estos compuestos pueden estar presentes en toda la planta (raíz, hojas, tallos, flores y frutos). Los compuestos fenólicos, protegen, principalmente los tejidos aéreos de las plantas de posibles daños por los rayos U.V. Se han descrito más de 3000 compuestos diferentes y se considera que son los compuestos más estudiados de las plantas. *iii)* Los terpenoides incluyen unidades de isopreno (C₅H₈), aceites esenciales, Taxol glicosidos, cardionolidos, etc. Su vía de biosíntesis principal es la del ácido mevalónico (Ali B 2021; Seigler DS 2006; Evert & Eichhorn 2013). Los metabolitos especializados, en lo general, pueden ser sensibles a cambios de temperatura, humedad, a la luz (fotosensibles), entre otros factores y algunos de estos compuestos pueden presentar actividad biológica contra otros organismos actuando como fungicidas, bactericidas, herbicidas, larvicidas, insecticidas, etc., e incluso un compuesto puede presentar más de una actividad biológica de forma simultánea (Gahukar RT 2012, Scavo *et al* 2020). Una de las disciplinas que estudian estos compuestos o fitoquímicos, y sus efectos en otros organismos es la Alelopatía (Chou C.-H 2006).

2.1.3. Alelopatía

Desde épocas muy antiguas, se han reportado efectos de inhibición en diferentes plantas, como es el caso de Theophrastus (372-285, a.c) que registró el efecto de inhibición de una maleza (arvense) sobre el cultivo de alfalfa. En China hay reportes del uso de plantas para el control de plagas en los años 25-220 d.c.; y de estas, 267 especies se consideran que tienen actividad plaguicida, de las cuales la mayoría presentan potencial alelopático (Chou C.-

H 2006). En 1832, el botánico Suizo De Candolle, sugirió que los problemas de un “suelo agrícola enfermo” podría deberse a exudados de algunos cultivos. 50 años después, Hoy y Stickney, describen el efecto tóxico del árbol del nogal (*Juglans nigra*) sobre el crecimiento de plantas vecinas (Chou C.-H 2006). En 1907 y 1908, Schreiner y Reed, identificaron ácidos orgánicos que fueron liberados por la raíz de algunas plantas, inhibiendo el crecimiento de cultivos agrícolas (Chou C.-H 2006). En 1937, el fisiólogo de plantas Hans Molisch, fue el primero en presentar el término de Alelopatía como el efecto de una plantas sobre otros organismos de acuerdo a dos vocablos griegos: “*Allelo*” y “*patia*”, que significa “daño mutuo”; expresando que hay un fenómeno natural que ocurre cuando las plantas liberan sustancias y éstas inhiben el crecimiento de otras plantas con las que comparten el hábitat (Chou C.-H 2006, Bhowmik *et al.* 2003). De acuerdo a Bhowmik *et al.* (2003), Rice define Alelopatía como el efecto de una planta (incluyendo microorganismos) en otra planta por medio de la liberación de compuestos químicos al ambiente y el mismo autor, plantea los posibles aplicaciones de la Alelopatía como una alternativa natural para el control de malezas. Finalmente en 1996, el concepto de Alelopatía lo define la Sociedad Internacional de Alelopatía (AIS, por sus siglas en inglés) como “cualquier proceso que involucra la producción de metabolitos secundarios por organismos como las plantas, algas, bacterias y hongos, y que estas sustancias influyen en el crecimiento y desarrollo de los sistemas agrícolas y biológicos”. En otras palabras, los compuestos alelopáticos pueden regular el crecimiento y desarrollo vegetal, involucrando como mecanismos de acción efectos en la fotosíntesis, respiración, transpiración y el metabolismo bioquímico principalmente (Chou C.-H 2006). Diversos investigadores como Gahukar (2012), Farooq *et al* (2011), Narwal (2006), entre otros; han considerado el potencial del conocimiento de la Alelopatía como una alternativa para el manejo y control de plagas, considerando que estos compuestos pueden actuar contra diversos organismos como bactericidas, fungicidas, herbicidas, entre otros; con las ventajas ya descritas anteriormente (Abbas *et al.*, 2017; Vyvyan 2002).

2.2. Aspectos generales del jitomate

El jitomate o también conocido como tomate, es originario de la parte occidental de América del Sur, incluyendo las islas Galápagos, fue introducido al continente Europeo por los conquistadores españoles que llegaron a México. Aunque el uso de jitomate se extendió por toda Europa y se introdujo a Italia antes del siglo XVI, originalmente no era una fruta muy popular, ya que muchas personas creían que era venenoso por su color rojo (parecido a la

sangre). Ciertamente las hojas del jitomate contienen alcaloides tóxicos, sin embargo, el fruto es relativamente inocuo. Este fruto ha ganado popularidad desde mediados del siglo XIX y hasta la fecha, de hecho, hoy en día es una hortaliza con una gran demanda y de importancia agrícola y comercial (Bergougnoux 2014; Kumar *et al.*, 2021).

2.2.1. Producción Mundial

El jitomate es la segunda hortaliza de mayor importancia en todo el mundo y la de mayor valor económico, después del cultivo de la papa. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. El incremento anual de la producción en los últimos años se debe principalmente al aumento en el rendimiento y en menor proporción al aumento de la superficie cultivada (Kumar *et al.*, 2021).

La producción mundial de esta hortaliza, según los datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura de 2012 (FAO) se elevó a 211,021,843 toneladas (ton). Siendo China el primer productor en el mundo con 50,125,055 ton, el 27.75% del total, le sigue India como segundo productor mundial de jitomate, con un total de 17,500,000 ton (8.29%), el tercer lugar lo ocupa Estados Unidos, que produjo en 2012 más de 13 millones (13,206,950) de ton de jitomate (6.26%) de la producción mundial, el cuarto lugar está ocupado por Turquía, con 11,350,000 ton (5.38%), Egipto con la quinta posición con 8,625,219 ton (4.09%), e Irán en la sexta posición con 6,000,000 ton (2.84%), Italia en el séptimo lugar con 5,131,977 ton (2.43%), España en la octava posición con una producción de 4,007,000 ton (1.9%), Brasil en la novena posición con 3,873,985 ton (1.83%) y México ocupa el décimo lugar con una producción de 3.5 millones de ton, lo que representa el 1.63% de la producción mundial en jitomate fresco, por lo que representa el tercer producto de mayor importancia de exportación en el país con el 50% de la producción para los mercados internacionales (FIRA 2017).

2.2.2. Producción Nacional y Local (Tlaxcala)

La superficie total sembrada de jitomate en México ha mostrado una tendencia a la baja por problemas de plagas y enfermedades principalmente, altos costos de producción, fluctuaciones en precios internacionales, cambio de divisa desfavorable y disponibilidad de recursos hídricos limitada; sin embargo, los rendimientos promedio de producción se han incrementado siempre y cuando se mantenga un control adecuados de las plagas y enfermedades (FIRA 2017). Entre los estados principales de producción de jitomate a nivel

nacional, se encuentran Sinaloa como el principal productor, seguido de Jalisco y Puebla, entre otros. Tlaxcala ocupa el noveno lugar de la superficie sembrada a nivel nacional y la mayor proporción de su producción es para los mercados internacionales (FIRA 2017).

Uno de los principales problemas en este cultivo, es el combate de las diversas plagas y enfermedades y como ya se mencionó, éstas afectan la calidad, producción y rendimiento del fruto, por lo que los productores en su mayoría utilizan diversos agroquímicos para su control, de los cuales resaltan los herbicidas como glifosato, bromuro de metileno y Metribuzina (Sencor) como principio activo que van dirigidos a malezas (arvenses) de hoja ancha y angosta (especies relacionadas a la familia de las gramíneas o pastos) (Corpeño 2004), diversos fungicidas contra los fitopatógenos *Phythium sp.*, *Sclerotium sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Phytophthora sp.*, *Fusarium sp.*, etc.; estos dos últimos de gran importancia por ser los responsables del marchitamiento y entristecimiento de los cultivos, estos fitopatógenos afectan los principales conductos vasculares (xilema y floema) de las plantas provocando obstrucción y muerte celular en los tejidos, y por lo tanto, impidiendo el transporte de nutrientes a otras estructuras de la planta. Por ello, una de estas estrategias, es la aplicación del conocimiento sobre alelopatía en plantas y microorganismos que produzcan compuestos químicos secundarios con actividad biológica (aleloquímicos o alelopáticos) que inhiban el crecimiento de malezas y microorganismos patógenos, entre otros (Xuan *et al.* 2003). El tipo de alelopáticos que se buscan, son aquellos que muestren especificidad contra las plagas, pero que sean amigables para el ambiente (Domínguez 2002, Farooq *et al.* 2011, De Rodríguez *et al.* 2011, Rongai *et al.* 2012, Xuan *et al.* 2003, Teerarak *et al.* 2010). En el Estado de Tlaxcala (México), la producción de jitomate (4,066 ton/año) es una actividad económica importante con un incremento anual de 4.8% (SIAP 2017). En nuestro grupo de investigación, estudiamos la potencial actividad fitotóxica de algunas plantas ruderales locales como alternativa ecológica para el control de plagas y enfermedades. Las especies ruderales se definen como aquellas que crecen a lo largo de corredores de senderos o caminos rurales o áreas perturbadas (Potito & Beatty 2005). Seleccionamos cinco especies ruderales que crecen cerca de los campos de jitomate en el estado de Tlaxcala, México. Los pequeños agricultores las utilizan para rodear sus campos y canales de agua en sus agro-ecosistemas tradicionales (Anaya *et al.* 1987).

3. Justificación e Hipótesis

Justificación

Actualmente se han identificado diversos compuestos alelopáticos en una gran variedad de plantas que se utilizan con fines médicos y prácticos, por ejemplo, los ácidos fenólicos, taninos, saponinas, terpenos y alcaloides, entre otros, se les da un uso terapéutico por su actividad anti-inflamatoria, microbiciada, fungicida, cicatrizante e insecticida, o bien, pueden tener actividad herbicida, fungicida e insecticida, etc. contra algunas plantas y contra patógenos agrícolas (De Rodríguez *et al.* 2011), como es el caso de algunas plantas de las familias: Asteraceae (Farooq *et al.* 2011, Rongai *et al.* 2012, Rosas-Burgos 2009, Talibi *et al.* 2012), Brassicaceae (Farooq *et al.* 2011), Fabaceae (Talibi *et al.* 2012), entre otras. Por otro lado, los consumidores actualmente se informan sobre las practicas agrícolas y sus efectos en la salud humana y el ambiente, además se han hecho conscientes de los riesgo de los plaguicidas en los alimentos y de los ingredientes activos no autorizados (usualmente plaguicidas altamente tóxicos) que aún usan los agricultores de países en vías de desarrollo. China es un ejemplo de la tendencia hacia la producción orgánica, y esta nación desde 1990 ha regulado los plaguicidas utilizados y promueve el consumo de alimentos orgánicos que se producen con tecnologías verdes (Wang *et al.* 2015). Además, la Asociación de Comercio Orgánico (Organic Trade Association) indica que la tasa de expansión del mercado orgánico se triplico en los últimos años, destacando que México se encuentra dentro de los cinco principales países que exportan productos orgánicos al mercado estadounidense, con una aportación del 40% (De Corato *et al.* 2015).

Por otro lado, México posee una gran variedad de plantas a nivel mundial, ocupando el cuarto lugar mundial en diversidad vegetal, con aproximadamente 25,000 especies registradas y 30,000 especies aún no descritas (Anaya 1999, De Rodríguez *et al.* 2011) y considerando que la riqueza vegetal es sinónimo de riqueza química, es importante estudiar todas aquellas plantas que se conocen por su producción de ciertos compuestos bioactivos, ya que podrían ser prometedoras para el desarrollo de plaguicidas naturales. Además, debemos tener en consideración, el incremento de plagas y enfermedades resistentes a los agroquímicos comunes, por lo que, nos obliga a buscar y desarrollar nuevas estrategias que sean plaguicidas efectivos y a la vez ecológicamente viables. Por ello, los aleloquímicos producidos por plantas alelopáticas, podrían ser una solución viable (Rongai *et al.* 2012).

El objetivo o propósito de este trabajo fue el estudio del potencial alelopático de algunas de las especies ruderales (silvestres) utilizadas por los campesinos tradicionales de Tlaxcala con el fin de combatir malezas y algunas plagas. Las especies de plantas elegidas fueron *Argemone mexicana* (Papaveraceae), *Baccharis salicifolia* (Asteraceae), *Lepidium virginicum* (Brassicaceae), *Leucaena leucocephala* (Fabaceae) y *Reseda luteola* (Resedaceae). Por lo que nos planteamos la siguiente pregunta de investigación ¿El potencial alelopático de algunas plantas seleccionadas con criterios ecológicos o culturales, pueden ser la guía para encontrar herbicidas, fungicidas e insecticidas naturales para algunas plagas del cultivo de jitomate?. Por ello, esto fue el inicio de la búsqueda de plantas alelopáticas (en la región de Tlaxcala) que producen aleloquímicos con potencial plaguicida como herbicidas (fitotóxicos), insecticida y como fungicida (fungicida y oomicida), contra plantas modelo relacionadas con familias de arvenses, insectos como *Bemisia tabaci* y patógenos (*Fusarium oxysporum* y *Phytophthora infestans*) de importancia por sus efectos dañinos en el cultivo de jitomate.

Hipótesis

Las plantas ruderales como *Argemone mexicana* (Papaveraceae), *Baccharis salicifolia* (Asteraceae), *Lepidium virginicum* (Brassicaceae), *Leucaena leucocephala* (Fabaceae) y *Reseda luteola* (Resedaceae), tienen aleloquímicos con potencial actividad como plaguicidas para el control de plagas y enfermedades en el cultivo de jitomate.

4. Objetivo General

La presente investigación tuvo el objetivo de evaluar *in vitro*, la efectividad de extractos acuosos y orgánicos de cinco especies alelopáticas (*Argemone mexicana*, *Baccharis salicifolia*, *Lepidium virginicum*, *Leucaena leucocephala* y *Reseda luteola*) contra algunas plagas y enfermedades del cultivo de jitomate, así como evaluar los extractos acuosos más efectivos en plántulas de jitomate de 8 y 12 semanas de edad en condiciones de invernadero.

4.1. Objetivos específicos

- 4.1.1. Evaluar la actividad fitotóxica de los extractos acuosos y orgánicos de las cinco especies alelopáticas seleccionadas en tres especies modelo (jitomate, lechuga y amaranto).
- 4.1.2. Evaluar la actividad insecticida de los extractos acuosos más prometedores por su efecto tóxico como herbicida y fungicida de las cinco especies alelopáticas seleccionadas en diversos estadios del insecto- vector *Bemisia tabaci*.
- 4.1.3. Evaluar la actividad fungicida y oomicida de los extractos acuosos y orgánicos de las cinco especies alelopáticas seleccionadas en los fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora infestans*, respectivamente.
- 4.1.4. Evaluar la actividad fungicida y oomicida del extracto más prometedor como fitotóxico de las cinco especies alelopáticas seleccionadas, por medio de un fraccionamiento biodirigido.

5. Materiales y Métodos

5.1. Material biológico

5.1.1. Material vegetal

Las partes aéreas de cinco plantas ruderales *Argemone mexicana*, *Baccharis salicifolia*, *Lepidium virginicum*, *Leucaena leucocephala* y *Reseda luteola* (Tabla 1) fueron recolectadas en febrero de 2011 cerca de Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala, México (19°16'42" N; 98°22'10" W; altitud 2.221-2.260 msnm). Un ejemplar de cada especie fue depositado en el Herbario Casa Libertad (Universidad Autónoma de la Ciudad de México) con los números 1463, 1464, 1461, 1465 y 1462, respectivamente.

Tabla 1. Especies alelopáticas y sus estructuras seleccionadas para preparar los extractos acuosos y orgánicos.

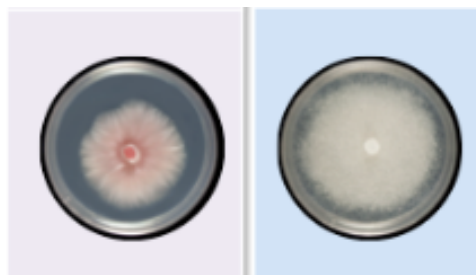
Especie	Familia vegetal	Estructura vegetal
<i>Argemone mexicana</i> L.	Papavareceae	Hojas y tallos
<i>Baccharis salicifolia</i> Pers.	Asteraceae	Hojas, tallos e inflorescencias
<i>Lepidium virginicum</i> L.	Brassicaceae	Hojas, tallos y semillas
<i>Leucaena leucocephala</i> L.	Fabaceae	Hojas
<i>Reseda luteola</i> L.	Resedaceae	Hojas y flores

Todas las especies fueron colectadas en Febrero del 2011.

5.1.2. Microorganismos

Los fitopatógenos *Phytophthora infestans* y *Fusarium oxysporum* (Figura 1), fueron proporcionados por el laboratorio de Alelopatía del Instituto de Ecología, UNAM. Ambos fitopatógenos se mantuvieron en subcultivos subsecuentes en medio de papa-dextrosa-agar cada 24 y 72 h respectivamente, en cámaras de crecimiento con condiciones ambientales controladas a una temperatura de 25°C±2, hasta su utilización en bioensayos de actividad

Figura 1. Aspecto morfológico del micelio de *Fusarium oxysporum*. (cuadro rosa) y *Phytophthora infestans*. (cuadro azul).



5.1.3. Insectos

Los insectos (*Bemisia tabaci*) son de gran importancia agrícola, porque son los principales vectores de más de 100 diferentes tipos de virus que afectan al cultivo de jitomate. Estos insectos fueron colectados en un campo de cultivo de jitomate en el estado de Tlaxcala, se mantuvieron en jaulas con macetas de jitomate y se practicaron dos estrategias de manejo para obtener progenie y utilizar la generación F3 y F4 en condiciones de invernadero, en los respectivos bioensayos (Figura 2 y 3). Los insectos se mantuvieron en dispositivos diseñados para contenerlos y el manejo no les causara estrés, se mantuvieron en un fotoperiodo de 12/12 h (luz/oscuridad), con una temperatura ambiente de $28^{\circ}\text{C}\pm 2$, y una humedad relativa (H.R.) al 75%. Por medio de tubos de venoclisis y con rejilla se transfirieron los insectos a las cámaras de bioensayo.



Figura 2. Protocolo de manejo # 1 para *Bemisia tabaci* en cámaras de crecimiento

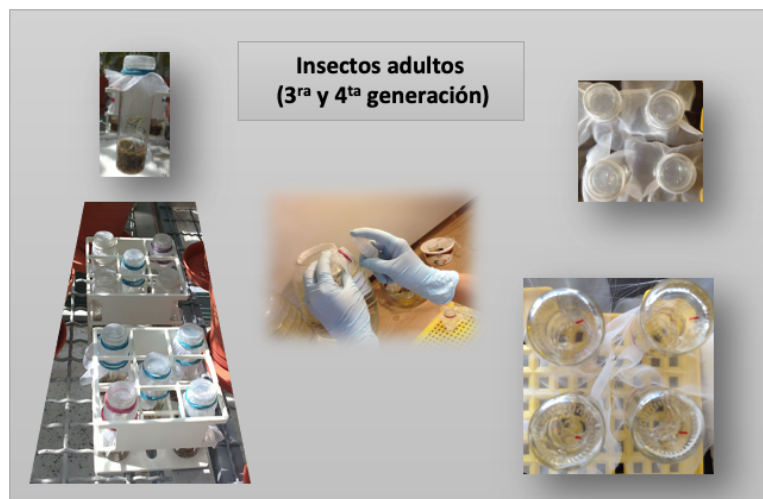


Figura 3. Protocolo de manejo # 2 para *Bemisia tabaci* en cámaras de crecimiento

5.2. Obtención de extractos acuosos y orgánicos.

5.2.1. Extractos acuosos.

En la obtención de los diferentes extractos (acuoso y orgánico) se establecieron los protocolos modificados de acuerdo a Anaya *et al.* (2003), para cada una de las cinco arvenses seleccionadas. En la Figura 4 se representa el esquema general para obtener los extractos acuosos y orgánicos completos.

5.2.1.1. Extractos acuosos de plantas frescas (EAF)

Los extractos acuosos de plantas frescas (EAF, 10% m/v) se prepararon con las partes aéreas de las plantas recolectadas de cada especie (Tabla 1) se lavaron con agua corriente del grifo, luego con agua esterilizada y se cortaron en trozos pequeños. Se extrajeron diez gramos de partes aéreas frescas mediante maceración con 100 mL de agua destilada durante 3 h. El macerado se filtró a través de láminas de gasa médica, posteriormente a través de un papel filtro Wathman (No.4) y finalmente por una membrana Millipore (0,45 μ m) (Anaya *et al.* 2003).

5.2.1.2. Extractos acuosos de plantas secas (EAS)

Los extractos acuosos de plantas secas (EAS, 1 y 2% m/v) se prepararon con las partes aéreas de cada especie, se secaron durante 10 días a temperatura ambiente, luego en estufa a 40°C durante 48 h, y se molieron hasta obtener un polvo fino en un mortero de porcelana, el procedimiento de extracción es el mismo que el anterior para los EAF.

5.2.2. Extractos orgánicos

Los extractos orgánicos se obtuvieron del material deshidratado de las plantas colectadas. El material seco se fraccionó hasta obtener un polvo fino por medio de un molino de grano y se pesaron 500 gr de material seco por cada tratamiento. En un recipiente de cristal (2 L de volumen) se colocaron 500 gr de material seco por cada tratamiento y se adicionaron los disolventes respectivos con polaridad ascendente. Se obtuvieron dos tipos de extractos orgánicos para evaluar en bioensayos por cada especie vegetal, un extracto orgánico con una mezcla homogénea de los disolventes cloruro de metileno y metanol (concentración 1:1 en 1.5 L) y otro extracto orgánico con metanol (100% en 1.5 L). El material vegetal, se dejó macerar por 72 h a temperatura ambiente en agitación constante. El extracto se filtró (papel filtro

Wathman N° 4) y se concentró al vacío por medio de un rotavapor (Büchi, Laboratoriums Technik, Schweiz). El extracto obtenido, se mantuvo en una estufa de secado a 30°C por 24 horas, para eliminar el disolvente residual, y posteriormente se obtuvo el rendimiento por cada extracto, con un promedio de 3 g (peso seco) por cada 100 g de material deshidratado aproximadamente. Cada extracto se mantuvo en un lugar seco, oscuro y a temperatura ambiente para su posterior evaluación en bioensayos de dilución (100 µg/mL) en agar para semillas y en bioensayos de dilución (200 µg/mL) en medio con PDA para fitopatógenos respectivamente (Anaya *et al.*, 2003).

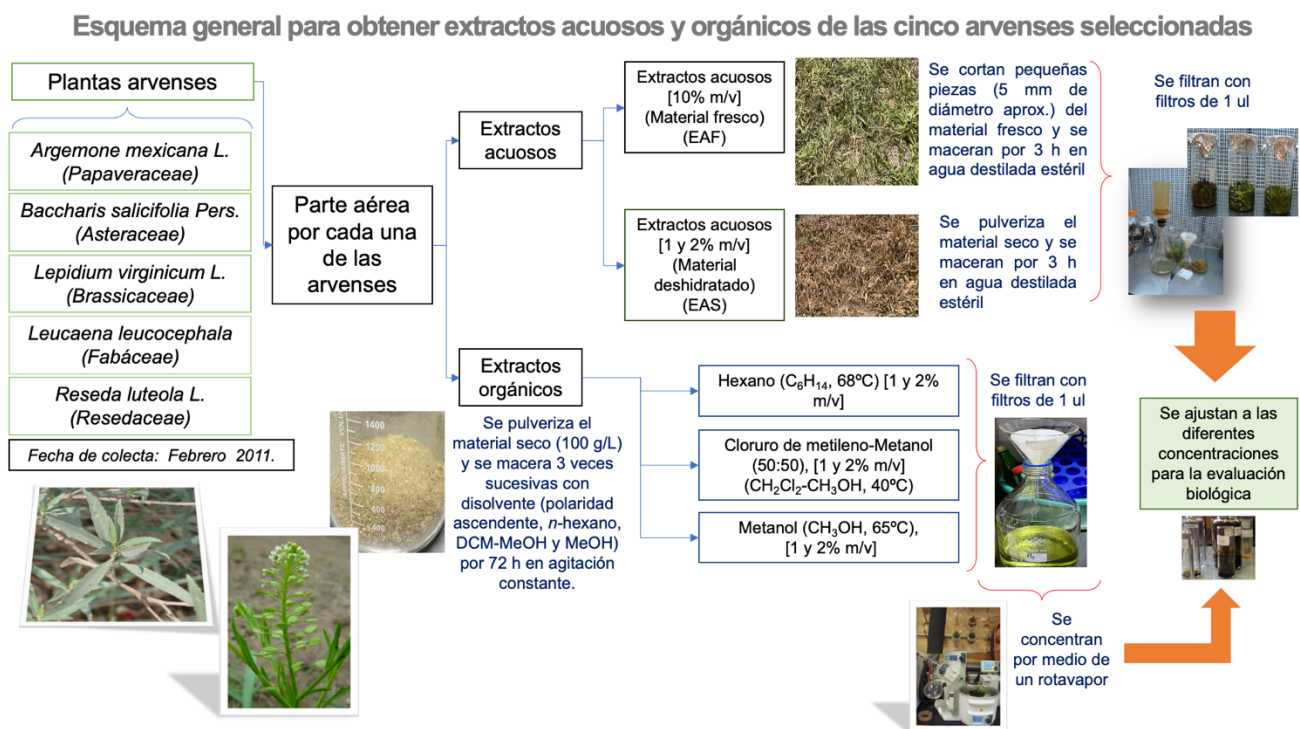


Figura 4. Estrategia general para la obtención de extractos acuosos y orgánicos con polaridad ascendente en cinco especies alelopáticas de Tlaxcala.

5.2.3. Fraccionamiento biodirigido

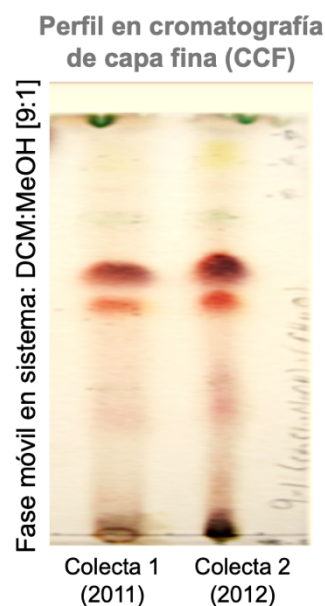
5.2.3.1. Fraccionamiento biodirigido del extracto *BsII* (DCM:MeOH [1:1]) de *B. salicifolia*.

El extracto orgánico de cloruro de metileno-metanol (DCM-MeOH, 1:1) (Figura 5) de *Baccharis salicifolia*, se fraccionó por medio de una cromatografía en columna abierta empacada con gel de sílice para la obtención de fracciones primarias con distintos disolventes y mezclas de éstos, con una polaridad ascendente (Figura 6). La actividad biológica de las

fracciones primarias (*BsIIFpI*.....*BsIIFpXII*) se evaluó con las metodologías ya descritas en Abdel-Monaim *et al.*, (2011). Se seleccionaron las dos fracciones primarias (*BsIIFpXI* y *BsIIFpXII*) (Figura 7) para su fraccionamiento, por ser las más tóxicas para los hongos fitopatógenos seleccionados (Figura 8 y 9) con una cromatografía de columna abierta empacada con gel de sílice para la obtención de fracciones secundarias con distintos disolventes y mezclas de los mismos y con una polaridad ascendente. La actividad biológica de las fracciones secundarias se evaluaron con las metodologías descritas en Abdel-Monaim *et al.*, (2011). Se seleccionó la fracción secundaria más tóxica (*BsIIFpXIIFs38* y *BsIIFpXIIFs41*) para su posterior fraccionamiento (Figura 10 y 11), con una cromatografía de columna abierta empacada con gel de sílice para la obtención de fracciones terciarias (*BsIIFpXIIFs41Ft16*) con diferentes disolventes y mezclas de éstos y con una polaridad ascendente. La actividad biológica de las fracciones primarias, secundarias y terciarias (Figura 12) se evaluó sobre los hongos fitopatógenos *F. oxysporum* y *P. infestans*, con las metodologías descritas en Abdel-Monaim *et al.*, (2011). Todos los datos obtenidos se transformaron por arcoseno ($\arcsin(Y+1)$) y se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA), comparando los tratamientos con el tratamiento control con pruebas de Tukey HSD, ($\alpha=0.05$) e interpretados por el programa *STATISTICA 8*®.

Finalmente, por medio de una cromatografía analítica con gel de sílice (MERCK; 60, F240) se separó la fracción terciaria más tóxica en 12 fracciones (Figura 13). Se seleccionaron las fracciones mayoritarias (1 a 3 mg) para elucidar probables estructuras y dos fracciones terciarias (*BsIIFpXIIFs41Ft16G* y *BsIIFpXIIFs41Ft16H*) se sometieron a pruebas de RMN H^{+1} y RMN C^{13} .

Figura 5. Perfil en cromatografía de capa fina de los extractos orgánicos (DCM-MeOH; 1:1) de *B. salicifolia* (Bs) en dos diferentes colectas (año 2011 y 2012).



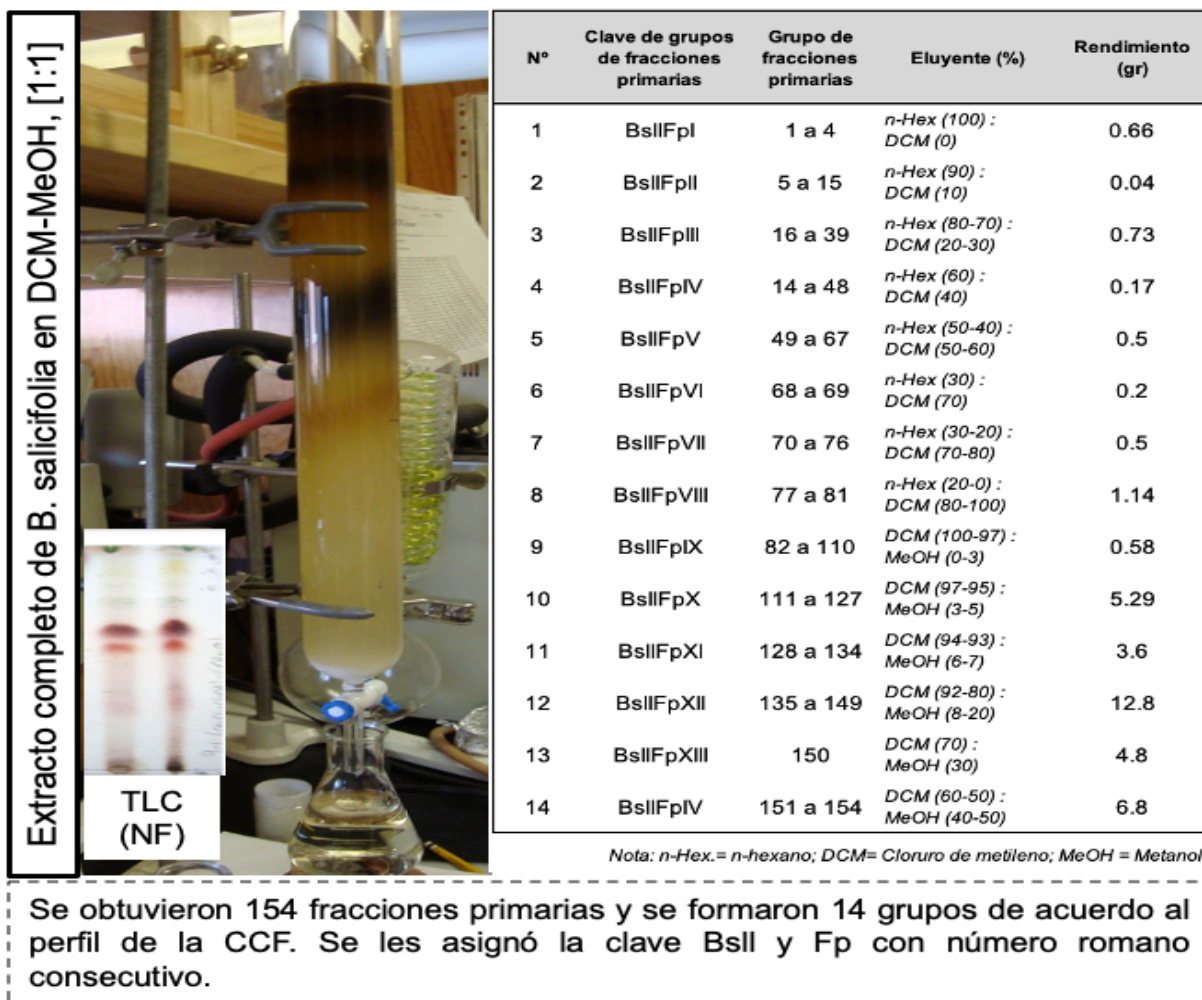
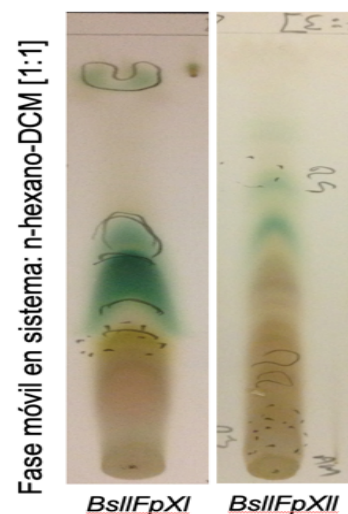
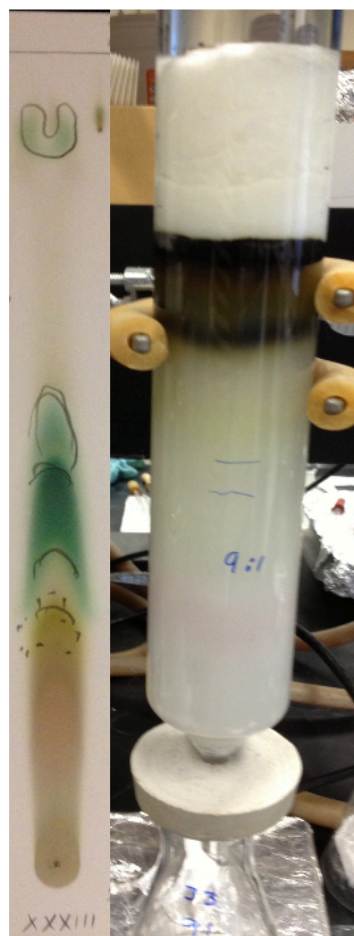


Figura 6. Grupos del fraccionamiento primario (Fp) del extracto completo de *B. salicifolia* (BsII) en cloruro de metileno (DCM) y metanol (MeOH) al [1:1].

Figura 7. Perfil en cromatografía de capa fina de las fracciones primarias *BsII FpXI* y *BsII FpXII* del extracto orgánico (DCM-MeOH; 1:1) de *B. salicifolia*.





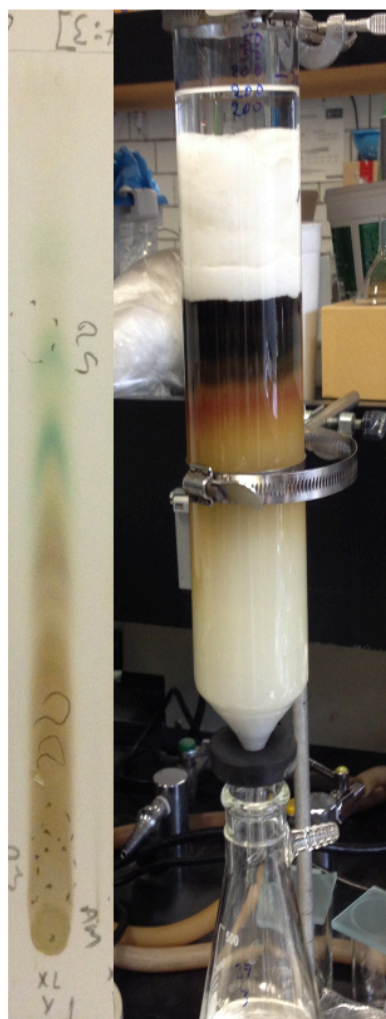
BsIIFpXI

Se obtuvieron 179 fracciones secundarias y se formaron 37 grupos de acuerdo al perfil de la CCF. Se les asignó la clave BsIIFpXI y Fs con número arábigo consecutivo.

Clave de fracciones secundarias	Grupo de fracciones secundarias	Fase móvil en la columna			Rendimiento (gr)
		<i>n</i> -hexano [%]	AcOEt [%]	acetona [%]	
BsIIFpXIFs1	1 a 6	100	-	-	0.005
BsIIFpXIFs2	7 a 9	99	1	-	0.002
BsIIFpXIFs3	10 a 14	98	2	-	0.001
BsIIFpXIFs4	15 a 19	97	3	-	0.010
BsIIFpXIFs5	20 a 22	97-95	3-5	-	0.012
BsIIFpXIFs6	23 a 26	95-90	5-10	-	0.007
BsIIFpXIFs7	27 y 28	90	10	-	0.003
BsIIFpXIFs8	29 y 30	90	10	-	0.002
BsIIFpXIFs9	31 a 33	90	10	-	0.002
BsIIFpXIFs10	34 y 35	80	20	-	0.006
BsIIFpXIFs11	36 y 37	80	20	-	0.005
BsIIFpXIFs12	38 a 41	80	20	-	0.009
BsIIFpXIFs13	42 y 43	80	20	-	0.005
BsIIFpXIFs14	44 a 47	70	30	-	0.011
BsIIFpXIFs15	48 a 50	70	30	-	0.016
BsIIFpXIFs16	51 a 53	70	30	-	0.017
BsIIFpXIFs17	54 a 58	60	40	-	0.039
BsIIFpXIFs18	59 a 63	60	40	-	0.038
BsIIFpXIFs19	64 y 65	50	50	-	0.067
BsIIFpXIFs20	64 a 70	50	50	-	0.027
BsIIFpXIFs21	71 a 73	50	50	-	0.025
BsIIFpXIFs22	74 a 76	40	60	-	0.031
BsIIFpXIFs23	77 a 80	40	60	-	0.098
BsIIFpXIFs24	81 a 86	40-30	60-70	-	0.169
BsIIFpXIFs25	87 y 88	30	70	-	0.036
BsIIFpXIFs26	89 a 92	30	70	-	0.071
BsIIFpXIFs27	93 a 97	20	80	-	0.130
BsIIFpXIFs28	98 a 100	20	80	-	0.077
BsIIFpXIFs29	101 a 103	20	80	-	0.108
BsIIFpXIFs30	104 a 112	10	90	-	0.165
BsIIFpXIFs31	113 a 118	10-0	90-100	-	0.199
BsIIFpXIFs32	119 a 125	-	100	-	0.060
BsIIFpXIFs33	126 a 138	-	100-90	0-10	0.129
BsIIFpXIFs34	139 a 149	-	90-80	10-20	0.105
BsIIFpXIFs35	150 a 159	-	80-50	20-50	0.074
BsIIFpXIFs36	160 a 166	-	50-50	50-50	0.044
BsIIFpXIFs37	167 a 179	-	50-0	50-100	0.092

Nota: AcOEt = Acetato de etilo

Figura 8. Grupos del fraccionamiento secundario de la fracción primaria *BsIIFpXI* de *B. salicifolia*.



BsIIFpXII


Se obtuvieron 202 fracciones secundarias y se formaron 48 grupos de acuerdo al perfil de la CCF. Se les asignó la clave BsIIFpXII y Fs con número arábigo consecutivo.

Clave de fracciones secundarias	Grupo de fracciones secundarias	Fase móvil en la columna			Rendimiento (mg)
		<i>n</i> -hexano [%]	AcOEt. [%]	acetona [%]	
BsIIFpXIIFs1	1 a 3	100	-	-	0.016
BsIIFpXIIFs2	4 y 5	90-80	10-20	-	0.036
BsIIFpXIIFs3	6	80	20	-	0.005
BsIIFpXIIFs4	7	80	20	-	0.003
BsIIFpXIIFs5	8	80	20	-	0.001
BsIIFpXIIFs6	9 a 11	80-70	20-30	-	0.009
BsIIFpXIIFs7	12	70	30	-	0.007
BsIIFpXIIFs8	13 y 14	70	30	-	0.007
BsIIFpXIIFs9	15	60	40	-	0.006
BsIIFpXIIFs10	16	60	40	-	0.005
BsIIFpXIIFs11	17	60	40	-	0.005
BsIIFpXIIFs12	18	60	40	-	0.005
BsIIFpXIIFs13	19 a 22	60	40	-	0.013
BsIIFpXIIFs14	23 a 25	60-50	40-50	-	0.013
BsIIFpXIIFs15	26	50	50	-	0.004
BsIIFpXIIFs16	27 a 29	50	50	-	0.010
BsIIFpXIIFs17	30 a 32	50	50	-	0.010
BsIIFpXIIFs18	33	50	50	-	0.006
BsIIFpXIIFs19	34	50	50	-	0.003
BsIIFpXIIFs20	35 a 37	40	60	-	0.010
BsIIFpXIIFs21	38 y 39	40	60	-	0.008
BsIIFpXIIFs22	40	40	60	-	0.003
BsIIFpXIIFs23	41 a 44	40	60	-	0.017
BsIIFpXIIFs24	45	40	60	-	0.009
BsIIFpXIIFs25	46	40	60	-	0.009
BsIIFpXIIFs26	47	40	60	-	0.009
BsIIFpXIIFs27	48	30	70	-	0.016
BsIIFpXIIFs28	49 a 51	30	70	-	0.039
BsIIFpXIIFs29	52 y 53	30	70	-	0.035
BsIIFpXIIFs30	54	30	70	-	0.021
BsIIFpXIIFs31	55 y 56	30	70	-	0.036
BsIIFpXIIFs32	57	30	70	-	0.016
BsIIFpXIIFs33	58 a 60	30	70	-	0.038
BsIIFpXIIFs34	61 a 65	30	70	-	0.065
BsIIFpXIIFs35	66 y 67	20	80	-	0.048
BsIIFpXIIFs36	68	20	80	-	0.027
BsIIFpXIIFs37	69	20	80	-	0.036
BsIIFpXIIFs38	70 y 71	20	80	-	0.093
BsIIFpXIIFs39	72 a 85	20	80	-	0.864
BsIIFpXIIFs40	86 a 93	20	80	-	0.469
BsIIFpXIIFs41	94 a 120	20	80	-	0.737
BsIIFpXIIFs42	121 a 125	10	90	-	0.138
BsIIFpXIIFs43	126 y 127	10	90	-	0.045
BsIIFpXIIFs44	128 a 154	10-00	90-100	-	0.898
BsIIFpXIIFs45	155 a 167	-	90-60	10-40	0.630
BsIIFpXIIFs46	168 a 180	-	60-40	40-60	0.596
BsIIFpXIIFs47	181 a 190	-	40	60	0.202
BsIIFpXIIFs48	191 a 202	-	40-00	60-100	0.610

Nota: AcOEt = Acetato de etilo

Figura 9. Grupos del fraccionamiento secundario de la fracción primaria *BsIIFpXII* de *B. salicifolia*.

Grupos y rendimientos de las fracciones terciarias obtenidas de la fracción BslIFpXlIFs38 con diferentes disolventes (polaridad ascendente), rendimientos expresados en miligramos.



Grupos de fracciones	Disolventes y porción en que eluyeron las fracciones	Rendimientos (mg)	Grupos de fracciones	Disolventes y porción en que eluyeron las fracciones	Rendimientos (mg)
BslIFpXlIFs38Ft1	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (100:00)	1.0	BslIFpXlIFs38Ft12	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (40:60)	12.0
BslIFpXlIFs38Ft2	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (90:10)	19.0	BslIFpXlIFs38Ft13	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (20:80)	6.0
BslIFpXlIFs38Ft3	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (80:20)	2.0	BslIFpXlIFs38Ft14	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (00:100)	15.0
BslIFpXlIFs38Ft4	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (60:40)	3.0	BslIFpXlIFs38Ft15	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (00:100)	23.0
BslIFpXlIFs38Ft5	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (60:40)	15.0	BslIFpXlIFs38Ft16	Acetato de etilo-acetona (60:40)	21.0
BslIFpXlIFs38Ft6	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (60:40)	6.0	BslIFpXlIFs38Ft17	Acetato de etilo-acetona (30:70)	3.0
BslIFpXlIFs38Ft7	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (60:40)	84.0	BslIFpXlIFs38Ft18	Acetato de etilo-acetona (30:70)	3.0
BslIFpXlIFs38Ft8	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (60:40)	42.0	BslIFpXlIFs38Ft19	Acetato de etilo-acetona (00:100)	9.0
BslIFpXlIFs38Ft9	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (50:50)	105.0	BslIFpXlIFs38Ft20	Acetona -metanol (50:50)	31.0
BslIFpXlIFs38Ft10	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (50:50)	12.0	BslIFpXlIFs38Ft21	Acetona -metanol (50:50)	7.0
BslIFpXlIFs38Ft11	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (50:50)	8.0	BslIFpXlIFs38Ft22	Acetona -metanol (00:100)	7.0

BslIFpXlIFs38

Se obtuvieron 232 fracciones terciarias y se formaron 22 grupos de acuerdo al perfil de la CCF. Se les asignó la clave BslIFpXlIFs38 y Ft con número arábigo consecutivo.

Figura 10. Grupos del fraccionamiento terciario del grupo BslIFpXlIFs38 de *B. salicifolia*.

Grupos y rendimientos de las fracciones terciarias obtenidas de la fracción BslIFpXlIFs41 con diferentes disolventes (polaridad ascendente), rendimientos expresados en miligramos.



Grupos de fracciones	Disolventes y porción en que eluyeron las fracciones	Rendimientos (mg)	Grupos de fracciones	Disolventes y porción en que eluyeron las fracciones	Rendimientos (mg)
BslIFpXlIFs41Ft1	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (100:00)	0.1	BslIFpXlIFs41Ft14	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (40:60)	13.0
BslIFpXlIFs41Ft2	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (80:20)	2.0	BslIFpXlIFs41Ft15	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (40:60)	164.0
BslIFpXlIFs41Ft3	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (60:40)	1.0	BslIFpXlIFs41Ft16	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (20:80) (0:100)	137.0
BslIFpXlIFs41Ft4	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (60:40)	1.0	BslIFpXlIFs41Ft17	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (60:40)	19.0
BslIFpXlIFs41Ft5	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (60:40)	2.0	BslIFpXlIFs41Ft18	acetato de etilo-acetona (80:20)	25.0
BslIFpXlIFs41Ft6	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (60:40)	2.0	BslIFpXlIFs41Ft19	acetato de etilo-acetona (60:40)	25.0
BslIFpXlIFs41Ft7	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (60:40)	19.0	BslIFpXlIFs41Ft20	acetato de etilo-acetona (60:40)	4.0
BslIFpXlIFs41Ft8	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (60:40)	2.0	BslIFpXlIFs41Ft21	acetato de etilo-acetona (60:40)	6.0
BslIFpXlIFs41Ft9	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (50:50)	45.0	BslIFpXlIFs41Ft22	acetato de etilo-acetona (60:40)	2.0
BslIFpXlIFs41Ft10	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (40:60)	130.0	BslIFpXlIFs41Ft23	acetato de etilo-acetona (60:40)	28.0
BslIFpXlIFs41Ft11	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (40:60)	3.0	BslIFpXlIFs41Ft24	acetato de etilo-acetona (60:40), (50:50), (30:70)	26.0
BslIFpXlIFs41Ft12	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (40:60)	9.0	BslIFpXlIFs41Ft25	acetato de etilo-acetona (00:100)	6.0
BslIFpXlIFs41Ft13	<i>n</i> -hexano-acetato de etilo (40:60)	28.0	BslIFpXlIFs41Ft26	Acetona-metanol (50:50)	112.0

BslIFpXlIFs41

Se obtuvieron 292 fracciones terciarias y se formaron 26 grupos de acuerdo al perfil de la CCF. Se les asignó la clave BslIFpXlIFs41 y Ft con número arábigo consecutivo.

Figura 11. Grupos del fraccionamiento terciario del grupo BslIFpXlIFs41 de *B. salicifolia*.

Esquema general del fraccionamiento del extracto completo de *B. salicifolia* en DCM-MeOH [1:1]

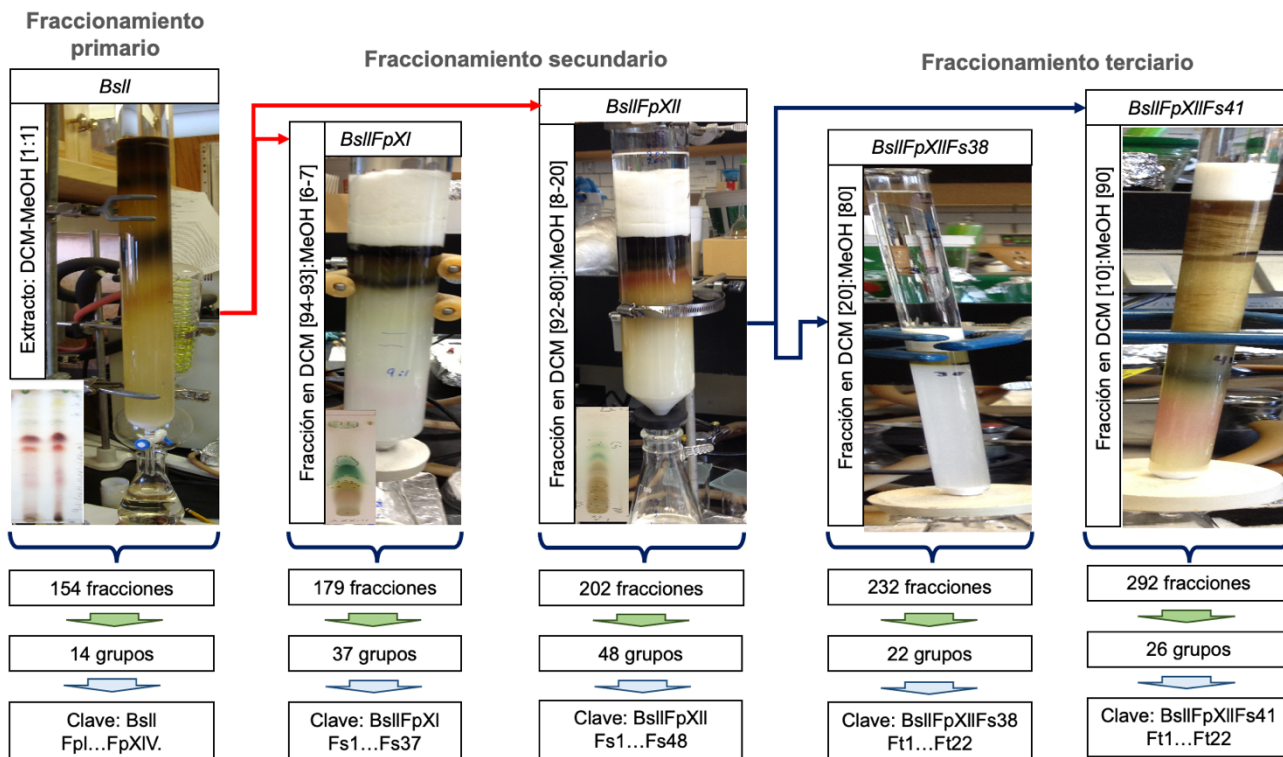


Figura 12. Esquema general del fraccionamiento (primario, secundario y terciario) del extracto orgánico completo (DCM-MeOH, 1:1) de *B. salicifolia*.

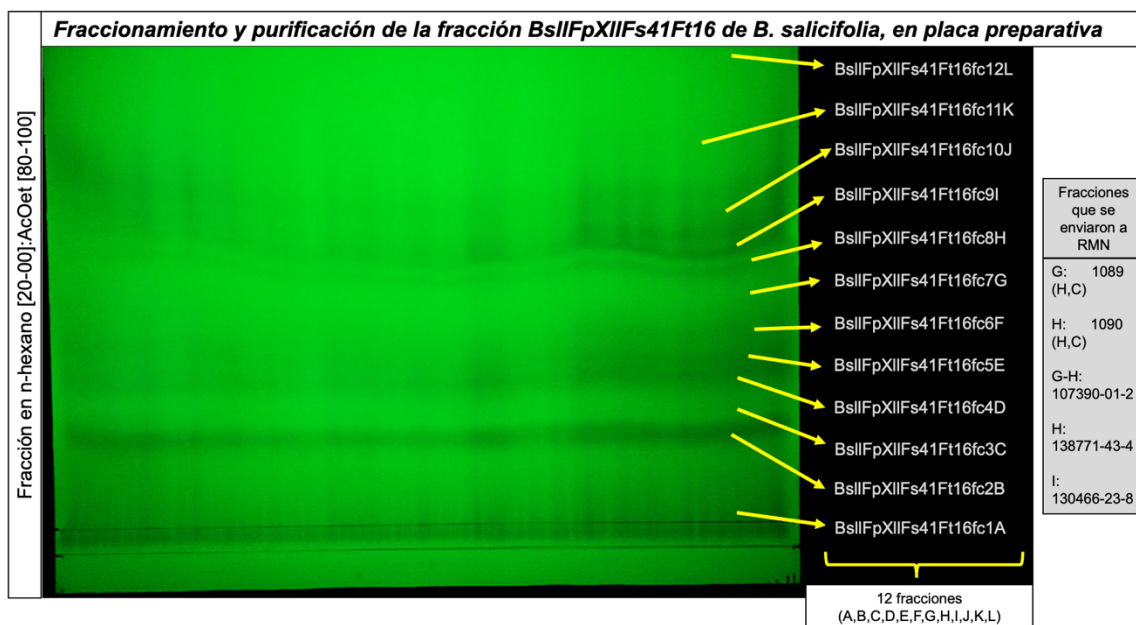


Figura 13. Fraccionamiento y purificación del grupo *BslIFpXIIFs41Ft16* de *B. salicifolia*.

5.2.3.2. Análisis por CLAR acoplada a Espectrometría de Masas.

Se liofilizaron muestras de los extractos acuosos de plantas secas (EAS) de *Baccharis salicifolia* y *Lepidium virginicum* y se analizaron posteriormente con un HPLC-ESI-QTOF-MS (Modelo G6530BA, Agilent Tech. Santa Clara, California. EE. UU.). Se utilizó una columna Eclipse XDB-C18 (Agilent, 150 mm x 4,6 mm x 5 µm), y una fase móvil, A: CH₃CN/MeOH (50:50) y B: H₂O con CH₃COOH 0,1% en un gradiente (0-10 min 25% A, 75% B; 10-15 min 100% B, 0.300 mL/min 600.00 bar; 16.5-20 min 100% B, 1 mL/min 600.00 bar).

5.3. Bioensayos

5.3.1. Ensayos de fitotoxicidad

5.3.1.1. *In vitro*.

El efecto de los extractos de plantas sobre la germinación de las semillas y el crecimiento de las raíces se evaluó como se publicó anteriormente (Anaya *et al.* 1990) utilizando las plantas modelo *Amaranthus hypochondriacus* L. (Amaranthaceae), *Lactuca sativa* L. (Asteraceae) y *Solanum lycopersicum* L. var. *saladette* (Solanáceae). Los extractos de EAF (10% m/v), EAS (1% m/v), DCM-MeOH y MeOH (1% m/v) se mezclaron con agar y se vertieron en placas de Petri esterilizadas (12 mL por placa) permitiendo la solidificación. Como controles se utilizaron agar con agua destilada, DCM-MeOH 1: 1 y MeOH. Las semillas de las tres malezas modelo se compraron en un mercado local en Coyoacán, Ciudad de México, México. Los bioensayos se realizaron en placas Petri de 6 cm. Se sembraron diez semillas de cada planta modelo directamente sobre el agar de cada placa de Petri siguiendo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Los tratamientos se mantuvieron en cámaras de crecimiento, a una temperatura de 27°C±1, humedad relativa de 70-75% y en oscuridad total. La germinación de la semilla y la longitud desde la punta de la raíz hasta el comienzo del hipocótilo (tallo) se midieron 24 h después del tratamiento para *A. hypochondriacus* (Amaranto), 48 h para *L. sativa* (Lechuga) y 72 h para *S. lycopersicum* (Jitomate) (Anaya *et al.* 2003). Los extractos acuosos de partes aéreas frescas (EAF, 10% m/v) y secas (EAS, 1% m/v) y los extractos orgánicos (1% m/v) de las plantas ruderales: *Argemone mexicana*, *Baccharis salicifolia*, *Lepidium virginicum*, *Leucaena leucocephala*, y *Reseda luteola* se analizaron para determinar la inhibición de la germinación de semillas y el alargamiento de la radícula de

amaranto, lechuga y jitomate . La presión osmótica (PO) se midió con un Osmómetro de punto de congelación (Osmette A. Precision System, Inc).

5.3.1.2. Invernadero.

Se utilizaron los extractos que mostraron la mayor actividad alelopática EAS de *B. salicifolia* y *L. virginicum* para determinar su fitotoxicidad en plántulas de jitomate (8 y 12 semanas de edad). Se obtuvieron semillas de jitomate (var. saladette) en un mercado local en Coyoacán de la CDMX, se realizó la siembra en charolas de germinación de poliestireno con 72 cavidades. Como medio de germinación se uso turba comercial (Peat moss ®), con un pH 5.0. Se depositaron tres semillas por cavidad y a las 72 h inicio la germinación. Al alcanzar el 80% de germinación se eliminaron dos plántulas por cada cavidad para favorecer el crecimiento. El trasplante se realizó cuando las plántulas obtuvieron 10 días de edad después de la germinación. Estas se trasplantaron a macetas de 27.7 cm x 30.5 cm x 30.5 cm (Altura x Ancho x Largo; con capacidad de volumen de 13.4 L) de 30 cm de diámetro con plato. Como sustrato inerte esterilizado: Peat moss ®, agrolita y perlita (3:1:1) con un pH 5.0, manteniéndolas en condiciones de invernadero de vidrio con malla sombra (de monofilamentos de polietileno de alta densidad con aditivos UV, refleja 70% rayos ultravioleta), se mantuvieron las plántulas en un rango de humedad relativa al interior del invernadero de 50 a 75%, temperatura de 27 a 32°C, fotoperíodo de 14:10h (luz/oscuridad), se aplicó solución hidropónica (solución nutritiva Steiner, cada 48 h) con nitrógeno en nitratos (aniones) y amonio (cationes) con 12 (mmol/L), fosforo con 1 (mmol/L) y potasio 7 (mmol/L), con un potencial osmótico de -0.072 (Mpa), el pH se ajustó a 5.0 usando ácido sulfúrico (Gastelum-Osorio *et al.* 2013). Se trataron plántulas de 8 y 12 semanas de edad con extractos acuosos EAS (concentración de 1 y 2% m/v) suministrando 50 mL cada 72 h durante cuatro meses hasta la floración y agua destilada estéril (ADE) cada 24 h. El tratamiento control se aplicó ADE (50 mL) cada 24 h. El efecto fitotóxico se midió sobre la base de los rendimientos de biomasa seca y se comparó con el control con un diseño completamente aleatorizado. Los experimentos se realizaron dos veces.

5.3.2. Ensayos contra hongos fitopatógenos *F. oxysporum* y *P. infestans*.

5.3.2.1. Con extractos acuosos y orgánicos.

Ambos hongos fitopatógenos (*F. oxysporum* y *P. infestans*), fueron proporcionados por el Laboratorio de Alelopatía, Instituto de Ecología, UNAM. Cada fitopatógeno se mantuvo en

medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) con subcultivos consecutivos de colonias (inóculos de 4 mm de diámetro) cada 72 h, hasta su evaluación en bioensayos de fungitoxicidad con el método de dilución en PDA. Inóculos de micelio (4 mm de diámetro) de los fitopatógenos (*F. oxysporum* y *P. infestans*) se transfirieron a cajas Petri con extractos acuosos al 2% (m/v), extractos orgánicos obtenidos con cloruro de metileno-metanol (200 µg/ml) y extractos orgánicos obtenidos con metanol (200 µg/ml). Las plantas seleccionadas: *A. mexicana*, *B. salicifolia*, *L. virginicum*, *L. leucocephala* y *R. luteola*, se evaluaron con cada uno de los fitopatógenos. Los tratamientos control de los extractos acuosos se evaluaron con PDA y agua destilada; en los tratamientos control de los extractos orgánicos con PDA y con cloruro de metileno-metanol (200 µg/ml) y PDA con metanol (200 µg/ml). Se evaluaron 10 inóculos por tratamiento, con un diseño completamente al azar. Los tratamientos se mantuvieron en cámaras de crecimiento (Thermo Scientific, LINDBERG/BLUE M; BF518228C-1) a una temperatura de 25°C±1, humedad relativa del 70-75%, y en oscuridad total. El indicador a medir, fue el efecto de inhibición sobre el crecimiento radial del micelio por cada fitopatógeno, midiendo el diámetro de crecimiento por cada repetición, obteniendo los resultados a las 24 h para *P. infestans* y a las 72 h para *F. oxysporum*. El valor se obtuvo de acuerdo a la siguiente formula:

Porcentaje de inhibición = (tratamiento control – tratamiento con extracto) / tratamiento control por 100 (Abdel-Monaim et al. 2011).

Todos los datos obtenidos se transformaron por arcoseno (arcoseno de Y+1) y analizaron con un ANOVA, comparando los tratamientos con el control y utilizando pruebas de Tukey HSD ($P=0.05$) interpretados los resultados con *STATISTICA 8*®.

5.3.3. Ensayos contra *B. tabaci*

5.3.3.1. Invernadero

Los insectos *B. tabaci*, se colectaron en un campo de cultivo de jitomate en el estado de Tlaxcala, y de acuerdo con el protocolo de Ortega-Arenas *et al.* (2006) modificado; se mantuvieron los insectos seleccionados en la fase del estadio de 2º y 3º *“instar”* o *“estadio”* para los bioensayos, bajo condiciones ambientales controladas con un fotoperiodo de 12/12 h (luz/oscuridad), temperatura ambiente de 28°C ± 2 y una H.R. al 75%. Un aspecto importante en el manejo de estos insectos, fue diseñar dispositivos para su manejo sin que les provocará estrés, ya que esto puede interferir en los resultados de los bioensayos. Para la captura y

evaluación del efecto de los extractos en los dispositivos con plántulas de jitomate e insectos, se utilizó una pajilla (sondas de venoclisis para uso médico) y una red de tela (poros menores a 1 mm), por la cual, se realizó la succión con aire, se atrapaban y trasladaban los insectos a los diferentes dispositivos con los diferentes tratamientos (Figura 2 y 3). Se utilizaron 10 individuos por unidad experimental con cinco repeticiones por tratamiento, tomando datos cada tres horas por un lapso de 13 horas.

5.3.4. Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó mediante análisis estadístico de varianza (ANOVA de una sola vía) utilizando un diseño completamente aleatorio. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey con un nivel de probabilidad de 0.05, utilizando el software STATISTICA, versión 8. y para las gráficas se utilizó el software PRISMA, 2019.

6. Resultados

6.1. Actividad fitotóxica inducida por extractos acuosos y orgánicos

6.1.1. Inhibición en la germinación de semillas

La presión osmótica de los extractos acuosos de las partes aéreas frescas (EAF, 10% m/v) y secas (EAS, 1% m/v) de las plantas ruderales, mostraron valores entre 27 y 50 mosm/L. Los EAS de *B. salicifolia* y *L. virginicum* probados al 1% m/v inhibieron completamente la germinación de semillas de todas las plantas modelo probadas (amaranto, lechuga y jitomate) (Figuras 14 y 15). El EAS de *Argemone mexicana* a la misma concentración también anuló la germinación de semillas de lechuga y jitomate. Por otro lado, los extractos de EAF mostraron menos actividad que los EAS, a excepción de *B. salicifolia*, que mostró una fuerte inhibición (60 a 100%) en las tres plantas modelo (Figura 14). Los extractos orgánicos DCM-MeOH (1:1) y MeOH probados al 1% (m/v) no tuvieron un efecto inhibitorio (Tabla 2 en Anexo: Material suplementario) en la germinación de plantas modelo como lo indica el análisis estadístico.

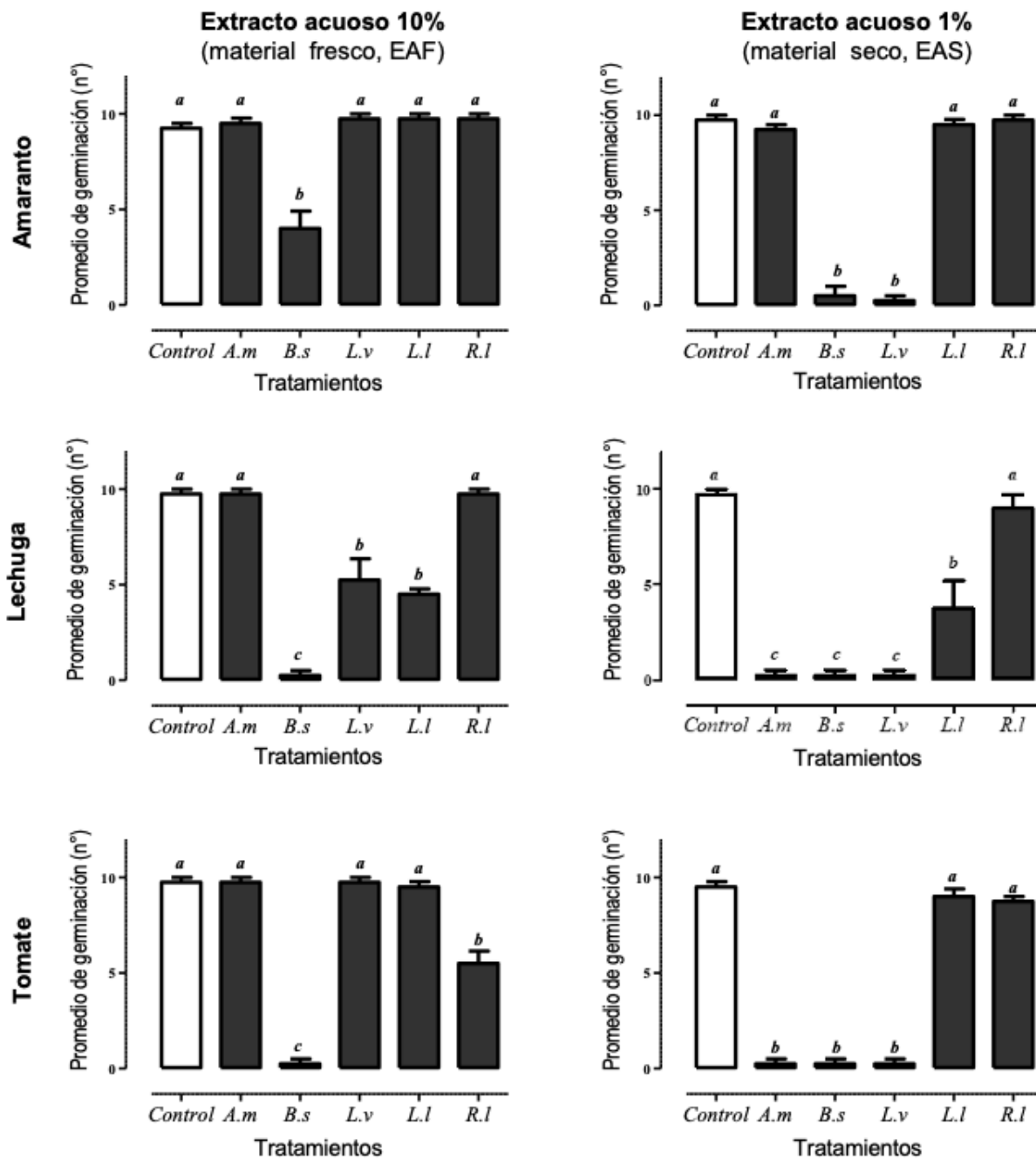


Figura 14. Ensayo de inhibición de la germinación en amaranto, lechuga y jitomate por EAF (10%) y EAS (1%) de las plantas ruderales *Argemone mexicana* (Am), *Baccharis salicifolia* (Bs), *Lepidium virginicum* (Lv), *Leucaena leucocephala* (Ll), y *Reseda luteola* (Rl). Medias \pm error estándar de 4 experimentos con n=10. Una letra diferente indica significancia estadística $P < 0.05$.

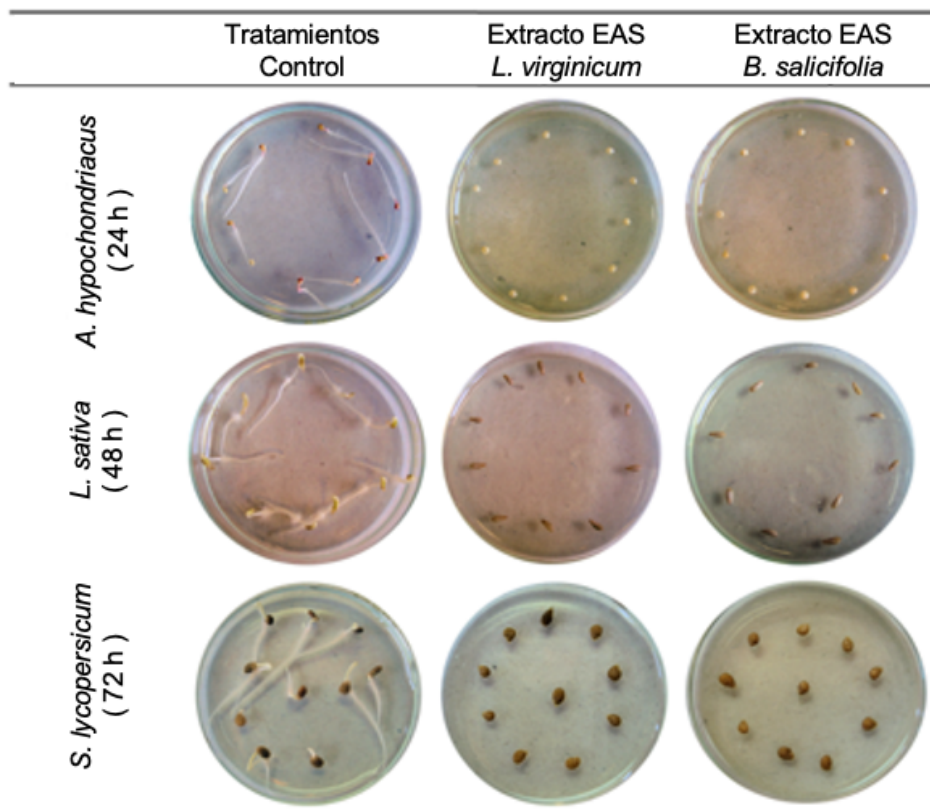


Figura 15. Inhibición de la germinación en semillas de amaranto, lechuga y jitomate por extractos acuosos secos (EAS 1%) de plantas de *Baccharis salicifolia* y *Lepidium virginicum*, registrados a las 24, 48 y 72 horas, respectivamente. El experimento se repitió dos veces y se muestra una fotografía representativa.

6.1.2. Inhibición en la elongación de la radícula

Los extractos acuosos (EAF y EAS) de todas las plantas ruderales inhibieron la elongación de la radícula entre un 10 y un 100% en las especies objetivo en comparación con los tratamientos de control. Los más notables fueron los extractos EAS de *B. salicifolia* y *L. virginicum*, que inhibieron en un 100% (Figura 16) el alargamiento de la radícula de las tres plantas modelo (amaranto, lechuga y jitomate). La mayoría de los extractos EAF mostraron menor inhibición que los extractos de EAS, pero en el caso de *B. salicifolia*, el EAS mantuvo una actividad fitotóxica del 100% sobre la lechuga y el jitomate, pero menos sobre el amaranto (64% de inhibición). EAF y EAS de *R. luteola* mostraron un 100% de inhibición solo sobre la lechuga (Figura 16).

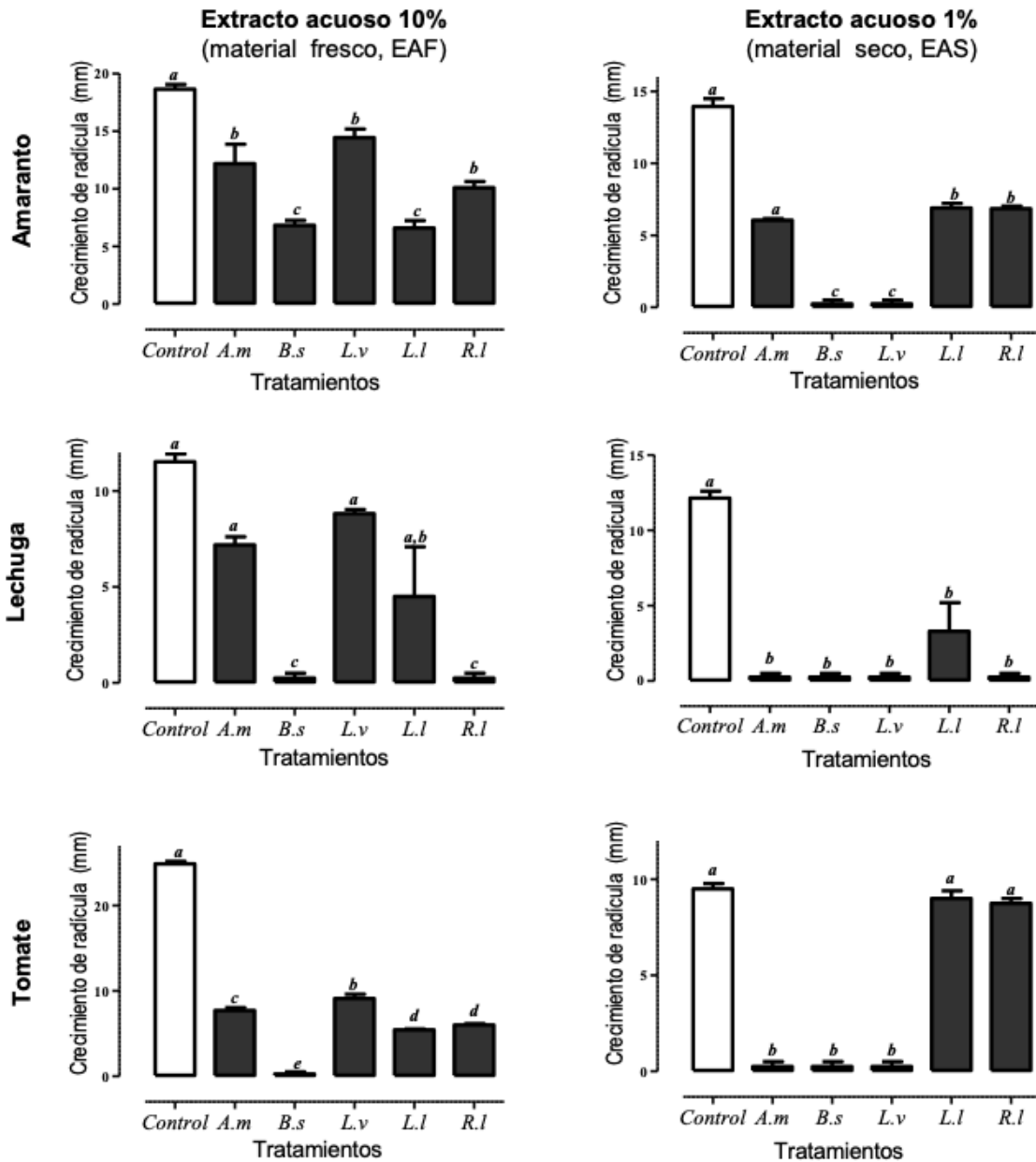


Figura 16. Ensayo de inhibición del alargamiento de radícula en amaranto, lechuga y tomate por EAF (10%) y (EAS 1%) de las plantas *Argemone mexicana* (Am), *Baccharis salicifolia* (Bs), *Lepidium virginicum* (Lv), *Leucaena leucocephala* (Ll) y *Reseda luteola* (Rl). Medias \pm error estándar de 4 experimentos con n=10. Una letra diferente indica significancia estadística $P < 0.05$.

Por otro lado, generalmente la mayoría de los extractos orgánicos de todas las plantas ruderales mostraron un efecto inhibitorio bajo o nulo de la elongación de la radícula en comparación con los tratamientos control (Figura 17). Los extractos de DCM-MEOH (1:1) y MeOH de *A. mexicana* mostraron una inhibición del 48% sobre el jitomate. El extracto DCM-MEOH (1:1) de *B. salicifolia* inhibió en 24 y 27% las elongaciones de las radículas de jitomate y amaranto. Curiosamente, algunos extractos orgánicos estimularon el crecimiento de la radícula, por ejemplo, los extractos DCM-MEOH (1:1) y MEOH de *B. salicifolia* estimularon la elongación de la radícula de la lechuga en un 49 y un 46% respectivamente en comparación con los tratamientos de control (Figura 17).

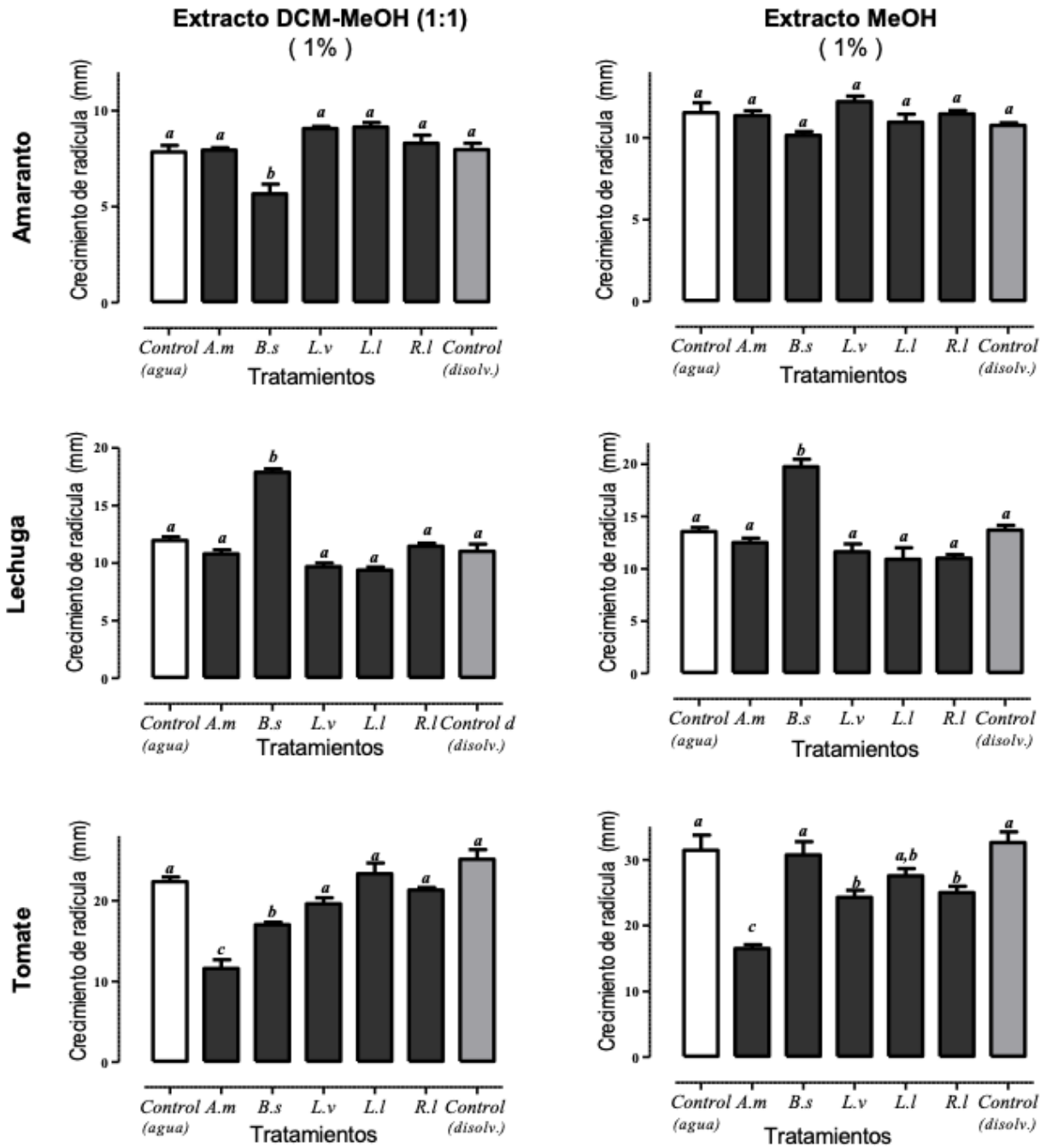


Figura 17. Ensayo de inhibición en la elongación de la radícula en amaranto, lechuga y jitomate por extractos de DCM-MEOH y MeOH (1%) de las plantas *Argemone mexicana* (Am), *Baccharis salicifolia* (Bs), *Lepidium virginicum* (Lv), *Leucaena leucocephala* (Ll), y *Reseda luteola* (Rl). Medias \pm error estándar de 4 experimentos con n=10. Una letra diferente indica significancia estadística $P < 0.05$.

6.1.3. Fitotoxicidad de extractos en plántulas de jitomate

Los extractos que presentaron mayor potencial alelopático se probaron en plántulas de jitomate de 8 y 12 semanas de edad. El EAS de *B. salicifolia* y *L. virginicum* al 1 y 2% no afectó el rendimiento de biomasa cuando se comparó con el tratamiento de control (Figura 18), lo que indica que estos extractos no tienen un efecto nocivo para las plántulas de jitomate.

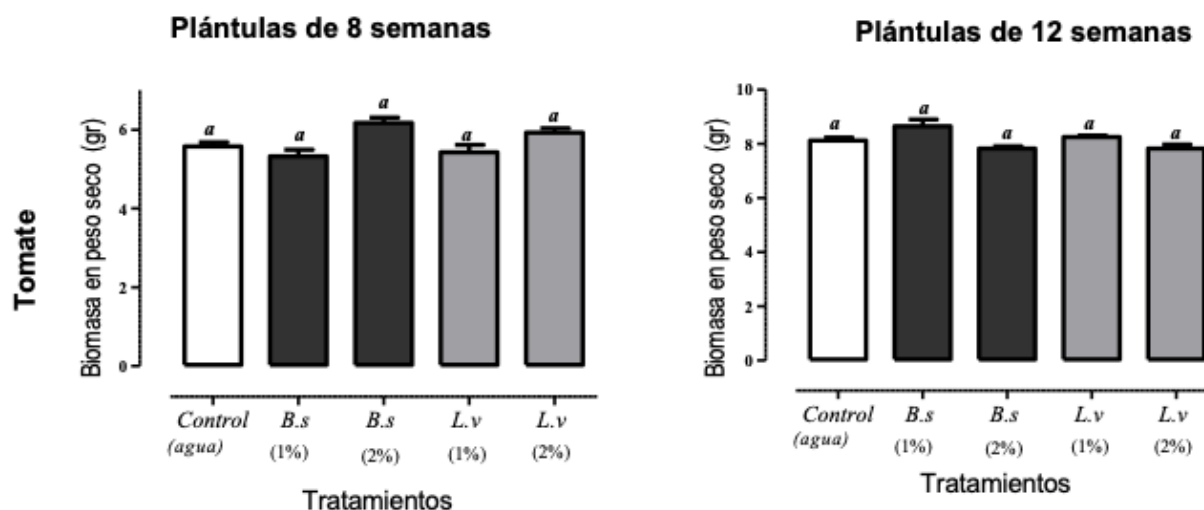
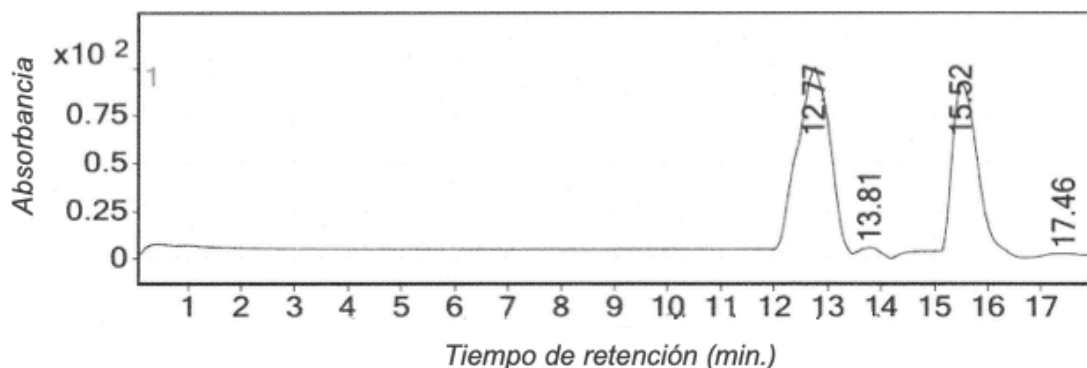


Figura 18. Efecto sobre la biomasa de plántulas de tomate (8 y 12 semanas de edad) por EAS (1 y 2%) de las plantas ruderales *Baccharis salicifolia* (B.s) y *Lepidium virginicum* (L.v). Medias \pm error estándar de 4 experimentos con n=10. Una letra diferente indica significancia estadística $P < 0.05$.

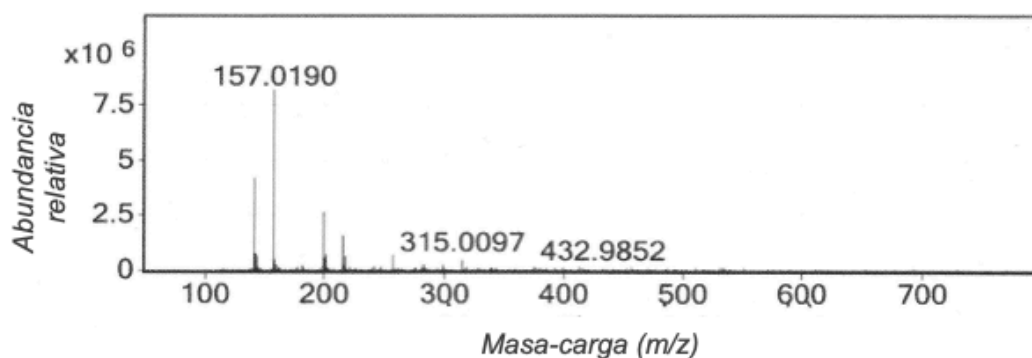
6.1.4. Análisis por CLAR acoplada a espectrometría de masas de los extractos acuosos de *B. salicifolia* y *L. virginicum*

Los extractos con la mayor actividad alopática y baja fitotoxicidad para el cultivo de jitomate, fueron analizados por Cromatografía Líquida de Alta Resolución-Espectrometría de Masas (HPLC-ESI-QTOF-MS). El cromatograma de *B. salicifolia* EAS mostró dos picos mayoritarios con un tiempo de retención de 12,77 y 15,52 minutos, con m/z 432,9852 y m/z 725,4692 respectivamente (Figura 19). El cromatograma HPLC-ESI-QTOF-MS de *L. virginicum* EAS mostró también dos picos mayoritarios con un tiempo de retención de 12,16 y 14,90 minutos con m/z 532,9326 y m/z 527,1659 respectivamente (Figura 20).

a) **Cromatograma del extracto acuoso de *B. salicifolia*. Picos principales (tiempos de retención 12.77 y 15.52 minutos)**



b) **Espectro de masas del compuesto con tiempo de retención de 12.77 minutos.**



c) **Espectro de masas del compuesto con tiempo de retención de 15.52 minutos.**

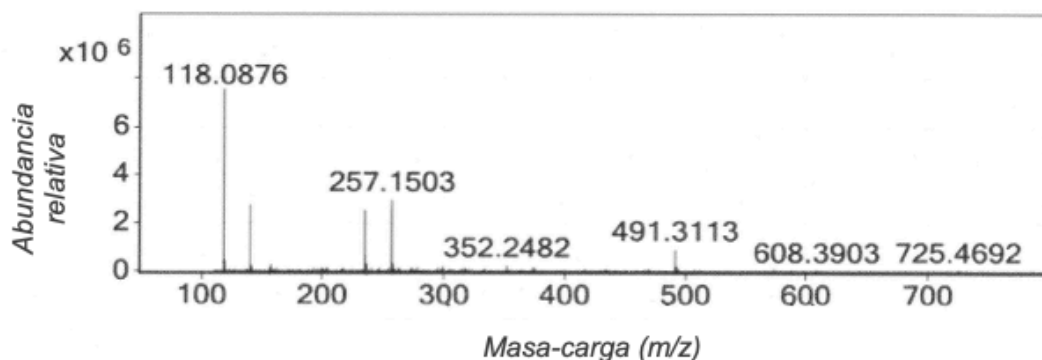
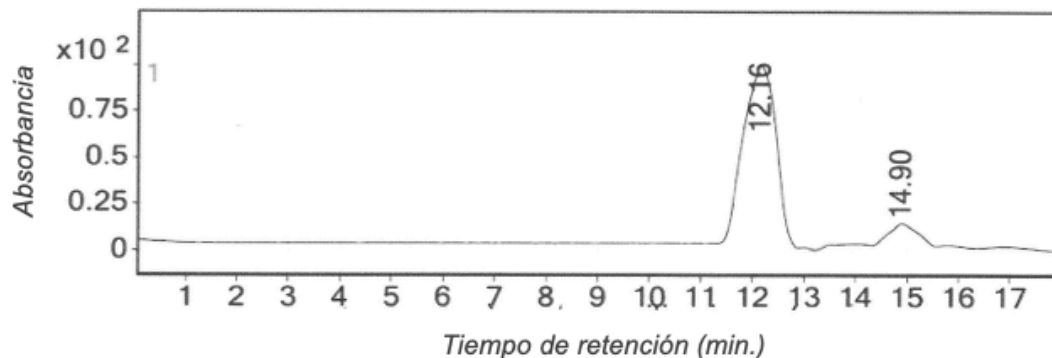
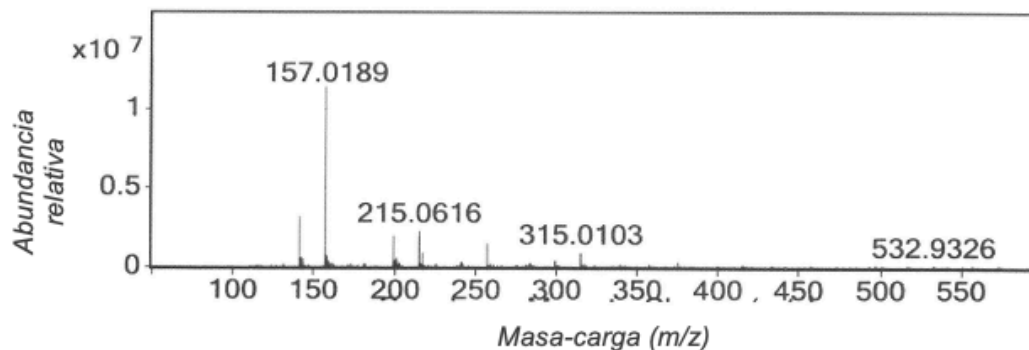


Figura 19. a) Cromatograma HPLC-ESI-QTOF-MS del extracto acuoso liofilizado (EAS) de *Baccharis salicifolia*. Tiempos de retención de los picos principales: 12.77 y 15.52 minutos; b) espectro de masas del pico de 12.77 min; y c) espectro de masas del pico de 15.52 min.

a) **Cromatograma del extracto acuoso de *L. virginicum*. Picos principales (tiempos de retención 12.16 y 14.90 minutos)**



b) **Espectro de masas del compuesto con tiempo de retención de 12.16 minutos.**



c) **Espectro de masas del compuesto con tiempo de retención de 14.90 minutos.**

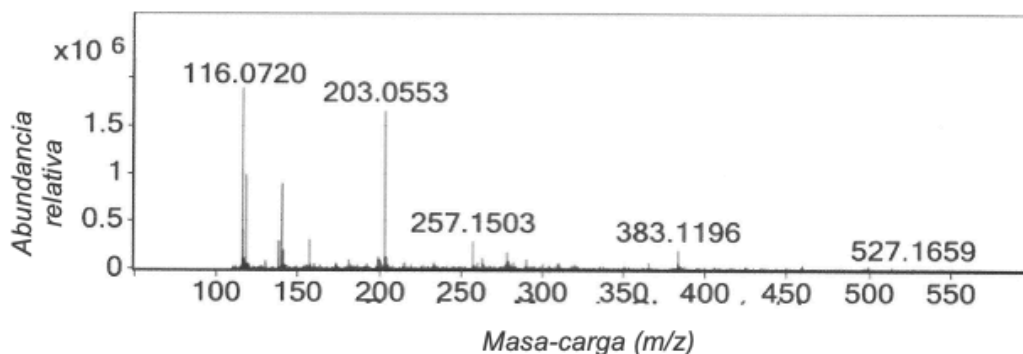


Figura 20. a) Cromatograma HPLC-ESI-QTOF-MS del extracto acuoso liofilizado (EAS) de *Lepidium virginicum*. Tiempos de retención de los picos principales: 12.16 y 14.90 minutos; b) espectro de masas del pico de 12.16 min; y c) espectro de masas del pico de 14.90 min.

6.2. Efecto tóxico de los extractos acuosos (2%) y orgánicos (2%) sobre el fitopatógeno *Fusarium oxysporum*

6.2.1. Efecto sobre el crecimiento radial en *F. oxysporum*

El extracto acuoso de *L. virginicum* inhibió (100%) el crecimiento del micelio; sin embargo, los extractos orgánicos de esta planta no mostraron un efecto fungitóxico (Tabla 3). En general, los extractos (acuoso y orgánicos) de las otras plantas alelopáticas evaluadas no tuvieron efectos o fueron muy bajos sobre este fitopatógeno, con excepción de los extractos orgánicos de *B. salicifolia*, los cuales inhibieron en 35-39% el crecimiento radial del fitopatógeno (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de los extractos acuosos (2%) y de los extractos orgánicos (200 µg/mL) de cinco plantas alelopáticas en el crecimiento (porcentaje de inhibición) del micelio de *Fusarium oxysporum*, a las 72h. Resultados comparados con el tratamiento control del extracto acuoso (PDA con agua destilada estéril) y los tratamientos control de los extractos orgánicos (PDA con cloruro de metileno y metanol (1:1; 200 µg/mL) y PDA con metanol (200 µg/mL).

TRATAMIENTOS PLANTAS ALELOPÁTICAS	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO RADIAL DEL MICELIO		
	EXTRACTO ACUOSO	EXTRACTO ORGÁNICO	
	MATERIAL VEGETAL SECO (m/v) (2%)	CLORURO DE METILENO-METANOL (1:1) (200 µg/mL)	METANOL (100) (200 µg/mL)
<i>Argemone mexicana</i>	0	0	4
<i>Baccharis salicifolia</i>	7	35*	39*
<i>Lepidium virginicum</i>	100*	0	4
<i>Leucaena leucocephala</i>	0	0	4
<i>Reseda luteola</i>	0	0	3

*=Diferencia significativa ($p=0.05$); $n=10$

6.2.2. Efecto Fraccionamiento dirigido del extracto orgánico de *B. salicifolia* sobre el crecimiento radial de *F. oxysporum*.

El extracto orgánico (cloruro de metileno-metanol, 1:1;) de *Baccharis salicifolia* se fraccionó por cromatografía en columna y se obtuvieron 154 fracciones primarias. Estas se agruparon en 14 grupos de acuerdo con su perfil en placas cromatográficas. Los grupos mayoritarios (fracciones primarias de los grupos *BsIIFpV*, *BsIIFpVI*, *BsIIFpVII*, *BsIIFpVIII*,

BsIIFpIX, *BsIIFpX*, *BsIIFpXI*, *BsIIFpXII*, *BsIIFpXIII* y *BsIIFpXIV*) se evaluaron con el método de dilución en PDA sobre el crecimiento radial del micelio del fitopatógeno *F. oxysporum* (Figura 21). El grupo *BsIIFpXI* y el grupo *BsIIFpXII* inhibieron significativamente el crecimiento radial del fitopatógeno; siendo el grupo *BsIIFpXII* el de mayor efecto inhibitorio (44%) en *F. oxysporum* y con un poco menos de efecto de inhibición el grupo *BsIIFpXI* (Figura 21). El grupo *BsIIFpXI* y el grupo *BsIIFpXII*, presentaron el mayor efecto fungitóxico, y se fraccionaron por medio de una cromatografía de columna abierta empacada con gel de sílice cada uno. Las fracciones secundarias del grupo *BsIIFpXII*, inhibieron en mayor medida que las fracciones secundarias del grupo *BsIIFpXI* (Figura 22 y 23). Las fracciones secundarias del grupo *BsIIFpXII*, se agruparon en 48 grupos, destacando tres grupos (grupo *BsIIFpXIIFs38*, grupo *BsIIFpXIIFs40* y grupo *BsIIFpXIIFs41*) para su siguiente fraccionamiento. El grupo *BsIIFpXIIFs38* y el grupo *BsIIFpXIIFs41*, se fraccionaron por medio de una columna abierta de cromatografía de gel de sílice y se evaluaron sobre el crecimiento radial de los fitopatógenos (Tabla 4). Todas las fracciones de los grupos *BsIIFpXIIFs38* y *BsIIFpXIIFs41* inhibieron significativamente a ambos fitopatógenos con respecto al control (Tabla 4). La fracción *BsIIFpXIIFs38Ft7*, resaltó por inhibir 83% a ambos fitopatógenos comparado con la fracción *BsIIFpXIIFs38Ft9* (grupo *BsIIFpXIIFs38*) (Figura 24). Las fracciones terciarias del grupo *BsIIFpXIIFs41* (Tabla 4) mostraron mayor efecto de inhibición (81-100%) en el crecimiento radial sobre el fitopatógeno *P. infestans*, comparado con el fitopatógeno *F. oxysporum* (Figura 26). En este grupo, *BsIIFpXIIFs41*, resaltó que entre más se fraccionaron sus extractos, mayor fue el efecto de inhibición sobre el fitopatógeno *P. infestans*, sin embargo para el hongo fitopatógeno *F. oxysporum* (Tabla 4), entre más se fraccionó, menos actividad tóxica se registró.

Porcentaje (%) de inhibición por el fraccionamiento biodirigido del extracto DCM-MeOH (1:1), en el crecimiento radial de los fitopatógenos *P. infestans* y *F. oxysporum*.

N°	Clave de grupos de fracciones primarias	Grupo de fracciones primarias	Eluyente (%)	Rendimiento (gr)	Porcentaje (%) de inhibición en el crecimiento radial de los fitopatógenos:		Perfil en cromatografía de capa fina, de las dos fracciones más prometedoras, para su subsecuente fraccionamiento biodirigido.
					<i>P. infestans</i>	<i>F. oxysporum</i>	
1	BsIIFpI	1 a 4	<i>n</i> -Hex (100) : DCM (0)	0.66	0	0	<p>Fracción primaria del extracto DCM-MeOH (1:1) de <i>B. salicifolia</i>.</p>
2	BsIIFpII	5 a 15	<i>n</i> -Hex (90) : DCM (10)	0.04	0	0	
3	BsIIFpIII	16 a 39	<i>n</i> -Hex (80-70) : DCM (20-30)	0.73	0	0	
4	BsIIFpIV	14 a 48	<i>n</i> -Hex (60) : DCM (40)	0.17	0	0	
5	BsIIFpV	49 a 67	<i>n</i> -Hex (50-40) : DCM (50-60)	0.5	7	8	
6	BsIIFpVI	68 a 69	<i>n</i> -Hex (30) : DCM (70)	0.2	4	0	
7	BsIIFpVII	70 a 76	<i>n</i> -Hex (30-20) : DCM (70-80)	0.5	12	0	
8	BsIIFpVIII	77 a 81	<i>n</i> -Hex (20-0) : DCM (80-100)	1.14	4	0	
9	BsIIFpIX	82 a 110	DCM (100-97) : MeOH (0-3)	0.58	2	0	
10	BsIIFpX	111 a 127	DCM (97-95) : MeOH (3-5)	5.29	52	0	
11	BsIIFpXI	128 a 134	DCM (94-93) : MeOH (6-7)	3.6	45	17	
12	BsIIFpXII	135 a 149	DCM (92-80) : MeOH (8-20)	12.8	74	44	
13	BsIIFpXIII	150	DCM (70) : MeOH (30)	4.8	0	0	
14	BsIIFpIV	151 a 154	DCM (60-50) : MeOH (40-50)	6.8	0	0	

Figura 21. Fraccionamiento primario biodirigido del extracto DCM-MeOH (1:1) de *B. salicifolia* mediante cromatografía de columna abierta para bioensayos sobre *F. oxysporum* y *P. infestans*.

Porcentaje (%) de inhibición por el fraccionamiento biodirigido de la fracción BsIIFpXI, en el crecimiento radial de los fitopatógenos *P. infestans* y *F. oxysporum*.

Clave de fracciones secundarias	Grupo de fracciones secundarias	Rendimiento (gr)	Porcentaje (%) de inhibición en el crecimiento radial de los fitopatógenos:	
			<i>P. infestans</i>	<i>F. oxysporum</i>
BsIIFpXIFs14	44 a 47	0.011	41	50
BsIIFpXIFs17	54 a 58	0.039	53	56
BsIIFpXIFs24	81 a 86	0.169	46	50
BsIIFpXIFs25	87 y 88	0.036	48	29
BsIIFpXIFs27	93 a 97	0.130	67	67
BsIIFpXIFs29	101 a 103	0.108	69	45
BsIIFpXIFs30	104 a 112	0.165	73	60
BsIIFpXIFs31	113 a 118	0.199	51	36
BsIIFpXIFs33	126 a 138	0.129	51	30
BsIIFpXIFs34	139 a 149	0.105	50	30

Figura 22. Fraccionamiento secundario biodirigido del grupo *BsIIFpXI* de *B. salicifolia* mediante cromatografía de columna abierta para bioensayos sobre *F. oxysporum* y *P. infestans*.

Porcentaje (%) de inhibición por el fraccionamiento biodirigido de la fracción BsIIFpXII, en el crecimiento radial de los fitopatógenos *P. infestans* y *F. oxysporum*.

Clave de fracciones secundarias	Grupo de fracciones secundarias	Rendimiento (gr)	Porcentaje (%) de inhibición en el crecimiento radial de los fitopatógenos:	
			<i>P. infestans</i>	<i>F. oxysporum</i>
BsIIFpXIIFs23	41 a 44	0.017	39	48
BsIIFpXIIFs27	48	0.016	87	64
BsIIFpXIIFs29	52 y 53	0.035	77	70
BsIIFpXIIFs31	55 y 56	0.036	77	70
BsIIFpXIIFs33	58 a 60	0.038	64	65
BsIIFpXIIFs35	66 y 67	0.048	53	64
BsIIFpXIIFs37	69	0.036	79	70
BsIIFpXIIFs38	70 a 71	0.093	79	70
BsIIFpXIIFs39	72 a 85	0.864	11	62
BsIIFpXIIFs40	86 a 93	0.469	100	96
BsIIFpXIIFs41	94 a 120	0.737	100	98
BsIIFpXIIFs42	121 a 125	0.138	94	70

Figura 23. Fraccionamiento secundario biodirigido del grupo *BsIIFpXII* de *B. salicifolia* mediante cromatografía de columna abierta para bioensayos sobre *F. oxysporum* y *P. infestans*.

Tabla 4. Efecto de los fracciones terciarias (200 µg/mL) de las muestras secundarias *BsIIFpXIIFs38* y *BsIIFpXIIFs41* del extracto completo DCM-MeOH (1:1) de *Baccharis salicifolia*, sobre crecimiento radial del micelio de los fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora infestans*, a las 72 h y 24 h respectivamente. Resultados obtenidos al comparar con tratamientos control para cada una de las fracciones (cada tratamiento control consistió en PDA con las diferentes mezclas de disolventes, con lo que se obtuvo cada grupo de fracciones terciarias).

TRATAMIENTOS	Porcentaje de inhibición de fracciones terciarias (200 µg/mL) sobre el crecimiento radial del micelio de los fitopatógenos.	
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
<i>Fracciones terciarias de la fracción secundaria BsIIFpXIIFs38</i>		
<i>BsIIFpXIIFs38Ft7</i>	83*	83*
<i>BsIIFpXIIFs38Ft9</i>	58*	73*
<i>Fracciones terciarias de la fracción secundaria BsIIFpXIIFs41</i>		
<i>BsIIFpXIIFs41Ft10</i>	64*	81*
<i>BsIIFpXIIFs41Ft15</i>	56*	88*
<i>BsIIFpXIIFs41Ft16</i>	22*	100*

Diferencia significativa ($P=0.05$); $N=10$

Efecto de inhibición de las fracciones terciarias *BsIIFpXIIFs38Ft7* y *BsIIFpXIIFs38Ft9*, con una concentración de 200 µg/mL sobre el crecimiento radial de los fitopatógenos *P. infestans* y *F. oxysporum*. (Datos comparados con el tratamiento control y expresados en porcentaje).

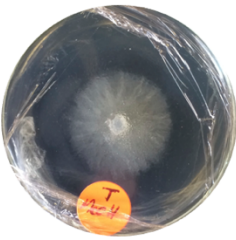

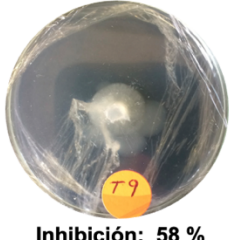

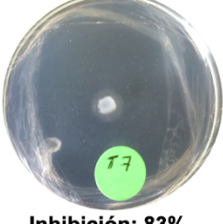
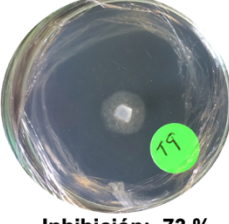
Fitopatógenos	Tratamientos		
	Control	<i>BsIIFpXIIFs38Ft7</i>	<i>BsIIFpXIIFs38Ft9</i>
<i>F. oxysporum</i>		 Inhibición: 83 %	 Inhibición: 58 %
<i>P. infestans</i>		 Inhibición: 83%	 Inhibición: 73 %

Figura 24. Efecto de los grupos terciarios (Ft7 y Ft9) del grupo *BsIIFpXIIFs38* en ambos fitopatógenos.

6.3. Efecto de los extractos acuosos, orgánicos y del fraccionamiento biodirigido sobre el oomiceto *Phytophthora infestans*

6.3.1. Actividad biológica en el fitopatógeno *P. infestans*

Los extractos acuosos 2% (m/v) y orgánicos [cloruro de metileno-metanol (200 µg/mL) y metanol (200 µg/mL)] de las cinco especies vegetales seleccionadas, se evaluaron contra el oomiceto *Phytophthora infestans* a las 24 h. El extracto acuoso (2%) de *L. virginicum* fue el que mostró el mayor efecto inhibitorio (100%) sobre el crecimiento radial del micelio; sin embargo, los extractos orgánicos de esta planta no tuvieron ningún efecto fungitóxico (Tabla 5). La mayoría de los extractos acuosos y orgánicos [cloruro de metileno-metanol (200 µg/mL) y metanol (200 µg/mL)] de las plantas evaluadas, no tuvieron efectos fungitóxicos sobre este fitopatógeno; sin embargo, en el caso *B. salicifolia* el extracto orgánico (DCM-MeOH, 1:1; 200 µg/mL) inhibió significativamente (50%) el crecimiento radial de *P. infestans*. También, el extracto acuoso de esta especie mostro 4 % de inhibición (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto de los extractos acuosos (2%) y de los extractos orgánicos (200 µg/mL) de cinco plantas alelopáticas, sobre el crecimiento del micelio de *Phytophthora infestans*, a las 24 h. Resultados comparados con el tratamiento control (el tratamiento control acuoso consistió en PDA con agua destilada estéril, y el tratamiento control de los extractos orgánicos consistió en PDA con cloruro de metileno y metanol (1:1; 200 µg/mL) y PDA con metanol (200 µg/mL).

PLANTAS ALELOPÁTICAS	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO RADIAL DEL MICELIO		
	EXTRACTO ACUOSO	EXTRACTO ORGÁNICO	
	MATERIAL VEGETAL SECO (m/v) (2%)	CLORURO DE METILENO-METANOL (1:1) (200 µg/mL)	METANOL (100) (200 µg/mL)
<i>Argemone mexicana</i>	4	0	0
<i>Baccharis salicifolia</i>	44*	50*	0
<i>Lepidium virginicum</i>	100*	0	0
<i>Leucaena leucocephala</i>	0	0	0
<i>Reseda luteola</i>	0	0	0

Diferencia significativa ($P=0.05$); $N=10$

6.3.2. Fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico de *B. salicifolia*

Del extracto orgánico (cloruro de metileno-metanol, 1:1;) de *Baccharis salicifolia* se obtuvieron 154 fracciones primarias, las cuales se agruparon en 14 grupos de acuerdo con su perfil en placas de cromatografía. Los grupos mayoritarios (fracciones primarias de los grupos *BsIIFpV*, *BsIIFpVI*, *BsIIFpVII*, *BsIIFpVIII*, *BsIIFpIX*, *BsIIFpX*, *BsIIFpXI*, *BsIIFpXII*, *BsIIFpXIII* y *BsIIFpXIV*) se evaluaron con el método de dilución en PDA sobre el crecimiento radial del micelio de *P. infestans* (Figura 21). El grupo *BsIIFpXI* y el grupo *BsIIFpXII* inhibieron significativamente el crecimiento radial del fitopatógeno; siendo el grupo *BsIIFpXII* el de mayor efecto de inhibición (74% de inhibición) sobre el fitopatógeno *P. infestans* y con menor efecto de inhibición (45%) el grupo *BsIIFpXI* (Figura 21).

El grupo *BsIIFpXI* y el grupo *BsIIFpXII*, por ser los de mayor efecto fungitóxico, se fraccionaron por medio de una cromatografía de columna abierta empacada con gel de sílice cada uno. Las fracciones secundarias del grupo *BsIIFpXII*, registraron mayor efectividad tóxica sobre *P. infestans*; y las fracciones secundarias del grupo *BsIIFpXI* fueron más efectivas contra el hongo fitopatógeno *F. oxysporum* (Figura 22 y 23). Las fracciones secundarias del grupo *BsIIFpXII*, se agruparon en tres grupos (grupo *BsIIFpXIIFs38*, grupo *BsIIFpXIIFs40* y grupo

BsIIFpXIIFs41). El grupo *BsIIFpXIIFs38* y el grupo *BsIIFpXIIFs41*, se fraccionaron por medio de una columna abierta de cromatografía de gel de sílice y se evaluaron sobre el crecimiento radial del fitopatógeno *P. infestans*. Las fracciones mayoritarias (Figura 10 y 11) inhibieron significativamente al fitopatógeno (Tabla 4), resaltando que las fracciones terciarias del grupo *BsIIFpXIIFs41* (Figura 25) inhibieron más que las fracciones terciarias del grupo *BsIIFpXIIFs38* (Tabla 4, Figura 24 y 26) al fitopatógeno *P. infestans*; resaltando que la fracción terciaria *BsIIFpXIIFs41Ft16*, inhibió (100%) completamente el crecimiento radial del micelio del fitopatógeno (Tabla 4; Figura 24 y 26) .

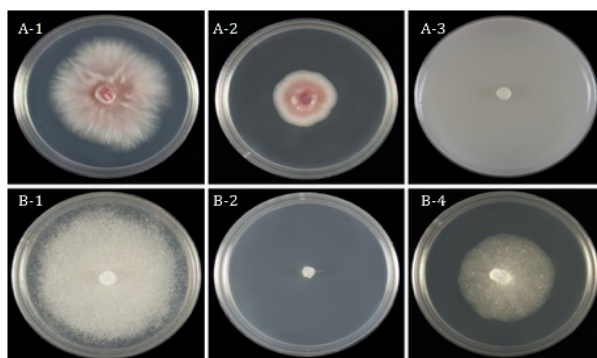


Figura 25. Efecto del grupo *BsIIFpXIIFs41* sobre el crecimiento radial de ambos fitopatógenos *F.oxysporum* (A) y *P. infestans* (B), a las 72 y 48 h respectivamente. Los números son los diferentes tratamientos, Control, PDA (1), Fracción *BsIIFpXIIFs41* (2), Fungicida comercial (3) y Oomicida comercial (4)

Efecto de inhibición de las fracciones terciarias *BsIIFpXIIFs41Ft10*, *BsIIFpXIIFs41Ft15* y *BsIIFpXIIFs41Ft16*, con una concentración de 200 µg/mL sobre el crecimiento radial de los fitopatógenos *P. infestans* y *F. oxysporum*. (Datos comparados con el tratamiento control y expresados en porcentaje).


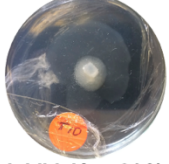
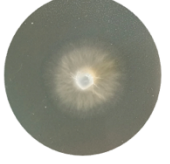
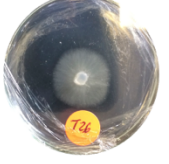
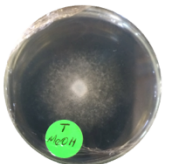
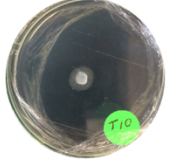
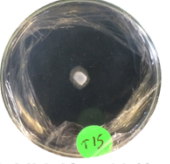
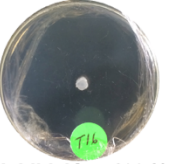
Fitopatógenos	Tratamientos			
	Control	<i>BsIIFpXIIFs41Ft10</i>	<i>BsIIFpXIIFs41Ft15</i>	<i>BsIIFpXIIFs41Ft16</i>
<i>F. oxysporum</i>		 Inhibición: 64 %	 Inhibición: 56 %	 Inhibición: 22 %
<i>P. infestans</i>		 Inhibición: 81 %	 Inhibición: 88 %	 Inhibición: 100 %

Figura 26. Efecto de los grupos del fraccionamiento terciario (Ft10, Ft15 y Ft16) del grupo *BsIIFpXIIFs41* con actividad en ambos fitopatógenos.

6.4. Análisis químico de las fracciones bioactivas del fraccionamiento biodirigido

La fracción primaria *BsIIFpVIII* presentó cristales transparentes (tipo aguja) adheridos al vial en condiciones de temperatura ambiente. Estos cristales se disolvieron en cloruro de metileno y al evaporarse el disolvente, nuevamente se formaron estos cristales (Figura 27). Estos cristales se analizaron por RMN. Se obtuvieron los espectros RMNH y RMNC¹³ y masas. De acuerdo con sus espectros, se dedujo que se trata de la molécula espinasterol (Figura 28) Nuestros valores de RNM concordaron con lo previamente reportado para el mismo compuesto aislado en otras especies vegetales (Tabla 6 y 7). Los datos de EM también concordaron con los previamente reportados (Choi *et al* 2003).

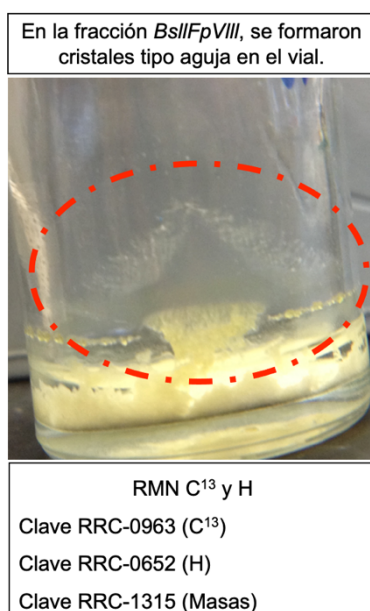


Figura 27. Cristales de espinasterol.

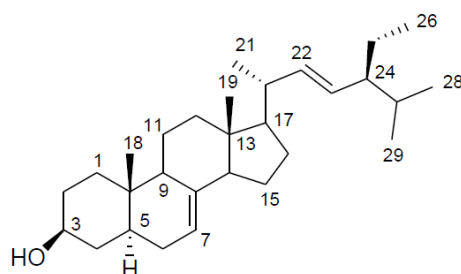


Figura 28. Estructura química del espinasterol

El espectro de RMN C^{13} (Figura 29, Tabla 6) mostró señales para 29 carbonos. Cuatro de los cuales son para los carbonos de dos dobles ligaduras en 117.44 (C-7) y 139.54 (C-8), así como en 138.15 (C-22) y 129.41 (C-23). También se observó la señal para el C-3 base del alcohol en 71.06 ppm. La presencia de seis metilos se evidenció por las señales en 12.04, 13.04, 21.09, 21.37, 25.39 y 12.24 ppm para los carbonos 18, 19, 21, 26, 28 y 29, respectivamente. El resto de las señales fueron para carbonos cuaternarios (C), metilos (CH) y metilenos (CH_2).

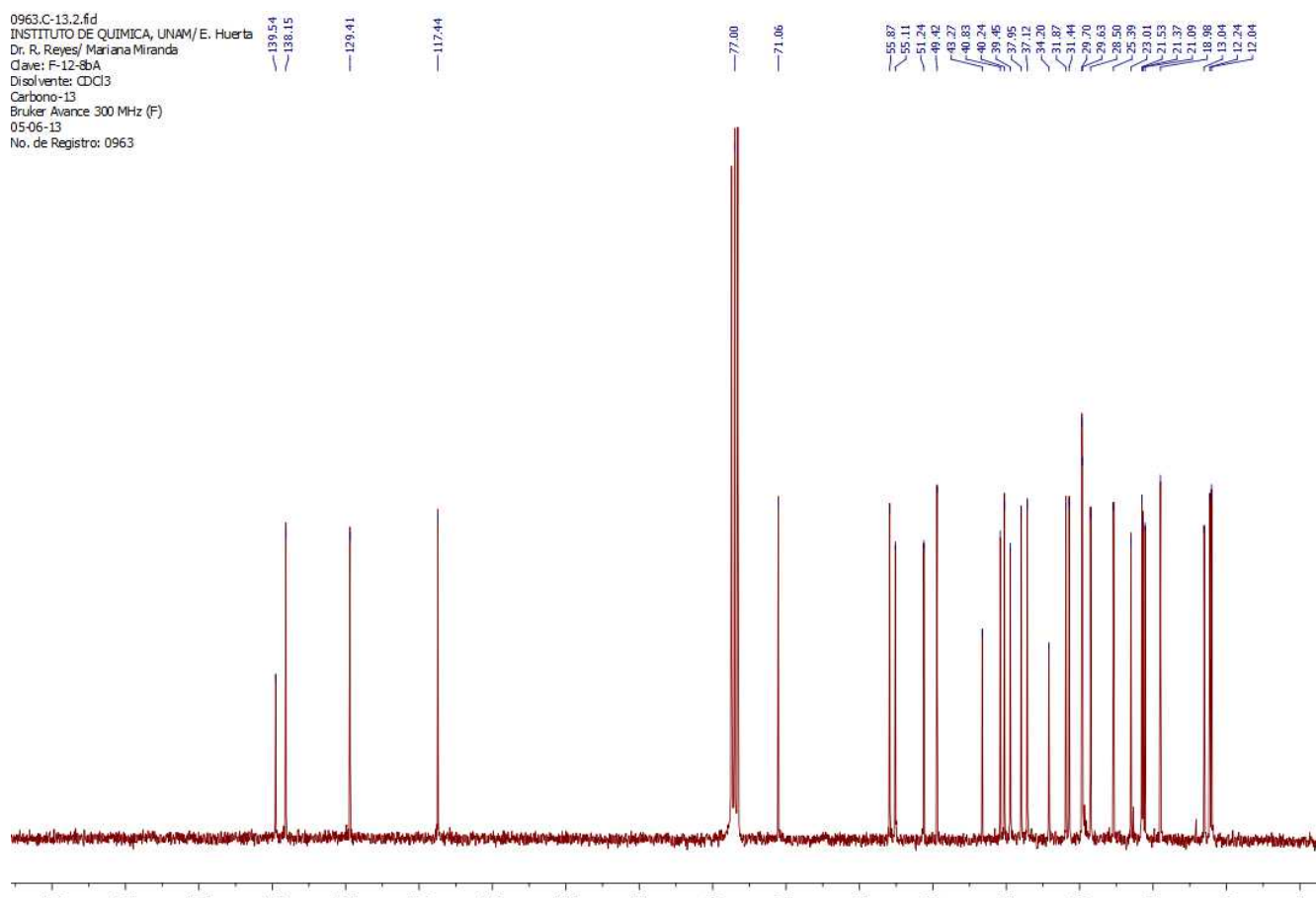


Figura 29. Espectro de RMN ^{13}C del espirosterol (RRC-0963).

Tabla 6. Valores experimentales y reportados (RMN ¹³C) para espinasterol.

C	Especies vegetales con espinasterol		
	<i>Baccharis salicifolia</i> (datos experimentales)	<i>Cucurbita máxima</i> (Villaseñor et al., 2000)	<i>Egletes Viscosa</i> (Silva-Filho et al., 2007)
1	37.12	37.16	37.37
2	31.44	31.50	31.70
3	71.06	71.07	71.27
4	37.95	38.01	38.22
5	40.24	40.28	40.49
6	29.63	29.65	29.88
7	117.44	117.47	117.67
8	139.54	139.57	139.76
9	49.42	49.47	49.68
10	34.20	34.24	34.44
11	21.53	21.56	21.76
12	39.45	39.48	39.69
13	43.27	43.30	43.50
14	55.11	55.11	55.34
15	23.01	23.02	23.23
16	28.50	28.50	28.69
17	55.87	55.86	56.14
18	12.04	12.06	12.25
19	13.04	13.04	13.24
20	40.83	40.82	41.00
21	21.09	21.09	21.27
22	138.15	138.17	138.36
23	129.41	129.46	129.67
24	51.24	51.26	51.46
25	31.87	31.88	32.08
26	21.37	21.38	21.58
27	18.98	19.00	19.20
28	25.39	25.40	25.59
29	12.24	12.25	12.43

El espectro de RMN 1H (Figura 30, Tabla 7) fue muy complejo y sugirió que se trataba de un esteroide por la presencia de señales a campo alto (0.55-1.03 ppm) para seis metilos (Me-18, Me-19, Me-21, Me-26, Me-27 y Me-29). También se observó la señal en 3.59 ppm para el H-3 en el carbono base de un grupo hidroxilo; así como para los protones vinílicos H-23, H-22 y H-7 en 5.03, 5.17 y 5.18 ppm, respectivamente, indicando que el compuesto presenta dos dobles ligadura

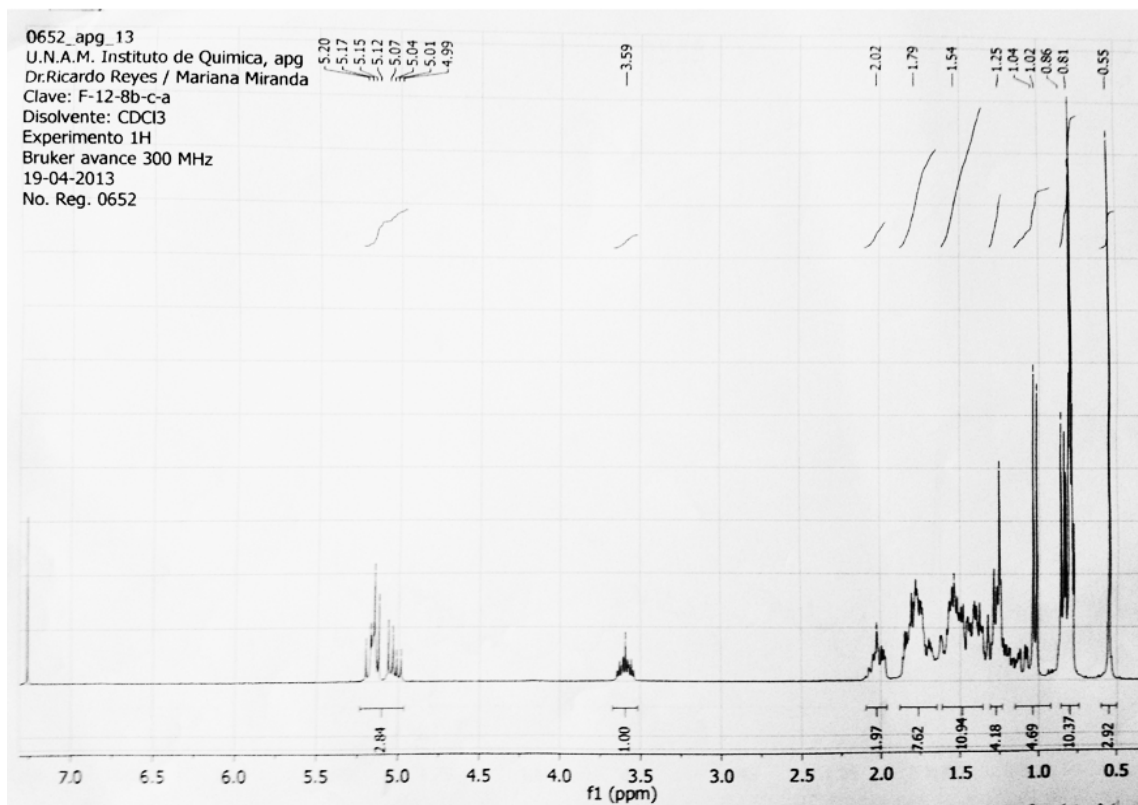


Figura 30. Espectro de RMN ¹H del espinasterol (RRC-0652).

Tabla 7. Valores experimentales y reportados (RMN ¹H) para espinasterol. Desplazamientos químicos δ (ppm).

H	<i>Baccharis salicifolia</i> (datos experimentales) CDCl ₃ /TMS 300 MHZ	<i>Aster oharai</i> (Choi et al., 2003) CDCl ₃ /TMS 500 MHZ
Me-18	0.55 s, 3H	0.55 s, 3H
Me-27 Me-29	0.79-0.82 m, 6H	0.79-0.82 m, 6H
Me-19	0.81 s, 3H	0.82 s, 3H
Me-26	0.86 d, 3H	0.84 d, 3H
Me-21	1.03 d, 3H	1.02 d, 3H
H-3	3.59 m, 1H	3.60 m, 1H
H-23	5.03 dd, 1H	5.04 dd, 1H
H-22	5.17 m, 1H	5.17 dd, 1H
H-7	5.18 m, 1H	5.18 m, 1H

El espectro de masas (Figura 30) fue similar al previamente reportado por Choi *et al.*, (2003), en el cuál se mostró el ión molecular [M]⁺ en m/z 412 (30%), congruente con la formula molecular C₂₉H₄₈O. El pico base (100%) se observó en m/z 271(100%). Otros fragmentos observados fueron m/z 397(26%), 369(26%), 351(9%), 300(21%), 255(49%), 246 (26%), 229 (23%), 213 (22%), 201 (14%), 173 (15%), 161 (28%), 147 (39%), 145 (27%), 107 (45%), 95 (35%), 81 (55%), 69 (39%), 55 (35%).

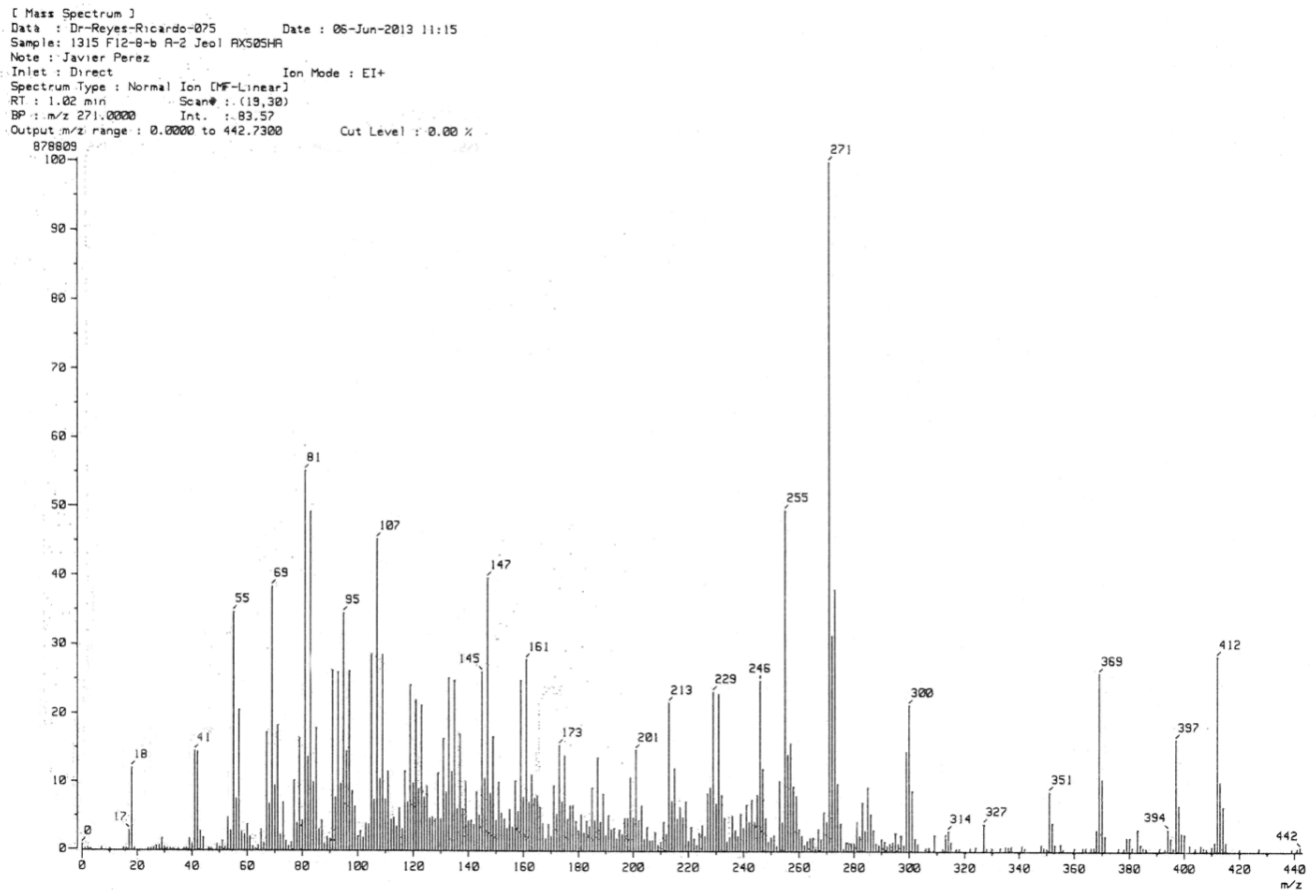


Figura 31. Espectro de Masas de espinaesterol (RRC-1315).

6.5. Actividad Insecticida: Efecto de los extractos acuosos sobre *Bemisia Tabaci*.

Los extractos más prometedores fueron *B. salicifolia* y *L. virginicum* por su actividad fitotóxica, fungicida y oomicida, por lo cual se evaluaron sus efectos sobre la sobrevivencia de insectos adultos sobre las plantas de jitomate. Observamos que tres de éstos (*B. salicifolia* 1%,

2%, *L. virginicum* 1%) disminuyeron la sobrevivencia comparados con el control; sin embargo, las barras del error estándar nos indica una gran dispersión, por lo cual no mostraron diferencias significativas estadísticamente entre los tratamientos (Figura 32).

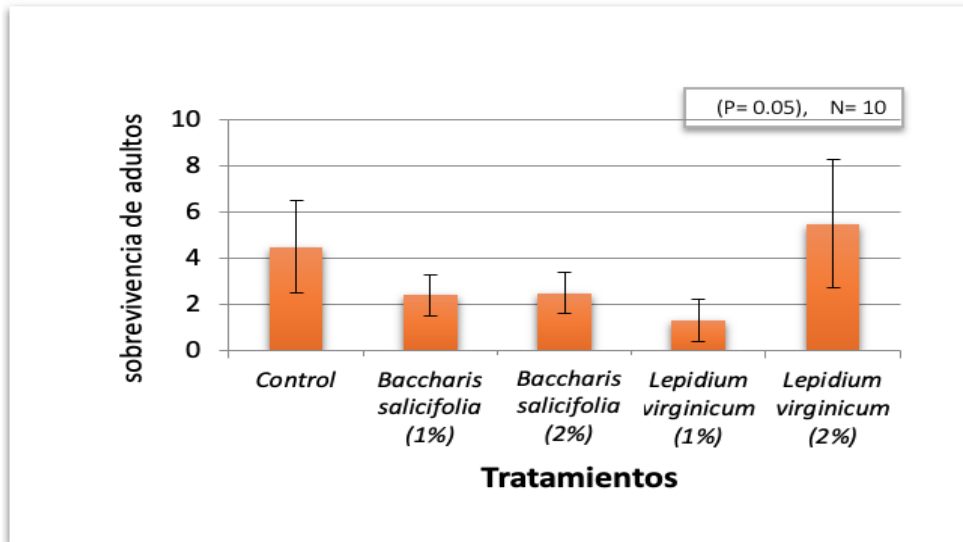


Figura 32. Sobrevivencia de adultos de *B. tabaci*. Protocolo 1

Por otro lado, al evaluar la eclosión de los huevecillos el extracto de *B. salicifolia* registro menor actividad que el insecticida comercial y tampoco mostró diferencias significativas comparado con el control, indicando que no afectó la eclosión (Figura 33).

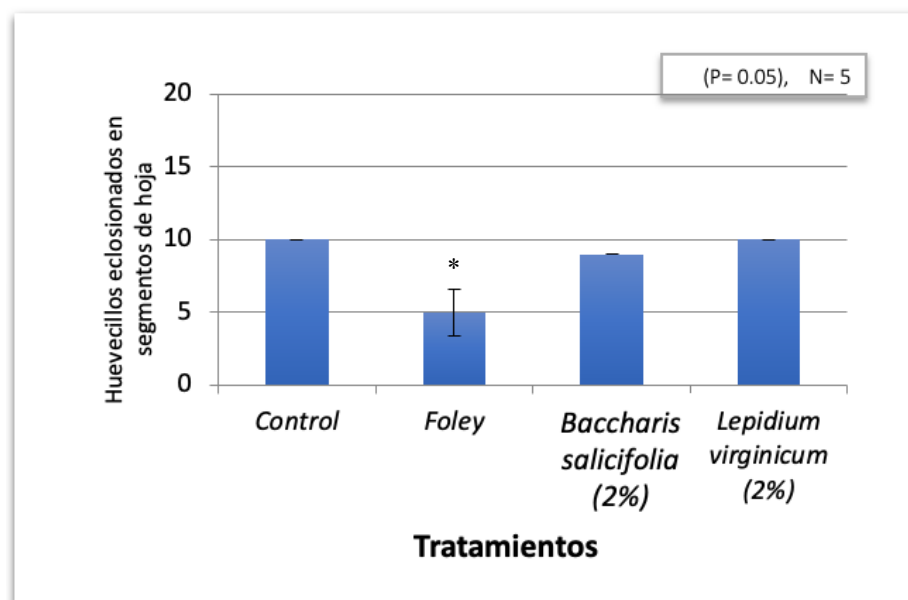


Figura 33. Eclosión de huevecillos (2° y 3° instar) de *B. tabaci*. Protocolo 2.

7. Discusión

La mayoría de los productores de jitomates dependen en gran medida de los plaguicidas para controlar enfermedades y plagas (Vyvyan 2002). Entre ellos, los herbicidas glifosato, ácido 2,4-diclorofenoxiacético y bromometano (CH_3Br), que contaminan suelos, acuíferos subterráneos y aire; son riesgosos para el ambiente, la salud animal y humana (Morillo & Villaverde 2017). Algunos herbicidas, como el CH_3Br , se aplican al suelo, afectan la capa de ozono y la salud humana. Este producto está severamente restringido a nivel mundial por la Convención de Viena (1987) y el Protocolo de Montreal (1988) que México ha firmado (SEMARNAT 2015). Para transformar la producción agrícola convencional, los investigadores en control de plagas han concentrado sus esfuerzos en la búsqueda de productos naturales como plaguicidas (Vyvyan 2002, García *et al.* 2005), por lo que es necesario la producción de alimentos inocuos, reducir los contaminantes y riesgos generados por los plaguicidas sintéticos y a la vez, que sean seguros para el consumo humano. Para esto, se requiere de estrategias alternativas para mantener y/o incrementar la producción agrícola. La aplicación de plaguicidas naturales (aleloquímicos) podría ser una alternativa ecológicamente viable y segura para el consumo humano (Liu y Huang 2011, Robles-Yerena *et al.* 2010, Rongai *et al.* 2012). Los aleloquímicos, como compuestos puros o mezclas complejas, extraídos de los tejidos vegetales con agua o disolventes orgánicos, podrían usarse para el manejo de plagas como plaguicidas ecológicos, sin contaminar el suelo, el agua y el aire (Farooq *et al.* 2011). El objetivo de este trabajo fue investigar la potencial actividad fitotóxica, insecticida y fungicida de cinco plantas ruderales para su posible aplicación al cultivo de jitomate en Tlaxcala, México.

Algunas plantas alelopáticas producen aleloquímicos, que pueden ser tóxicos para algunos patógenos, estos compuestos pueden ser disueltos en extractos acuosos y/o en extractos orgánicos (Abdel-Monaim 2011, De Rezende *et al.* 2007, Rongai *et al.* 2012, Rosas-Burgos *et al.* 2009, Talibi *et al.* 2012, Xuan *et al.* 2003). Investigaciones con extractos acuosos, orgánicos y sus fracciones, de diversas especies vegetales han demostrado bioactividad fungicida selectiva y diversa, sobre algunos fitopatógenos (Abdel-Monaim, *et al.* 2011, Anaya *et al.* 2003, Farooq *et al.* 2011, Hashem *et al.* 2010, De Rodríguez *et al.*, 2011, Liu y Huang 2011, Meepagala *et al.* 2005, Nel *et al.* 2007, De Rezende *et al.* 2007, Rongai *et al.* 2012, Rosas-Burgos 2009, Talibi *et al.* 2012, Vaz *et al.* 2010, Xuan *et al.* 2003). Con base en estos

antecedentes se decidió evaluar plantas alelopáticas que usan algunos productores agrícolas del estado de Tlaxcala.

a) Actividad fitotóxica inducida por los extractos acuosos y orgánicos

Los mejores resultados se obtuvieron para los extractos acuosos (EAS) de *Baccharis salicifolia* y *Lepidium virginicum*. Ambas especies son arbustos ruderales, algunos pequeños agricultores los utilizan para rodear sus tierras de cultivo y canales de agua en sus agroecosistemas tradicionales (Anaya *et al.* 1987, Del Corral *et al.* 2012). Los extractos acuosos (EAS) de *B. salicifolia* y *L. virginicum*, evaluados al 1% m/v mostraron una notable actividad fitotóxica con las plantas modelo, inhibiendo un 100% la germinación (Figura 14 y 15). Estos resultados son similares a los reportados con el herbicida 2,4-D (100 µg/mL) (Anaya *et al.* 2003) y con los extractos acuosos de hojas de *Tetraclinis articulate* (Cupressaceae) (30 g/L) para semillas de lechuga (M'barek *et al.* 2018). En el caso del jitomate M'barek *et al.* (2018), reportó un 100% de inhibición en la germinación con 40 g/L, por lo tanto, los extractos EAS de *B. salicifolia* y *L. virginicum* son 3 a 4 veces más potentes que *T. articulate*. Los extractos de DCM-MeOH 1: 1 (v/v) y MeOH de *B. salicifolia* no mostraron actividad fitotóxica; sin embargo, Palacios *et al.* (2010) y Domínguez (2002) reportaron una fuerte inhibición de la germinación (80 a 100 %) en amaranto y lechuga de extractos etanólicos de *B. salicifolia* al 10%. Se ha documentado la actividad fitotóxica del extracto de diclorometano de las hojas de *B. salicifolia* en semillas de plantas modelo (*Lolium multiflorum*, monocotiledónea y *Lactuca sativa*, dicotiledónea) (Domínguez 2002). Este extracto contiene flavanonas metoxiladas, incluida la sakuranetina (Figura 34), que mostró una actividad herbicida en las plantas modelo mencionadas anteriormente (Domínguez 2002). En cuanto al alargamiento de la radícula, los extractos acuosos (EAS) de *B. salicifolia* y *L. virginicum* mostraron la mayor inhibición (100%) sobre el amaranto.

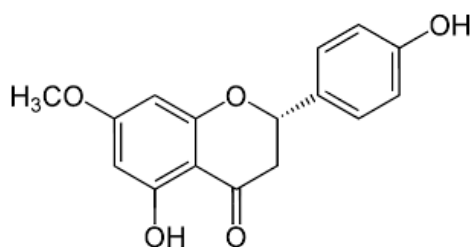


Figura 34. Sakuranetina, una flavanona metoxilada (Domínguez 2002).

b) Actividad oomicida y fungicida inducida por los extractos acuosos y orgánicos

Los fitopatógenos *F. oxysporum* (hongo) y *P. infestans* (oomiceto) son responsables de pérdidas de más del 50% de la producción en cultivos como cocoa, papa, jitomate, entre otros (De Rezende *et al.* 2007). Diversos trabajos con extractos acuosos, extractos orgánicos y sus fracciones, de algunas especies vegetales han demostrado bioactividad fungicida selectiva y diversa sobre algunos fitopatógenos (Abdel-Monaim *et al.* 2011; Anaya *et al.* 2003; Farooq *et al.* 2011; Hashem *et al.* 2010; De Rodríguez *et al.* 2011; Liu y Huang 2011; Meepagala *et al.* 2005; Nel *et al.* 2007; De Rezende *et al.* 2007; Rongai *et al.* 2012; Rosas-Burgos 2009; Talibi *et al.* 2012; Vaz *et al.* 2010).

b.1 Phytophthora infestans

En México, los agricultores generalmente aplican fungicidas a base de cobre para el control del Oomiceto *Phytophthora sp*, pero con poco éxito (De Rezende *et al.* 2007). También aplican bromuro de metilo al suelo con efectos negativos al ambiente y la salud, por ello es importante, encontrar estrategias alternas para el control de estos fitopatógenos, y la alelopatía ofrece un potencial para controlar este tipo de problemas con una estrategia ecológicamente amigable. Investigadores de todo el mundo, han evaluado algunos extractos acuosos y orgánicos de especies vegetales sobre este oomiceto, con resultados sobresalientes, uno de ellos, es lo reportado por De Rezende *et al.*, (2007) mostrando porcentajes de inhibición del 35 al 50% en el crecimiento radial de micelio en condiciones *in vitro* con extractos de *Azadirachta indica*, por otro lado Lui & Huang (2011), mostraron que algunos fungicidas convencionales tienen una actividad cercana o menor al 50%. En la presente tesis algunas fracciones terciarias del extracto orgánico de *B. salicifolia* (200 µg/mL) y extractos acuosos de *L. virginicum* (2% m/v) inhibieron en 100% el crecimiento radial del micelio de este oomiceto (Figura 23) sin afectar a plántulas del cultivo de interés, el jitomate.

b.2 Fusarium oxysporum

Estudios recientes han demostrado alta efectividad de extractos vegetales contra el crecimiento radial del micelio *in vitro* del hongo *F. oxysporum* con porcentajes de inhibición del 7 al 100% (Abdel-Monaim *et al.* 2011, Hashem *et al.* 2010, Liu y Huang 2011, Meepagala *et al.* 2005, Rongai *et al.* 2012, Rosas-Burgos *et al.* 2009, Talibi *et al.* 2012, Vaz *et al.* 2007, Xuan *et al.* 2003); sin embargo, las concentraciones que han evaluado en estos trabajos, son mayores al 2% (m/v). Por ejemplo, Abdel-Monaim *et al.* (2011), reportó el 100% de inhibición

de crecimiento radial del micelio de *F. oxysporum* con extractos orgánicos de la planta *Eugenia jambolana* a una concentración del 20% (m/v). Nuestros resultados con extractos acuosos de *L. virginicum* (2% m/v) mostraron también el 100% de inhibición del crecimiento radial del micelio de *F. oxysporum* y de *Phytophthora infestans* a una concentración menor a lo reportado por Abdel-Monaim *et al.* (2011). De acuerdo con Xuan *et al.* (2003), la planta kava inhibió más del 60% a este fitopatógeno con una concentración de 200 g/L (una dosis mayor a la concentración probada en esta tesis, 200 µg/mL). Esto representa una menor inhibición si se compara con nuestros resultados.

c) Composición Química de los extractos acuosos y orgánicos con potencial plaguicida (*Baccharis salicifolia*)

Baccharis salicifolia se ha estudiado químicamente a fondo, identificando 15 flavonas (Dominguez 1986), 7 flavanonas (apigenina, quercetina, naringenina, sakuranetina) (Zdero *et al.* 1986, Del Corral *et al.* 2012), varios diterpenos, incluidos 17 labdanos (Jakupovic *et al.* 1990, Del Corral *et al.* 2012), tres clerodanos algunos de ellos con β-xilopiranosido y β-fucopiranosido (Zdero *et al.* 1986, Jakupovic *et al.* 1990, Loayza *et al.* 1995), dos triterpenos (Del Corral *et al.* 2012), fitoesteroles (Domínguez 1986), monoterpenos (α-felandreno, α-terpineol, α-tujeno, canfeno) (Loayza *et al.* 1995, García *et al.* 2005, Carrizo *et al.* 2009, Sosa *et al.* 2012), (cis-α-copaen-8-ol, biciclogermacreno, germacreno-D) (Loayza *et al.* 1995, García *et al.* 2005, Carrizo *et al.* 2009, Sosa *et al.* 2012), derivados de cadineno. (cadinoles) (Zdero *et al.* 1986, Jakupovic *et al.* 1990, Loayza *et al.* 1995), y otros compuestos (óxido de baccharis, benzofuranos, cumarinas) (Dominguez 1986, Zdero *et al.* 1986).

Varios flavonoides de *B. salicifolia*, como quercetina, apigenina, naringenina, mostraron fitotoxicidad contra *Lactuca sativa*, siendo la quercetina más efectiva entre 15 y 40 ppm (Céspedes *et al.* 2006). Además, en esta especie se han aislado los ácidos diterpenoides, 5-hidroxi-6-hidro-salicifólico y salicifólico, junto con sakuranetina, apigenina y escopoletina (Del Corral *et al.* 2012). Se determinó la inhibición de la germinación por los ácidos 5-hidroxi-6hidro-salicifólico y salicifólico contra *Panicum miliaceum* y *Raphanus sativus*. El primero resultó el compuesto más activo (Del Corral *et al.* 2012), Algunas estructuras reportadas para el genero *Baccharis* sp. se presentan a continuación (Figura 35).

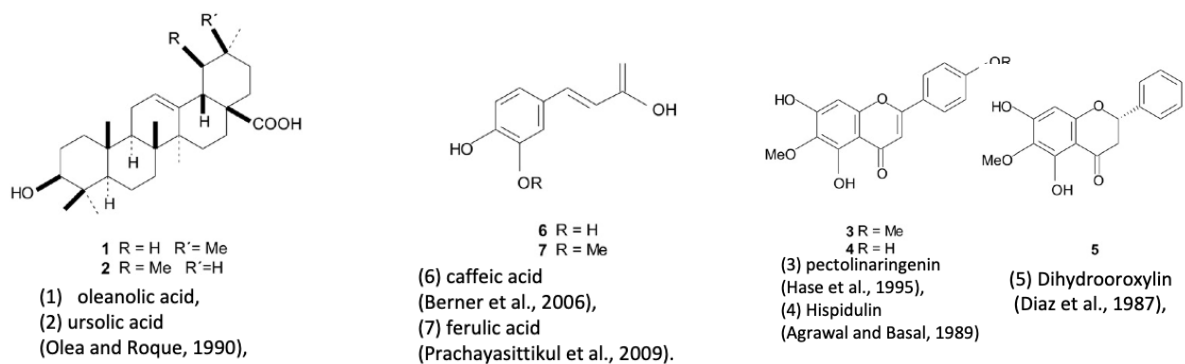


Figura 35. Estructuras reportadas para el genero *Baccharis sp.* en extractos con acetato de etilo y cloruro de metileno y metanol.

En cuanto a *Lepidium virginicum* L., de las hojas se han aislado varios glucosinolatos, como la sinigrina (Figura 36) y sus derivados; estos compuestos están involucrados en la defensa frente a los insectos herbívoros (Agrawal y Kurashige 2003). Los polvos de partes aéreas de algunas especies de la familia Brassicaceae que contienen glucosinolatos presentaron actividad herbicida (Abd et al. 2020, El-Masry et al. 2019). Además, el bencilglucosinolato de *L. virginicum* es activo contra protozoarios como *Entamoeba histolytica* (Calzada et al. 2003) y posee propiedades antimicrobianas e insecticidas (Agrawal y Kurashige 2003).

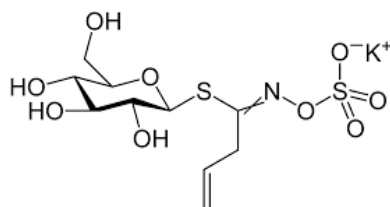


Figura 36. Sinigrina, un glucinolato reportado para algunas especies de Brassicaceae (Abd et al. 2020).

El análisis HPLC-ESI-QTOF-MS mostró dos picos mayoritarios en el rango de m/z 432,9-725,4 para los extractos de EAF activos de *B. salicifolia* y también para *L. virginicum*. Dado que se han reportado flavonoides fitotóxicos, incluida la apigenina, para *B. salicifolia* (Céspedes et al. 2006), se puede proponer que los EAF podrían contener flavonoides glicosilados, como talictiina (apigenina-7-alósido) con m/z 432.10565 aislado de *Cassia occidentalis* (Purwar et al. 2003). Este ion molecular coincide con el encontrado para el pico

m/z 432,9852 con un tiempo de retención de 12,77 minutos (Figura 19). En el caso de *L. virginicum*, EAF podría tener glucosinolatos fitotóxicos. Sin embargo, se necesitan más estudios químicos detallados para su identificación.

Ambas arvenses (*B. salicifolia* y *L. virginicum*) han mostrado ser una fuente natural de mezclas de compuestos con potencial alelopático y podrían ser una fuente natural de precursores plaguicidas para el control de algunas plagas y enfermedades del cultivo de jitomate en sistemas de producción orgánica.

8. Conclusiones

De las cinco plantas ruderales seleccionadas (*Argemone mexicana*, *Baccharis salicifolia*, *Lepidium virginicum*, *Leucaena leucocephala* y *Reseda luteola*), dos poseen alta actividad fitotóxica en tres plantas modelo (amaranto, lechuga y jitomate). Los mejores tratamientos fueron los extractos acuosos (EAS, 1%) preparados con las partes aéreas secas de *B. salicifolia* y *L. virginicum*, ya que ambos inhibieron en un 100% la germinación y elongación de la radícula y no fueron fitotóxicos para las plántulas de jitomate.

El análisis HPLC-ESI-QTOF-MS mostró dos picos mayoritarios para cada extracto, que podrían estar relacionados a compuestos como los flavonoides glicosilados para *B. salicifolia* y glucosinolatos para *L. virginicum*. Estos extractos acuosos son un material prometedor como herbicidas naturales para cultivos de jitomate reduciendo la dependencia de herbicidas sintéticos.

Los extractos acuosos de *B. salicifolia* inhibieron el 100% del crecimiento radial *in vitro* del micelio de *P. infestans*, microorganismo de difícil control, destacando la importancia de encontrar estrategias más amigables para el ambiente y menos tóxicas para el consumo humano durante los procesos de producción agrícola.

Con este trabajo, se destaca la posibilidad de aplicar los conocimientos de alelopatía como una estrategia alternativa para el control de plagas y enfermedades en condiciones experimentales.

9. Referencias Bibliográficas y Bibliografía

- Abbas T., Nadeem M.A., Tanveer A., Chauhan B.S. (2017). Can hormesis of plant-released phytotoxins be used to boost and sustain crop production?. *Crop Protection*, 93, 69-76.
- Abd El-Ghany S.E.D., Messiha N.K., El-Masry R.R., El-Dabaa M.A.T. (2020). The dual allelopathic capacity of two Brassicaceae plants' seed powder in controlling *Orobanche crenata* infesting *Pisum sativum* as well as stimulating its growth and yield. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1), 17.
- Abdel-Monaim M.F., Abo-Elyousr K.A.M., Morsy K.M. (2011). Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt diseases of lupine (*Lupinus termis* Forsik). *Crop Protection*, 30(2), 185-191.
- Adisa I.O., Reddy-Pullagurala V.L., Rawat S., Hernandez-Viezcas J.A., Dimkpa C.O., Elmer W.H., White J.C., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. (2018). Role of cerium compounds in Fusarium wilt suppression and growth enhancement in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(24), 5959-5970.
- Agrawal A.A., Kurashige N.S. (2003). A role for isothiocyanates in plant resistance against the specialist herbivore *Pieris rapae*. *Journal of Chemical Ecology*, 29(6), 1403-1415.
- Ali B. (2021). Salicylic acid: An efficient elicitor of secondary metabolite production in plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 101884.
- Anaya A.L. (1999). Allelopathy as a tool in the management of biotic resources in agroecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18(6), 697-739.
- Anaya A.L., Calera M.R., Mata R., Pereda-Miranda R. (1990). Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomoea tricolor* Cav.(Convolvulaceae). *Journal of Chemical Ecology*, 16(7), 2145-2152.
- Anaya A.L., Mata R., Sims J.J., González-Coloma A., Cruz-Ortega R., Guadaño A., Hernández-Bautista B.E., Midland S.L., Ríos G., Gómez-Pompa A. (2003). Allelochemical potential of *Callicarpa acuminata*. *Journal of Chemical Ecology*, 29(12), 2761-2776.
- Anaya A.L., Ramos L., Cruz R., Hernández J.G., Nava V. (1987). Perspectives on allelopathy in Mexican traditional agroecosystems: a case study in Tlaxcala. *Journal of Chemical Ecology*, 13(11), 2083-2101.
- Arellano García J. Jesus. (1995). Establecimiento de sistemas de cultivo de raíces transformadas para la producción de metabolitos de importancia económica. Tesis Doctoral en Ciencias de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. I.P.N. 108 p.
- Bakht T., Khan I. A. (2014). Weed control in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) through mulching and herbicides. *Pakistan Journal of Botany*, 46(1), 289-292.
- Bergougnoux V. (2014). The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, 32(1), 170-189.
- Bhowmik P. C. (2003). Challenges and opportunities in implementing allelopathy for natural weed management. *Crop Protection*, 22(4), 661-671.
- Blanco Y., Leyva Á. (2007). Las Arvenses en el Agroecosistema y sus Beneficios Agroecológicos Como Hospederas de Enemigos Naturales. *Cultivos Tropicales*, 28 (2), 21-28.

- Calzada F., Barbosa E., Cedillo-Rivera R. (2003). Antiamoebic activity of benzyl glucosinolate from *Lepidium virginicum*. *Phytotherapy Research*, 17(6), 618-619.
- Carrizo-Flores R., Ponzi M., Ardanaz C., Tonn C.E., Donadel O.J. (2009). Chemical composition of essential oil of *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pavon) Pers. and antibacterial activity. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 54(4), 475-476.
- Céspedes C.L., Marín J.C., Domínguez M., Avila J.G., Serrato B. (2006). Plant growth inhibitory activities by secondary metabolites isolated from Latin American flora. *Advances in Phytomedicine*, 2, 373-410.
- Chaïb S., Pistevos J.C., Bertrand C., Bonnard I. (2021). Allelopathy and allelochemicals from microalgae: An innovative source for bio-herbicidal compounds and biocontrol research. *Algal Research*, 54, 102213.
- Choi S.Z., Lee S.O., Choi S.U., Lee K.R. (2003). A new sesquiterpene hydroperoxide from the aerial parts of *Aster oharai*. *Archives of Pharmacal Research*, 26(7), 521-525.
- Chou C.-H. (2006). Chap- Introduction to Allelopathy. En *Allelopathy: A physiological Process with Ecological Implications*. Eds. Reigosa M.J., Pedrol N., & González L. *SPRINGER*. ISBN-13 978-1-4020-4280-5. P. 1-9.
- Corpeño Boris. 2004. Manual del cultivo de Tomate. Centro de Inversión, Desarrollo y Exportación de Agronegocios. Fintrac-IDEA. San Salvador. 1-31.
- Da Cruz C.L., Pinto V.F., Patriarca, A. (2013). Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 1-14.
- De Coninck B., Timmermans P., Vos C., Cammue B.P., Kazan K. (2015). What lies beneath: belowground defense strategies in plants. *Trends in Plant Science*, 20(2), 91-101.
- De Corato U., Pane C., Bruno G.L., Cancellara F.A., Zaccardelli M. (2015). Co-products from a biofuel production chain in crop disease management: A review. *Crop Protection*, 68, 12-26.
- De Rezende-Ramos A., Falcao L.L., Barbosa G.S., Marcellino L.H., Gander, E. S. (2007). Neem (*Azadirachta indica* a. Juss) components: Candidates for the control of *Crinipellis perniciosus* and *Phytophthora* ssp. *Microbiological Research*, 162(3), 238-243.
- De Rodríguez D.J., García R.R., Castillo F.H., González C.A., Galindo A.S., Quintanilla J.V., Zuccolotto L.M. (2011). In vitro antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 960-966.
- Del Corral S., Cuffini S.L., Cardoso S.G., Bortoluzzid A.J., Palacios S.M. (2012). Phytotoxic halimanes isolated from *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pad.) Pers. *Phytochemistry Letters*, 5(2), 280-283.
- Domínguez López Mariana. (2002). Comparación de la actividad herbicida de dos especies de la familia Asteraceae; *Baccharis salicifolia* y *Baccharis conferta*. En tesis de la Facultad de Química. UNAM. 96 p.
- Dominguez X.A., El Dahmi S., Rombold C. (1986). Hydroxyacetophenone derivatives from *Baccharis glutinosa*. *Journal of Natural Products*, 49(1), 143-144.

- El-Masry R.R., Ahmed S.A.A., El-Rokiek K.G., Messiha N.K., Mohamed S.A. (2019). Allelopathic activity of the leaf powder of *Ficus nitida* on the growth and yield of *Vicia faba* and associated weeds. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 1-7.
- Ever R.F, Eichhorn S.E. (2013). The Molecular Composition of Plant Cells. In Raven Biology of Plants. W.H. Freeman & Company Publishers, 30-36.
- Fang C., Fernie A.R., Luo J. (2019). Exploring the diversity of plant metabolism. *Trends in Plant Science*, 24(1), 83-98.
- Farooq M., Jabran K., Cheema Z.A., Wahid A., Siddique K.H. (2011). The role of allelopathy in agricultural pest management. *Pest Management Science*, 67(5), 493-506.
- FIRA, (2017). Panorama agroalimentario: Tomate Rojo 2. *En Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial*. p1-25.
- Gahukar R.T. (2012). Evaluation of plant-derived products against pests and diseases of medicinal plants: a review. *Crop Protection*, 42, 202-209.
- García M., Donadel O.J., Ardanaz C.E., Tonn C.E., Sosa M.E. (2005). Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum*. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 61(6), 612-618.
- Gastelum-Osorio D.A., Sandoval-Villa M., Trejo-López C., Castro-Brindis R. (2013). Fuerza iónica de la solución nutritiva y densidad de plantación sobre la producción y calidad de frutos de *Physalis peruviana* L. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 19(2), 197-210.
- Hashem M., Moharam A.M., Zaied A.A., Saleh F.E.M. (2010). Efficacy of essential oils in the control of cumin root rot disease caused by *Fusarium* spp. *Crop Protection*, 29(10), 1111-1117.
- Jakupovic J., Schuster A., Ganzer U., Bohlmann F., Boldt P.E. (1990). Sesqui- and diterpenes from *Baccharis* species. *Phytochemistry*, 29(7), 2217-2222.
- Korres N.E., Burgos N.R., Duke S.O. (Eds.). (2018). Weed control: sustainability, hazards, and risks in cropping systems worldwide. *CRC Press.*, 1-4.
- Kumar M., Tomar M., Bhuyan D.J., Punia S., Grasso S., Sa A.G.A., Mekhemar M. (2021). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seed: A review on bioactives and biomedical activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, 112018.
- Li X.G., Ding C.F., Hua K., Zhang T L., Zhang Y.N., Zhao L., Wang X.X. (2014). Soil sickness of peanuts is attributable to modifications in soil microbes induced by peanut root exudates rather than to direct allelopathy. *Soil Biology and Biochemistry*, 78, 149-159.
- Liu F., Huang Y. (2011). Antifungal bioactivity of 6-bromo-4-ethoxyethylthio quinazoline. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 101(3), 248-255.
- Loayza I., Abujder D., Aranda R., Jakupovic J., Collin G., Deslauriers H., Jean F. I. (1995). Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. *Phytochemistry*, 38(2), 381-389.
- M'barek K., Zribi I., Haouala R. (2018). Allelopathic effects of *Tetraclinis articulata* on barley, lettuce, radish and tomato. *Allelopathy Journal*, 43(2), 187-202.
- Meepagala K.M., Schrader K.K., Wedge D.E., Duke S.O. (2005). Algicidal and antifungal compounds from the roots of *Ruta graveolens* and synthesis of their analogs. *Phytochemistry*, 66(22), 2689-2695.

- Morillo E., Villaverde J. (2017). Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. *Science of the Total Environment*, 586, 576-597.
- Moshi A.P., Matoju I. (2017). The status of research on and application of biopesticides in Tanzania. Review. *Crop Protection*, 92, 16-28.
- Narwal S. S. (2006). Allelopathy in ecological sustainable agriculture. In *Allelopathy*. Springer, Dordrecht. 537-564.
- Nel B., Steinberg C., Labuschagne N., Viljoen, A. (2007). Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of *Fusarium* wilt of banana. *Crop Protection*, 26(4), 697-705.
- Ortega-Arenas L.D., Miranda-Aragón D.A., Sandoval-Villa M. (2006). Densidad de huevos y ninfas de mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (WEST.) en *Gerbera jamesonii* H. Bolus con diferentes regímenes de fertilización nitrogenada. *Agrociencia*, 40(3), 363-371.
- Palacios S.M., del Corral S., Carpinella M.C., Ruiz G. (2010). Screening for natural inhibitors of germination and seedling growth in native plants from Central Argentina. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 674-677.
- Potito A.P., Beatty S.W. (2005). Impacts of recreation trails on exotic and ruderal species distribution in grassland areas along the Colorado Front Range. *Environmental Management*, 36(2), 230-236.
- Purwar C., Rai R., Srivastava N., Singh J. (2003). New flavonoid glycosides from *Cassia occidentalis*. *Indian Journal of Chemistry*, 42B, 434-436.
- Robles-Yerena L., Rodríguez-Villarreal R.A., Ortega-Amaro M.A., Fraire-Velázquez S., Simpson J., Rodríguez-Guerra R., Jiménez-Bremont J. F. (2010). Characterization of a new fungal antagonist of *Phytophthora capsici*. *Scientia Horticulturae*, 125(3), 248-255.
- Rongai D., Milano F., Sciò E. (2012). Inhibitory effect of plant extracts on conidial germination of the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *American Journal of Plant Sciences*. 3, 1693-1698.
- Rosas-Burgos E.C., Cortez-Rocha M.O., Cinco-Moroyoqui F.J., Robles-Zepeda R.E., López-Cervantes J., Sánchez-Machado D.I., Lares-Villa F. (2009). Antifungal activity *in vitro* of *Baccharis glutinosa* and *Ambrosia confertiflora* extracts on *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium verticillioides*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(12), 2257-2261.
- Sánchez Castro Miguel A. 2009. Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades en Tomate, Chile y Papas. INIA. 22-39.
- Scavo A., Pandino G., Restuccia A., Mauromicale G. (2020). Leaf extracts of cultivated cardoon as potential bioherbicide. *Scientia Horticulturae*, 261, 109024.
- Scognamiglio M., Fiumano V., D'Abrosca B., Esposito A., Choi Y.H., Verpoorte R., Fiorentino A. (2014). Chemical interactions between plants in Mediterranean vegetation: the influence of selected plant extracts on *Aegilops geniculata* metabolome. *Phytochemistry*, 106, 69-85.
- Seigler D.S. (2006). Basic pathways for the origin of allelopathic compounds. In *Allelopathy*. Springer, Dordrecht. 11-61.

- SEMARNAT. 2015. Protocolo de Montreal. <http://www.semarnat.gob.mx/temas/agenda-internacional/protocolodeMontreal>.
- SIAP. (2017). Tlaxcala, primer lugar en aumentar la producción de jitomate: SAGARPA. Inforural.
- Silva-Filho F.A., Lima M.A.S., Bezerra A.M.E., Braz Filho R., Silveira E.R. (2007). A Labdane diterpene from the aerial parts of *Egletes viscosa* less. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18, 1374-1378.
- Sosa M.E., Lancelle H.G., Tonn C.E., Andres M.F., Gonzalez-Coloma A. (2012). Insecticidal and nematocidal essential oils from Argentinean *Eupatorium* and *Baccharis* spp. *Biochemical Systematics and Ecology*, 43, 132-138.
- Sunshine Florio de Real. (2013). Estudio de la biología de las malezas. Revista Vinculando. <https://vinculando.org/ecologia/estudio-de-la-biologia-de-las-malezas.html>
- Talibi I., Askarne L., Boubaker H., Boudyach E.H., Msanda F., Saadi B., Aoumar A.A.B. (2012). Antifungal activity of some Moroccan plants against *Geotrichum candidum*, the causal agent of postharvest citrus sour rot. *Crop Protection*, 35, 41-46.
- Teerarak M., Laosinwattana C., Charoenying P. (2010). Evaluation of allelopathic, decomposition and cytogenetic activities of *Jasminum officinale* L. f. var. *grandiflorum* (L.) Kob. on bioassay plants. *Bioresource Technology*, 101(14), 5677-5684.
- Valenzuela Ureta José Guadalupe. 2010. Manejo de Patógenos del suelo en Hortalizas. En Memoria de la Jornada para el Manejo de Plagas y Enfermedades de impacto en la horticultura. Fundación Produce, SAGARPA, Gobierno del Estado de Sinaloa. 1-71.
- Vaz A.F., Costa R.M., Melo A.M., Oliva M.L., Santana L.A., Silva-Lucca R.A., Correia M.T. (2010). Biocontrol of *Fusarium* species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated from *Sebastiania jacobinensis*. *Food Chemistry*, 119(4), 1507-1513.
- Villaseñor I.M., Domingo A.P. (2000). Anticarcinogenicity potential of spinasterol isolated from squash flowers. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, 20(3), 99-105.
- Vyvyan J.R. (2002). Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron*, 58(9), 1631-1646.
- Wang Y., Wang Y., Huo X., Zhu, Y. (2015). Why some restricted pesticides are still chosen by some farmers in China? Empirical evidence from a survey of vegetable and apple growers. *Food Control*, 51, 417- 424.
- Xuan T.D., Yuichi O., Junko C., Tsuzuki E., Hiroyuki T., Mitsuhiro M., Hong N.H. (2003). Kava root (*Piper methysticum* L.) as a potential natural herbicide and fungicide. *Crop Protection*, 22(6), 873-881.
- Zdero C., Bohlmann F., King R.M., Robinson, H. (1986). Diterpene glycosides and other constituents from Argentinian *Baccharis* species. *Phytochemistry*, 25(12), 2841-2855.

10. Anexo

10.1. Material suplementario

Tabla 2. Extractos orgánicos (1%) de cinco malezas del cultivo de jitomate y su efecto sobre la germinación de semillas de tres plantas modelo como amaranto (*A. hypochondriacus*), lechuga (*L. sativa*) y jitomate (*S. lycopersicum*), Medias \pm error estándar de 4 experimentos con n = 10. Significación estadística $P < 0.05$

<i>Plantas alelopáticas</i>	TRATAMIENTOS	
	Extractos orgánicos	
	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (1:1) 1% m/v	MeOH, 1% m/v
<i>Germinación en Amaranthus hypochondriacus</i>		
Control H ₂ O	9.7 ^{0.25}	9.7 ^{0.25}
Control CH ₂ Cl ₂	10.0 ^{0.00}	-----
Control MeOH	-----	9.7 ^{0.25}
<i>Argemone mexicana</i>	10.0 ^{0.00}	10.0 ^{0.00}
<i>Baccharis salicifolia</i>	9.2 ^{0.25}	10.0 ^{0.00}
<i>Lepidium virginicum</i>	9.7 ^{0.25}	10.0 ^{0.00}
<i>Leucaena leucocephala</i>	10.0 ^{0.00}	9.7 ^{0.25}
<i>Reseda luteola</i>	9.7 ^{0.25}	9.7 ^{0.25}
<i>Germinación en Lactuca sativa</i>		
Control H ₂ O	10.0 ^{0.00}	10.0 ^{0.00}
Control CH ₂ Cl ₂	10.0 ^{0.00}	-----
Control MeOH	-----	10.0 ^{0.00}
<i>Argemone mexicana</i>	10.0 ^{0.00}	10.0 ^{0.00}
<i>Baccharis salicifolia</i>	9.7 ^{0.25}	10.0 ^{0.00}
<i>Lepidium virginicum</i>	10.0 ^{0.00}	10.0 ^{0.00}
<i>Leucaena leucocephala</i>	10.0 ^{0.00}	10.0 ^{0.00}
<i>Reseda luteola</i>	10.0 ^{0.00}	10.0 ^{0.00}
<i>Germinación en Solanum lycopersicum</i>		
Control H ₂ O	9.7 ^{0.25}	8.5 ^{1.19}
Control CH ₂ Cl ₂	9.5 ^{0.28}	-----
Control MeOH	-----	9.0 ^{0.00}
<i>Argemone mexicana</i>	10.0 ^{0.00}	9.7 ^{0.25}
<i>Baccharis salicifolia</i>	9.2 ^{0.47}	9.0 ^{0.40}
<i>Lepidium virginicum</i>	9.7 ^{0.25}	9.5 ^{0.28}
<i>Leucaena leucocephala</i>	9.2 ^{0.47}	9.7 ^{0.25}
<i>Reseda luteola</i>	9.5 ^{0.28}	9.0 ^{0.40}



PHYTOTOXIC ACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACTS OF RUDERAL PLANTS AND ITS POTENTIAL APPLICATION TO TOMATO CROP
ACTIVIDAD FITOTÓXICA DE EXTRACTOS ACUOSOS DE PLANTAS RUDERALES Y SU POTENCIAL APLICACIÓN EN EL CULTIVO DEL JITOMATE

MARIANA MIRANDA-ARÁMBULA^{1,2,3}, RICARDO REYES-CHILPA^{2*} AND ANA L. ANAYA L.³

¹ Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA, IPN), Tlaxcala, México.

² Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Química, Ciudad de México, México

³ Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ecología, Ciudad de México, México.

*Author for correspondence: chilpa@unam.mx

Abstract

Background: The application of synthetic pesticides to the tomato crop (*Solanum lycopersicum* -Solanaceae-) increases fruit production, but also carries risks for the environment, human and animal health.

Hypothesis: local ruderal plant extracts could be an alternative for weed control, with potential applications in agroecology and organic agriculture.

Methods: Organic and aqueous extracts (1 and 10 % w/v) were prepared with the fresh (FAE) and dry (DAE) aerial parts of five ruderal species from Tlaxcala, Mexico: *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae), *Baccharis salicifolia* Pers. (Asteraceae), *Lepidium virginicum* L. (Brassicaceae), *Leucena leucocephala* S. Zárate (Fabaceae) and *Reseda luteola* L. (Resedaceae). Their phytotoxic activity was evaluated *in vitro* with the seeds of three model plants (amaranth, lettuce, and tomato).

Results: DAE of *B. salicifolia* and *L. virginicum* (1 % w/v) showed the highest potential as natural herbicides. These inhibited 100 % seed germination and radicle elongation in the three model plants but did not affect the growth of tomato seedlings of 8 and 12 weeks in greenhouse conditions. Both extracts analyzed by HPLC-ESI-QTOF-MS showed two major peaks. *Baccharis salicifolia* with m/z 432.9 and 725.4. *Lepidium virginicum* with m/z 532.9 and 527.1.

Conclusions: DAE of local ruderal plants *B. salicifolia* and *L. virginicum* (1 % w/v) are potential natural herbicides, without harmful effects on tomato cultivated seedlings, awaiting the precise identification of their active compounds.

Keywords: Allelopathy, *Baccharis salicifolia*, bioherbicide, *Lepidium virginicum*, plants extracts, weed control.

Resumen:

Antecedentes: La aplicación de plaguicidas sintéticos al cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* -Solanaceae-) aumenta la producción de frutos, pero también conlleva riesgos para el ambiente, la salud humana y animal.

Hipótesis: los extractos de plantas ruderales locales podrían ser una alternativa para el control de malezas, con aplicaciones potenciales en agroecología y agricultura orgánica.

Métodos: Se prepararon extractos orgánicos y acuosos (1 y 10 % p/v) con las partes aéreas frescas (FAE) y secas (DAE) de cinco especies ruderales de Tlaxcala, México: *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae), *Baccharis salicifolia* Pers. (Asteraceae), *Lepidium virginicum* L. (Brassicaceae), *Leucena leucocephala* S. Zárate (Fabaceae) and *Reseda luteola* L. (Resedaceae). Su actividad fitotóxica se evaluó *in vitro* con las semillas de tres plantas modelo (amaranto, lechuga y tomate).

Resultados: Los DAE de *B. salicifolia* y *L. virginicum* (1 % p/v) mostraron el mayor potencial como herbicidas naturales, pues inhibieron 100 % la germinación de las semillas y la elongación de la radícula en las tres plantas modelo, pero no afectaron el crecimiento de las plántulas de tomate de 8 y 12 semanas en condiciones de invernadero. Ambos extractos analizados mediante HPLC-ESI-QTOF-MS presentaron dos picos mayoritarios. *Baccharis salicifolia* con m/z 432.9 y 725.4. *Lepidium virginicum* con m/z 532.9 y 527.1.

Conclusiones: Los DAE de las plantas ruderales locales *B. salicifolia* y *L. virginicum* (1 % p/v) son potenciales herbicidas naturales, sin efectos dañinos en plántulas cultivadas de tomate, quedando pendiente la identificación precisa de sus compuestos activos.

Palabras clave: Alelopatía, *Baccharis salicifolia*, bioherbicidas, control de malezas, extractos vegetales, *Lepidium virginicum*.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License CC BY-NC (4.0) international.

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



In the last two decades, tomato (*Solanum lycopersicum* L.) became the seventh crop in global production (Bergou-noux 2014). This crop is affected by more than 200 pests and diseases such as bacteria, fungi, viruses (Bergou-noux 2014), and weeds, which can reduce yields from 20 to 70 % (Bakht & Khan 2014, Adisa et al. 2018). The main weeds for this crop are Amaranthaceae species (Palacios et al. 2010, De Coninck et al. 2015). Farmers use conventional agrochemicals massively against pests and diseases; however, this agricultural practice has shown negative effects on the environment, like pesticide residues, development of resistant pathogen populations, and has potential risks on animal and human health (Abdel-Monaim et al. 2011, Scavo et al. 2020). Although synthetic pesticides are effective, they are not considered as GRAS (Generally Recognized as Safe) by the FDA (Food and Drug Administration, US) (de Rodriguez et al. 2011, Da Cruz Cabral et al. 2013); therefore, are not accepted by consumers looking for safe agricultural products and organic crops. For this reason, it is necessary to find effective alternatives against pests and safe for health (Talibi et al. 2012, Moshi & Matoju 2017). According to Korres et al. 2019, allelopathy is the direct or indirect effects of chemicals produced by plants or microorganisms on the growth, development, and distribution of other plants and microorganisms in natural and agricultural ecosystems. Currently, there is an increasing interest in plant extracts and secondary metabolites (allelochemicals) with bactericide, insecticide, herbicide, and fungicide activity. Several plant extracts, such as those from Mexican marigold (*Tagetes minuta* L.), Hairy beggarticks (*Bidens pilosa* L.), Black mustard (*Brassica nigra* L.), and others, can be an alternative for the management and control of some dominant weed species like *Avena fatua* L., *Cyperus difformis* L. (monocotyledons), and *Echinochloa crus-galli* L., *Amaranthus* spp. (dicotyledons) for wheat, cotton and rice crops (Farooq et al. 2011, Scavo et al. 2020). Plant extracts show several ecological advantages, such as being specific for target organisms, being biodegradable and have reduced risks to environment and human health (Farooq et al. 2011). These compounds have demonstrated phytotoxic activity (Vyvyan 2002), specially species of the Asteraceae (Rosas-Burgos et al. 2009, Farooq et al. 2011, Rongai et al. 2012, Talibi et al. 2012), Brassicaceae (Farooq et al. 2011) and Fabaceae (Talibi et al. 2012). Phytotoxic activity can be an alternative way to develop technology that will lead to a sustainable agriculture (Anaya et al. 1987). In the State of Tlaxcala, México, tomato crop production (4,066 ton/year) is an important economic activity with

an annual increase of 4.8 % (SAGARPA 2017). In our research group, we study the potential phytotoxic activity of some local ruderal plants as an ecological alternative for the control of pests and diseases. Ruderal species are defined as those that grow along trail corridors or rural roads (Potito & Beatty 2005). We selected abundant ruderal species that grow nearby the tomato farmlands in the State of Tlaxcala, Mexico. Small-scale farmers use them to surround their fields and water channels in their traditional agroecosystems (Anaya et al. 1987). In this work, we report the phytotoxic activity of the aqueous extracts of the ruderal species *Argemone mexicana* (Papaveraceae), *Baccharis salicifolia* (Asteraceae), *Lepidium virginicum* (Brassicaceae), *Leucaena leucocephala* (Fabaceae), and *Reseda luteola* (Resedaceae) on three model weed species: *A. hypocondriacus* L. (amaranth), *L. sativa* L. (lettuce) and *S. lycopersicum* L. (tomato).

Materials and methods

Collection of plant material. The aerial parts of five ruderal plants *Argemone mexicana*, *Baccharis salicifolia*, *Lepidium virginicum*, *Leucaena leucocephala*, and *Reseda luteola* (Table 1) were collected in February 2011 near Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala, México (19° 16' 42" N; 98° 22' 10" W; altitude 2,221-2,260 m asl). A voucher specimen of each species was deposited in the Casa Libertad Herbarium (Universidad Autónoma de la Ciudad de México) with numbers 1463, 1464, 1461, 14656 and 1462, respectively.

Preparation of plant extracts. a) Aqueous extracts from fresh and dried plants. The aqueous extracts from fresh plants (FAE, 10 % w/v) were prepared as follows. The aerial parts collected from each species were washed with running tap water, then with sterile water, and cut into small pieces. Ten grams of fresh aerial parts were extracted by maceration with 100 mL of distilled water for 3 h. The macerated was filtered through medical gauze sheets, and then through a Whatman (No. 4) filter paper and Millipore membrane (0.45 µm) (Anaya et al. 2003). The aqueous extracts from dried plants (DAE, 1 % w/v) were prepared with the aerial parts of each species, and were dried for 10 days at room temperature, then in an oven at 40 °C for 48 h, and grounded to fine powder in a porcelain mortar, then procedure for extraction is the same as above. b) Organic extracts from dried plants. The organic extracts (1 % w/v) were prepared as follows, powder material (50 g) was defatted with 2 L of *n*-hexane for 72 h with constant stirring at room temperature. The extracted biomass was

Table 1. Ruderal species and structures selected for preparing the extracts.

Species	Family	Organ
<i>Argemone Mexicana</i> L.	Papaveraceae	Leaves and stems
<i>Baccharis salicifolia</i> Pers.	Asteraceae	Leaves, stems, and flowers
<i>Lepidium virginicum</i> L.	Brassicaceae	Leaves, stems, and seeds
<i>Leucaena leucocephala</i> L.	Fabaceae	Leaves
<i>Reseda luteola</i> L.	Resedaceae	Leaves, and flowers

All species were collected in February 2011.

decanted and placed in an oven (darkness, 30 °C, 48 h) to remove the residual solvent. The dried biomass of each plant species was extracted with dichloromethane-methanol 1:1 (DCM-MeOH) and next with methanol (MeOH). The extraction conditions were the same as that previously described for *n*-hexane. The extracts were filtered through Whatman paper (No. 4) and concentrated with a rotary vacuum evaporator (Büchi, Laboratoriums Technik, Schweiz). The yields of each extract were determined, and kept in the dark at room temperature until tested for biological assays.

In vitro herbicide activity. The effect of plant extracts on the seed germination and the root growth were assessed as previously published (Anaya *et al.* 1990) using the model weed plants *Amaranthus hypochondriacus* L. (Amaranthaceae), *Lactuca sativa* L. (Asteraceae), and *Solanum lycopersicum* L. (Solanaceae). The FAE (10 % w/v), DAE (1 % w/v), DCM-MeOH, or MeOH extracts (1 % w/v) were mixed with agar (20 %) and poured into sterilized Petri dishes (12 mL per plate) allowing solidification. Agar with distilled water, DCM-MeOH 1:1, and MeOH were used as controls. The seeds of the three model weeds were purchased from a local market in Coyoacán, México City, Mexico. Bioassays were performed in 6 cm Petri dishes. Ten seeds of each model weed were sown directly on the agar of each Petri dish following a completely random design with four replicates. Treatments were kept in darkness at 27 °C ±1, relative humidity of 70-75 %. Seed germination and the length from the tip of the root to the beginning of the hypocotyl (stem) were measured 24 h after treatment for *A. hypochondriacus*, 48 h for *L. sativa*, and 72 h for *S. lycopersicum* (Anaya *et al.* 2003).

Toxicity to tomato seedlings. The extracts that showed the best allelopathic activity DAE from *B. salicifolia* and *L. virginicum* were tested to determine its phytotoxicity

towards tomato seedlings (8 and 12 weeks old). Tomato seedlings were grown from seeds and maintained under greenhouse conditions (temperature 27 to 32 °C, relative humidity 65 %, and photoperiod of 14:10 h light/dark). The seedlings were cultivated in plastic pots (30 cm diameter) on sterilized inert substrate (peatmoss, agrolite, and perlite, 3:1:1), and watered with hydroponic solution. Plantlets of 8 or 12 weeks old were treated with DAE aqueous extracts (1 and 2 % w/v) in doses of 50 mL every 72 h for four months until flowering. The greenhouse conditions were the same as those already described. The phytotoxic effect was measured on basis of dry biomass yields and compared with the control with a completely randomized design. The experiments were performed twice.

Statistical analysis. Data analysis was carried out by statistical analysis of variance (ANOVA) using completely random design. Comparison of means was performed by the Tukey's honestly significant difference (HSD) test with a 0.05 probability level, using STATISTICA software, version 8.

HPLC-MS Analysis. Samples of the aqueous extracts from dried plants (DAE) of *Baccharis salicifolia*, and *Lepidium virginicum* were lyophilized, and further analyzed with an HPLC-ESI-QTOF-MS (Model G6530BA, Agilent Tech. Santa Clara, California, USA) using a column Eclipse XDB-C18 (Agilent, 150 mm × 4.6 mm × 5 µm), mobile phase, A: CH₃CN/MeOH (50:50) and B: H₂O with CH₃COOH 0.1 % in a gradient (0-10 min 25 % A, 75 % B; 10-15 min 100 % B, 0.300 mL/min 600.00 bar; 16.5-20 min 100 % B, 1 mL/min 600.00 bar).

Results

The aqueous extracts of fresh (FAE, 10 % w/v) and dried (DAE, 1 % w/v) aerial parts, and the organic extracts (1 %

Ruderal Plant Extracts' Phytotoxic Activity for Tomato Crop

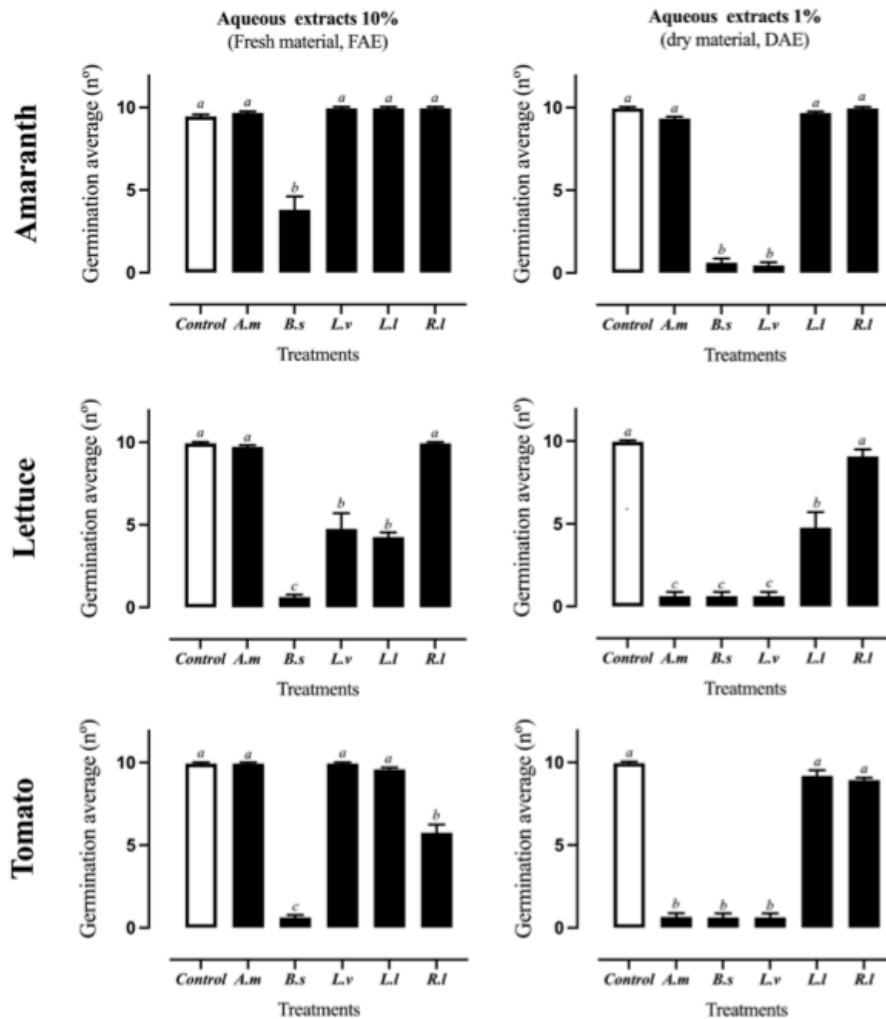


Figure 1. Assay of germination inhibition on amaranth, lettuce and tomato by FAE (10 %) and (DAE 1 %) of the ruderal plants *Argemone mexicana* (A.m.), *Baccharis salicifolia* (B.s.), *Lepidium virginicum* (L.v.), *Leucaena leucocephala* (L.l.), and *Reseda luteola* (R.l.). Means + standard error of 4 experiments with n = 10. A different letter indicates statistical significance $P < 0.05$.

w/ v) of the ruderal plants *Argemone mexicana*, *Baccharis salicifolia*, *Lepidium virginicum*, *Leucaena leucocephala*, and *Reseda luteola* were tested for inhibition of seed germination and radicle elongation of *A. hypochondriacus* (amaranth), *L. sativa* (lettuce), and *S. lycopersicum* (tomato var. saladet).

Seed germination inhibition. The DAE of *B. salicifolia* and *L. virginicum* tested at 1 % w/ v completely inhibited the seed germination of all the tested model plants (amaranth, lettuce, and tomato) (Figures 1, 2). The DAE of *Argemone mexicana* at the same concentration also annulated seed germination of lettuce and tomato. On the other hand, the

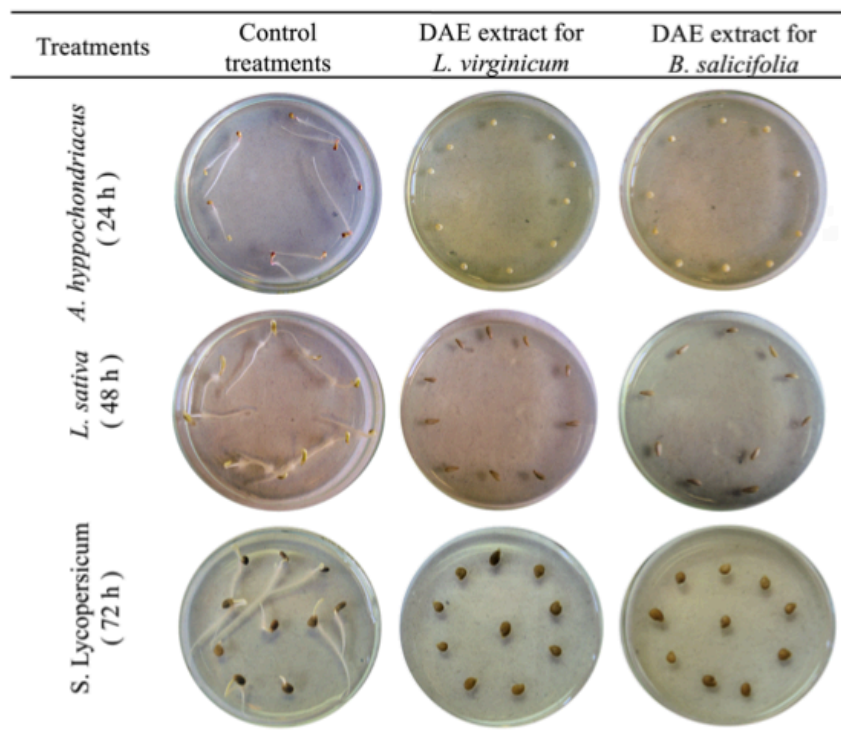


Figure 2. Inhibition on amaranth, lettuce, and tomato germination by dry aqueous extracts (DAE 1 %) of *Baccharis salicifolia* and *Lepidium virginicum* ruderal plants, recorded at 24, 48, and 72 hours, respectively.

FAE extracts showed less activity than DAE extracts, except for *B. salicifolia*, which showed a strong inhibition (60 to 100 %) on the three model plants (Figure 1). The organic extracts DCM-MeOH (1:1) and MeOH tested at 1 % (w/v) did not inhibited at all the germination of model plants as indicated by statistical analysis (Table S1).

Inhibition of radicle elongation. Aqueous extracts (DAE and FAE) from all the ruderal plants inhibited radicle elongation by 10 to 100 % on target species in comparison with control treatments. The most notable were the DAE extracts of *B. salicifolia*, and *L. virginicum*, which inhibited by 100 % the radicle elongation of the three model plants (amaranth, lettuce, and tomato) (Figure 3). Most of FAE extracts showed lower inhibition than DAE extracts, but in the case *B. salicifolia* DAE maintained 100 % phytotoxic activity against lettuce and tomato, but less on

amaranth (64 % inhibition). DAE and FAE of *R. luteola* showed 100 % inhibition only against lettuce.

On the other hand, generally most organic extracts from all ruderal plants showed low or null inhibition of radicle elongation as compared to control treatments (Figure 4). The DCM-MEOH (1:1) and MeOH extracts of *A. mexicana* showed 48 % inhibition against tomato. The DCM-MEOH (1:1) extract of *B. salicifolia* inhibited in 24 and 27 % tomato and amaranth radicle elongations. Interestingly, some organic extracts stimulated the growth of the radicle. For example, both the DCM-MEOH (1:1) and MeOH extracts of *B. salicifolia* stimulated lettuce radicle elongation in 49 and 46 % respectively as compared against control treatments (Figure 4).

Phytotoxicity of extracts to tomato seedlings. The extracts that presented the greatest allelopathic potential were test-

Ruderal Plant Extracts' Phytotoxic Activity for Tomato Crop

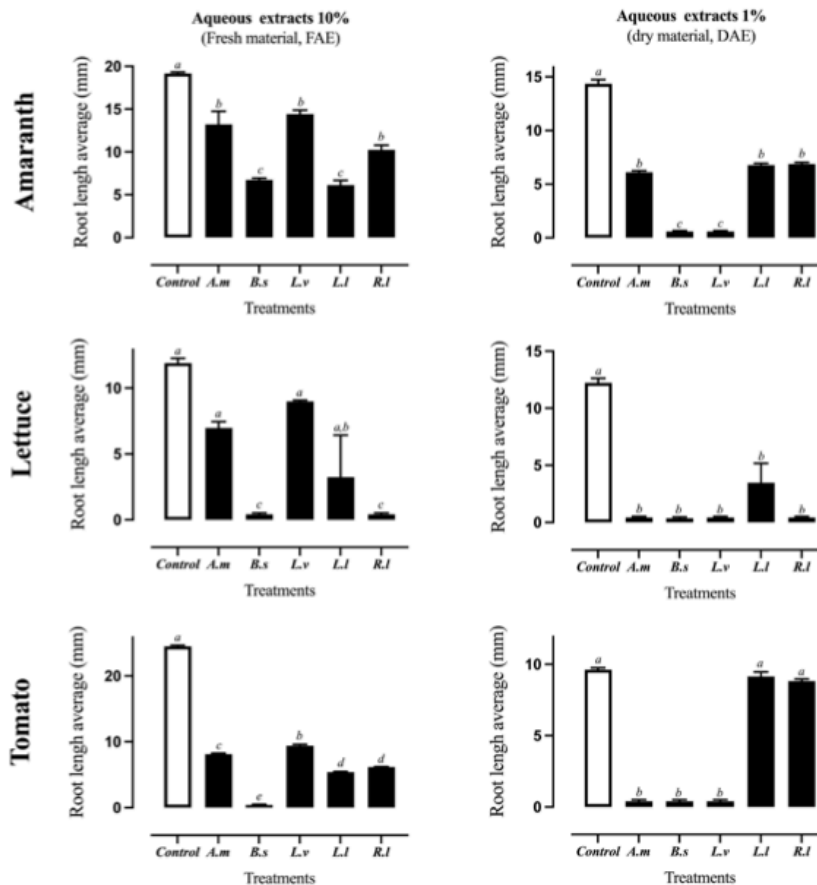


Figure 3. Assay of radicle elongation inhibition on amaranth, lettuce and tomato by FAE (10 %) and (DAE 1 %) of the ruderal plants *Argemone mexicana* (A.m), *Baccharis salicifolia* (B.s), *Lepidium virginicum* (L.v), *Leucaena leucocephala* (L.l), and *Reseda luteola* (R.l). Means + standard error of 4 experiments with n = 10. A different letter indicates statistical significance $P < 0.05$.

ed on tomato seedlings of 8 and 12 weeks old. The DAE of *B. salicifolia* and *L. virginicum* at 1 and 2 % did not affect biomass yield when compared against control treatment (Figure 5), indicating that these extracts are safe for tomato seedlings.

Positive ion polarity HPLC-ESI-QTOF-MS analysis of active extracts. The extracts with the best allopathic activity and low phytotoxicity were analyzed by High

Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (HPLC-ESI-QTOF-MS). The chromatogram of *B. salicifolia* DAE showed two majoritarian peaks eluting at 12.77 and 15.52 minutes, with m/z 432.9852 and m/z 725.4692 respectively (Figure 6). The HPLC-ESI-QTOF-MS chromatogram of *L. virginicum* DAE showed also two majoritarian peaks eluting at 12.16 and 14.90 minutes with m/z 532.9326 and m/z 527.1659 respectively (Figure 7).

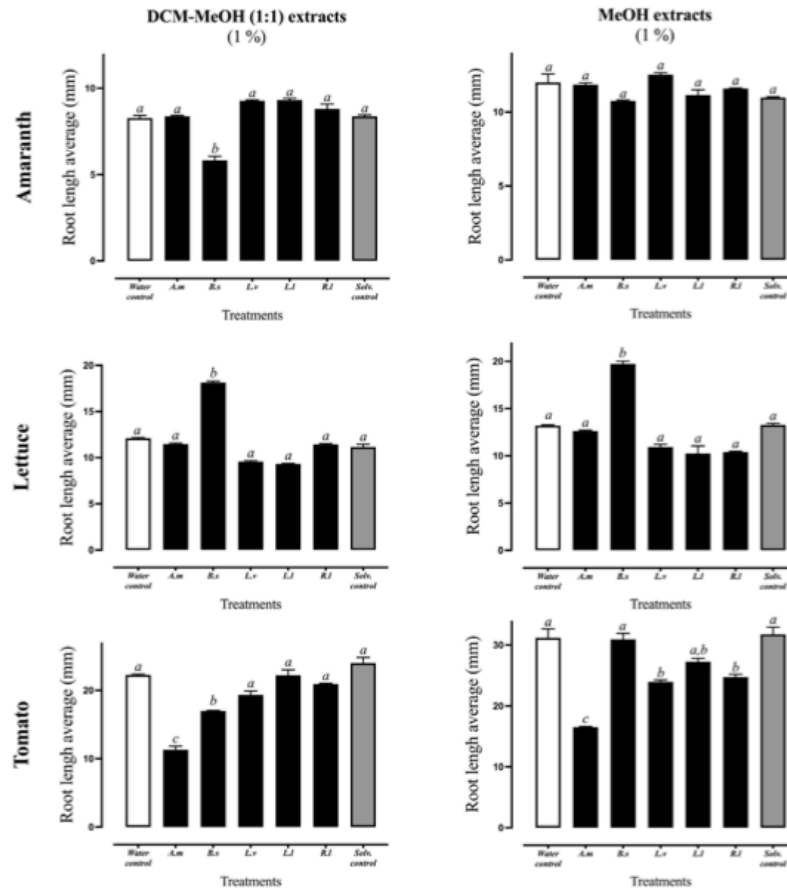


Figure 4. Assay of radicle elongation inhibition on amaranth, lettuce and tomato by DCM-MEOH and MeOH extracts (1 %) of the ruderal plants *Argemone mexicana* (A.m), *Baccharis salicifolia* (B.s), *Lepidium virginicum* (L.v), *Leucaena leucocephala* (L.l), and *Reseda luteola* (R.l). Means + standard error of 4 experiments with n= 10. A different letter indicates statistical significance $P < 0.05$.

Discussion

Most tomato farmers depend largely on pesticides for controlling diseases and pests (Vyvyan 2002). Among them, the herbicides glyphosate, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and bromomethane (CH₃Br), which pollute soils, groundwater aquifers, and air, are risky for the environment, and animal and human health (Morillo & Villaverde 2017). Some herbicides, such as CH₃Br, are

applied to the soil but are highly negative to the ozone layer and affect the human health. This product is severely restricted worldwide by the Vienna Convention in 1987 and the Montreal Protocol in 1988, which Mexico has signed (SEMARNAT 2015). To transform conventional agricultural production, researchers in pest control have concentrated their efforts on the search of natural products as pesticides (Vyvyan 2002, Garcia *et al.* 2005). It is expected, that the allelochemicals, as pure compounds or

Ruderal Plant Extracts' Phytotoxic Activity for Tomato Crop

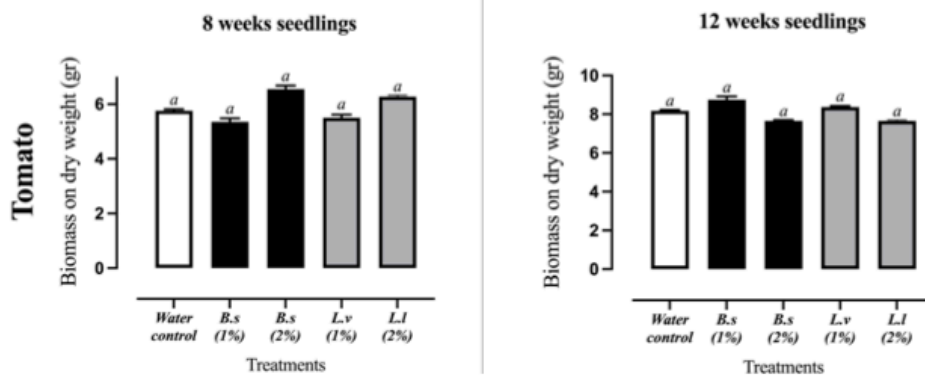


Figure 5. Effect on biomass of tomato seedlings (8 and 12 weeks old) by DAE (1 %) of the ruderal plants *Baccharis salicifolia* (*B.s*) and *Lepidium virginicum* (*L.v*). Means + standard error of 4 experiments with $n = 10$. A different letter indicates statistical significance $P < 0.05$

complex mixtures, extracted from plant tissues with water, or organic solvents, can be used for pest management as ecofriendly pesticides, without polluting soil, water, air (Farooq *et al.* 2011).

The aim of this work was to investigate the potential phytotoxic activity of five ruderal plants for its possible application for tomato crop in Tlaxcala, Mexico. The best results were obtained for the aqueous extracts (DAE) of *Baccharis salicifolia* and *Lepidium virginicum*. Both are ruderal shrubs, moreover, some small-scale farmers use them to surround their farmland and water channels in their traditional agroecosystems (Anaya *et al.* 1987, del Corral *et al.* 2012). The aqueous extracts from dry material (DAE) of *B. salicifolia* and *L. virginicum*, tested at 1 % w/v showed remarkable phytotoxic activity, inhibiting by 100 % the germination (Figures 1, 2), and logically the radicle elongation of amaranth and tomato seeds (Figure 3). These results are similar to treatment with 2,4-D at 1 % with these models (Anaya *et al.* 2003). DAE extracts did not have phytotoxic effects on biomass of tomato seedlings (8 to 12 weeks age) in greenhouse conditions (Figure 5). The next step will be to test these extracts in field conditions suggests Yvyyan (2002).

Comparable germination inhibition of 100 % has been reported with the aqueous extracts of *Tetraclinis articulata* (Cupressaceae) leaves at 30 g/L for lettuce seeds, in the case of tomato was 100 % with 40 g/L (M'barck *et al.* 2018). Therefore, DAE extracts of *B. salicifolia* and *L. virginicum* are 3-4 fold more potent than *T. articulata*.

The DCM-MeOH 1:1 (v/v) and MeOH extracts from *B. salicifolia* did not show phytotoxic activity; however, Palacios *et al.* (2010) and Dominguez (2002) reported strong germination inhibition (80 to 100 %) on amaranth and lettuce of *B. salicifolia* ethanol extracts at 10 %. Phytotoxic activity of the dichloromethane extract from the leaves of *B. salicifolia* has been reported on seeds of model plants (*Lolium multiflorum*, monocotyledon and *Lactuca sativa*, dicotyledon). This extract contains methoxylated flavanones, including sakuranetin, which showed herbicidal activity on the above-mentioned model plants (Dominguez 2002). Regarding to radicle elongation the aqueous extracts (DAE) of *B. salicifolia* and *L. virginicum* showed the highest inhibition (100 %) on amaranth.

Baccharis salicifolia has been thoroughly studied chemically, identifying 15 flavones (Dominguez *et al.* 1986), 7 flavanones (apigenin, quercetin, naringenin, sakuranetin) (Zdero *et al.* 1986, del Corral *et al.* 2012), several diterpenes, including 17 labdanes (Jakupovic *et al.* 1990, del Corral *et al.* 2012), three clerodanes some of them with β -xylopyranoside and β -fucopyranoside (Zdero *et al.* 1986, Jakupovic *et al.* 1990, Loayza *et al.* 1995), two triterpenes (del Corral *et al.* 2012), phytoosterols (Dominguez *et al.* 1986), monoterpenes (α -phellandrene, α -terpineol, α -thujene, camphene) (Loayza *et al.* 1995, Garcia *et al.* 2005, Carrizo Flores *et al.* 2009, Sosa *et al.* 2012), (cis- α -copaen-8-ol, bicyclogermacrene, germacrene-D) (Loayza *et al.* 1995, Garcia *et al.* 2005, Carrizo Flores *et al.* 2009, Sosa *et al.* 2012), cadinene deri-

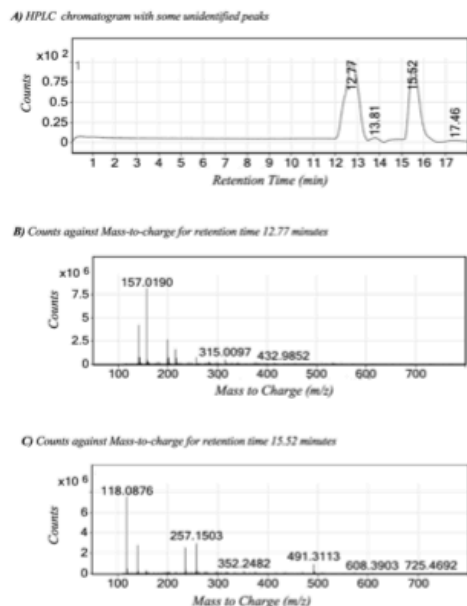


Figure 6. HPLC-ESI-QTOF-MS chromatograms of lyophilized DAE extracts. A) *Baccharis salicifolia* HPLC chromatogram. Retention times of major peaks: 12.77, and 15.52 minutes; B) MS spectrum of peak at 12.77 min; and C) MS spectrum of peak at 15.52 min.

vates (cadinols) (Zdero *et al.* 1986, Jakupovic *et al.* 1990, Loayza *et al.* 1995), and other compounds (baccharis oxide, benzofurans, coumarins) (Dominguez *et al.* 1986, Zdero *et al.* 1986).

Several flavonoids of *B. salicifolia*, such as quercetin, apigenin, naringenin showed phytotoxicity against *Lactuca sativa*, being the most effective quercetin at 15 - 40 ppm (Céspedes *et al.* 2006). In addition, from this species it has been isolated the diterpenoids, 5-hydroxy-6-hydro-salicifolic and salicifolic acids, together with sakuranetin, apigenin, and scopoletin (del Corral *et al.* 2012). Germination inhibition mediated by 5-hydroxy-6-hydro-salicifolic and salicifolic acids was determined against *Panicum miliaceum* and *Raphanus sativus*; and the 5-hydroxy-6-hydro-salicifolic acid resulted the most active compound (del Corral *et al.* 2012).

Regarding *Lepidium virginicum* L., several glucosinolates have been isolated from the leaves, such as sinigrin and their derivatives; these compounds are involved in the defense versus herbivorous insects (Agrawal & Kurashige

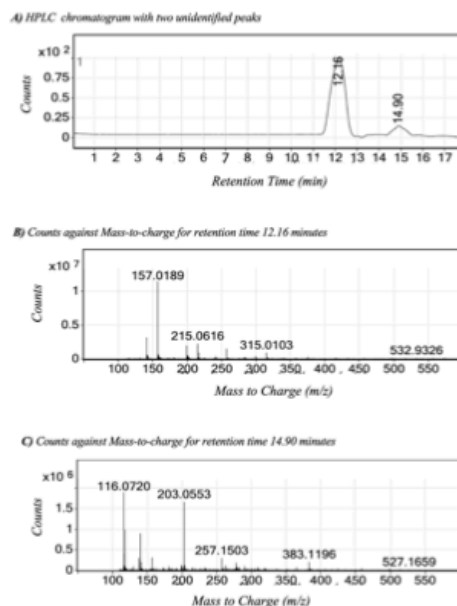


Figure 7. HPLC-ESI-QTOF-MS chromatograms of lyophilized DAE extracts. A) *Lepidium virginicum* HPLC chromatogram. Retention times of major peaks: 12.16, and 14.90 minutes; B) MS spectrum of peak at 12.16 min; and C) MS spectrum of peak at 14.90 min.

2003). The powders of aerial parts from some species of Brassicaceae family containing glucosinolates with herbicidal activity (Ahmed *et al.* 2020, El-Masry *et al.* 2019). In addition, benzylglucosinolate from *L. virginicum* is active against *Entamoeba histolytica* (Calzada *et al.* 2003) and has antimicrobial and insecticidal properties (Agrawal & Kurashige 2003).

The HPLC-ESI-QTOF-MS analysis showed two majoritarian peaks in the range with m/z 432.9- 725.4 for the active FAE extracts of *B. salicifolia* and also for *L. virginicum*. Since phytotoxic flavonoids, including apigenin, have been reported for *B. salicifolia* (Céspedes *et al.* 2006), it can be proposed FAE could contain glycosylated flavonoids, such as thalictiin (apigenin-7-alloside) with m/z 432.10565 isolated from *Cassia occidentalis* (Purwar *et al.* 2003). This molecular ion matches to that found for the peak m/z 432.9852 with retention time of 12.77 minutes (Figure 6). In the case of *L. virginicum*, FAE could have phytotoxic glucosinolates. However, further detailed chemical studies are needed for its identification.

In conclusion, two local ruderal plants from Tlaxcala, Mexico have phytotoxic activity on three model weeds (amaranth, lettuce and tomato). The best treatments were the aqueous extracts (DAE, 1 %) prepared with the dry aerial parts of *Baccharis salicifolia* and *Lepidium virginicum*. Both inhibited by 100 % the germination and radicle elongation of the three model weeds; but were not phytotoxic to tomato seedlings when watering the plantlets 72 hrs for 4 months. The HPLC-ESI-QTOF-MS analysis showed two majoritarian peaks in the range m/z 432-725 for each extract and could be glycosylated flavonoids for *B. salicifolia* and glucosinolates for *L. virginicum*. These aqueous extracts are promising material as natural herbicides for tomato crop reducing the dependence on synthetic herbicides. Future biological evaluations and identification of its active components are needed to advance in the generation of ecological alternatives for weeds control in tomato crop.

Acknowledgements

Mariana Miranda Arámbula was supported during her Ph.D. studies (Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México) by a fellowship from the Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (México). The first author is also grateful with Instituto Politécnico Nacional (IPN) for the License to conduct PhD studies. We are grateful with two anonymous reviewers for their valuable suggestions, to Dr. Rocio Gómez Cansino, to Biol. Blanca E. Bautista, Mrs. Teresa Caudillo Estrada, for technical support in the Allelopathy Laboratory, Instituto de Ecología. To Everardo Tapia Mendoza (LANCIC-IQ) Laboratory for technical assistance, and Dr. Guillermo Delgado Lamas, both at the Instituto de Química, UNAM.

Supplementary material

Supplemental data for this article can be accessed here: <https://doi.org/10.17129/botsci.2727>

Literature cited

- Abdel-Monaim MF, Abo-Elyousr KAM, Morsy KM. 2011. Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt diseases of lupine (*Lupinus termis* Forsik). *Crop Protection* **30**: 185-191. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.09.016>
- Adisa IO, Reddy Pullagurala VL, Rawat S, Hernandez-Viezas JA, Dimkpa CO, Elmer WH, White JC, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL. 2018. Role of cerium compounds in Fusarium wilt suppression and growth enhancement in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **66**: 5959-5970. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01345>
- Agrawal AA, Kurashige NS. 2003. A role for isothiocyanates in plant resistance against the specialist herbivore *Pieris rapae*. *Journal of Chemical Ecology* **29**: 1403-1415. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1024265420375>
- Ahmed SD.AG, Messiha NK, El-Masry RR, El-Dabaa MAT. 2020. The dual allelopathic capacity of two Brassicaceae plants' seed powder in controlling *Orobancha crenata* infesting *Pisum sativum* as well as stimulating its growth and yield. *Bulletin of the National Research Centre* **44**: 1-17. DOI: <https://doi.org/10.1186/s42269-020-0276-6>
- Anaya AL, Calera MR, Mata R, Pereda-Miranda R. 1990. Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomoea tricolor* cav. (Convolvulaceae). *Journal of Chemical Ecology* **16**: 2145-2152. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01026926>
- Anaya AL, Mata R, Sims JJ, González-Coloma A, Cruz-Ortega R, Guadaño A, Hernández-Bautista BE, Midland SR, Gómez-Pompa A. 2003. Allelochemical potential of *Callicarpa acuminata*. *Journal of Chemical Ecology* **29**: 2761-2776. DOI: <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000008019.22063.5c>
- Anaya AL, Ramos L, Cruz R, Hernández JG, Nava V. 1987. Perspectives on allelopathy in Mexican traditional agroecosystems: a case study in Tlaxcala. *Journal of Chemical Ecology* **13**: 2083-2101. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01012873>
- Bakht T, Khan IA. 2014. Weed control in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) through mulching and herbicides. *Pakistan Journal of Botany* **46**: 289-292.
- Bergougnoux V. 2014. The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnology Advances* **32**: 170-189. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.003>
- Calzada F, Barbosa E, Cedillo-Rivera R. 2003. Antiamoebic activity of benzyl glucosinolate from *Lepidium virginicum*. *Phytotherapy Research* **17**: 618-619. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.1210>
- Carrizo Flores R, Ponzi M, Ardanaz C, Tonn CE, Donadel OJ. 2009. Chemical composition of essential oil of *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pavon) Pers. and antibacterial activity. *Journal of the Chilean Chemical*

- Society* **54**: 475-476. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072009000400034>
- Céspedes CL, Marín JC, Domínguez M, Avila JG, Serrato B. 2006. Plant growth inhibitory activities by secondary metabolites isolated from Latin American flora. *Advances in Phytomedicine* **2**: 373-410. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1572-557X\(05\)02021-0](https://doi.org/10.1016/S1572-557X(05)02021-0)
- Da Cruz Cabral L, Fernandez Pinto V, Patriarca A. 2013. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology* **166**: 1-14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.026>
- de Coninck B, Timmermans P, Vos C, Cammue BP, Kazan K. 2015. What lies beneath: belowground defense strategies in plants. *Trends in Plant Science* **20**: 91-101. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.09.007>
- de Rodríguez DJ, Rodríguez García R, Hernández Castillo FD, Aguilar González CN, Galindo AS, Villarreal Quintanilla J, Moreno Zuccolotto L. 2011. In vitro antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. *Industrial Crops and Products* **34**: 960-966. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.03.001>
- del Corral S, Cuffini SL, Cardoso SG, Bortoluzzid AJ, Palacios SM. 2012. Phytotoxic halimanes isolated from *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pad.) Pers. *Phytochemistry Letters* **5**: 280-283. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phyto.2012.02.001>
- Domínguez LM. 2002. *Comparación de la actividad herbicida de dos especies de la familia Asteraceae; Baccharis salicifolia y Baccharis conferta*. BSc. Thesis. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Domínguez XA, El Dahmi S, Rombold C. 1986. Hydroxyacetophenone derivatives from *Baccharis glutinosa*. *Journal of Natural Products* **49**: 143-144. DOI: <https://doi.org/10.1021/np50043a019>
- El-Masry RR, El-Desoki ER, El-Dabaa MAT, Messiha NK, Ahmed SEDA. 2019. Evaluating the allelopathic potentiality of seed powder of two Brassicaceae plants in controlling *Orobanche ramosa* parasitizing *Lycopersicon esculentum* Mill. plants. *Bulletin of the National Research Centre* **43**: 101. DOI: <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0144-4>
- Farooq M, Jabran K, Cheema ZA, Wahid A, Siddique KH. 2011. The role of allelopathy in agricultural pest management. *Pest Management Science* **67**: 493-506. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.2091>
- García M, Donadel OJ, Ardanaz CE, Tonn CE, Sosa ME. 2005. Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum*. *Pest Management Science* **61**: 612-618. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.1028>
- Jakupovic J, Schuster A, Ganzer U, Bohlmann F, Boldt PE. 1990. Sesqui- and diterpenes from *Baccharis* species. *Phytochemistry* **29**: 2217-2222. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)83041-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)83041-X)
- Korres NE, Burgos NR, Duke SO, eds. 2019. *Weed Control: Sustainability, Hazards, and Risks in Cropping Systems Worldwide*. Arkansas, USA: CRC Press. Taylor & Francis Group. ISBN: 978-1-498-78746-8
- Loayza I, Abujder D, Aranda R, Jakupovic J, Collin G, Deslauriers H, Jean FI. 1995. Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. *Phytochemistry* **38**: 381-389. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00628-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00628-7)
- M'barek K, Zribi I, Haouala R. 2018. Allelopathic effects of *Tetralinis articulata* on barley, lettuce, radish and tomato. *Allelopathy Journal* **43**: 187-202. DOI: <https://doi.org/10.26651/allelo.j/2018-43-2-1140>
- Morillo E, Villaverde J. 2017. Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. *Science of the Total Environment* **586**: 576-597. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.020>
- Moshi AP, Matoju I. 2017. The status of research on and application of biopesticides in Tanzania. Review. *Crop Protection* **92**: 16-28. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.10.008>
- Palacios SM, del Corral S, Carpinella MC, Ruiz G. 2010. Screening for natural inhibitors of germination and seedling growth in native plants from Central Argentina. *Industrial Crops and Products* **32**: 674-677. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.05.004>
- Potito AP, Beatty SW. 2005. Impacts of recreation trails on exotic and ruderal species distribution in grassland areas along the Colorado Front Range. *Environmental Management* **36**: 230-236. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00267-003-0177-0>
- Purwar C, Rai R, Srivastava N, Singh J. 2003. New flavonoid glycosides from *Cassia occidentalis*. *Indian Journal of Chemistry* **42**: 434-436.
- Rongai D, Milano F, Sciò E. 2012. Inhibitory effect of plant extracts on conidial germination of the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *American Journal of Plant Sciences* **3**: 1693. DOI: <http://doi.org/10.4236/ajps.2012.312207>
- Rosas-Burgos EC, Cortez-Rocha MO, Cinco-Moroyoqui FJ, Robles-Zepeda RE, López-Cervantes J, Sánchez-Machado DI, Lares-Villa F. 2009. Antifungal activity

- in vitro of *Baccharis glutinosa* and *Ambrosia confertiflora* extracts on *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium verticillioides*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **25**: 2257. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0116-1>
- SAGARPA [Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación]. 2017. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) - Atlas Agroalimentario-Estadísticas del SIAP - Producción Agrícola en el Estado de Tlaxcala, enero y noviembre, 2016. URL: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. (accessed June 01, 2019)
- Scavo A, Pandino G, Restuccia A, Mauromicale G. 2020. Leaf extracts of cultivated cardoon as potential herbicide. *Scientia Horticulturae* **261**: 109024 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109024>
- SEMARNAT [Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales]. 2015. Agenda Internacional - Protocolo de Montreal - Protocolo de montreal relativo a las sustancias que agotan la capa de ozono URL: <https://www.gob.mx/semarnat/acciones-y-programas/protocolo-de-montreal-relativo-a-las-sustancias-que-agotan-la-capade-ozono-protocolo-de-montreal>. (accessed December 5, 2015)
- Sosa ME, Lancelle HG, Tonn CE, Andres MF, Gonzalez-Coloma A. 2012. Insecticidal and nematocidal essential oils from Argentinean *Eupatorium* and *Baccharis* spp. *Biochemical Systematics and Ecology* **43**: 132-138. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.03.007>
- Talibi I, Askarne L, Boubaker H, Boudyach EH, Msanda F, Saadi B, Aoumar AAB. 2012. Antifungal activity of some Moroccan plants against *Geotrichum candidum*, the causal agent of postharvest citrus sour rot. *Crop Protection* **35**: 41-46. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.12.016>
- Vyvyan JR. 2002. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron* **58**: 1631-1636. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(02\)00052-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(02)00052-2)
- Zdero C, Bohlmann F, King RM, Robinson H. 1986. Diterpene glycosides and other constituents from Argentinian *Baccharis* species. *Phytochemistry* **25**: 2841-2855. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83754-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83754-1)

Associate editor: Dr. Elihú Bautista

Author contributions: MMA, performed the experiments, contributed to conceptualization, methodology, design of experiments, validation, data analysis and wrote the initial draft; RRC, contributed in data curation and analysis, writing and edition of the final draft; ALAL, designed the study and supervised the experiments, and provided the funding.