

USO DE EXTRACTOS VEGETALES PARA EL CONTROL DEL MOSAICO SEVERO DEL CAUPÍ (Cp SMV).

Yamilet Rodríguez Díaz, Yarelis Ortiz Nuñez, German Olivera Hernández, Yannin Lorenzo Rodríguez, Mairym Cabezas Molina, Wilder Rodríguez Soto.

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT)
Calle 2 esq. 1 Santiago de las Vegas, Ciudad de La Habana, Cuba, CP 17200.
Email: zfundora@inifat.co.cu

RESUMEN

Las enfermedades virales constituyen un factor limitante en una producción, debido a su incidencia en la economía del hombre y su desarrollo social, ya que reducen la calidad de las plantas y sus productos, así como su disponibilidad y abastecimiento en los mercados. Entre los diferentes virus que atacan a la *Vigna* sp., el virus del Mosaico Severo del Caupí (CpSMV), ha sido reportado como uno de los más importantes, pudiendo reducir la productividad de la planta hasta un 81% y afectando la calidad de la semilla. Por otra parte, se reporta que diversas sustancias procedentes de plantas son capaces de inhibir o alterar el desarrollo de enfermedades virales y que las mismas permiten la obtención de virucidas racionales y compatibles con el medio ambiente. Por tal motivo nos propusimos en este trabajo evaluar el efecto virucida de los extractos acuosos de las plantas *Tagetes erecta* L. (Tv), *Solanum globiferum* Dun. (Sv₁ y Sv₂), *Carica papaya* L. (Ft₁, Ft₂, Fh₁, Fh₂) y *Bougainvillea spectabilis* Willd (Fp₁, Fp₂) frente al CpSMV, así como, el estudio fitoquímico de la plantas que mostraron mayor actividad. Los extractos se asperjaron 72 h antes de la inoculación del virus para medir su efecto como inductores de resistencia y se contaron las lesiones locales a partir de las 24 horas por comparación con el testigo enfermo, también al extracto Tv se le midió el efecto como inhibidor de la replicación viral asperjando el mismo 72 horas después de la inoculación del virus. Los extractos Tv, Sv₁, Fp₁, Fp₂ y Fh₁ mostraron muy buen efecto como inductores de resistencia frente a este virus, destacándose los extractos Tv, Fp₂ y Fh₁ por su persistencia en el tiempo. El tamizaje fitoquímico de *Bougainvillea spectabilis* mostró la presencia de fenoles, aminos, triterpenos-esteroides, alcaloides, flavonoides y azúcares reductores y en el caso de la planta *Tagetes erecta*, el tamizaje fitoquímico dió contenido de taninos, fenoles, triterpenos-esteroides, flavonoides, sesquiterpenlactonas y cumarinas.

Palabras claves: Efecto virucida, Mosaico Severo del Caupí, Tamizaje fitoquímico

EFFECT OF VEGETABLE EXTRACTS AGAINST THE SEVERE MOSAIC COWPEA VIRUS (CP SMV)

ABSTRACT

Viral diseases constitute a restrictive factor in production, due to their incidence in man's economy and their social development, since they reduce the quality of the plants and their products, as well as their availability and supply in the markets. Among the different virus that attack *Vigna* sp., Severe Cowpea Mosaic Virus (CpSMV), has been reported as one of the most important, reducing the productivity

of the plant till 81% and affecting the seed quality. On the other hand, it is reported that diverse substances coming from plants are able to inhibit or to alter the development of viral diseases and they allow to obtain rational virucides and compatible with the environment. For such a reason this work intended to evaluate the virucide effect of watery plant extracts of *Tagetes erecta* L. (Tv), *Solanum globiferum* Dun. (Sv1 and Sv2), *Carica papaya* L. (Ft1, Ft2, Fh1, Fh2) and *Bougainvillea spectabilis* Willd (Fp1, Fp2) against CpSMV, as well as, the phytochemical study of the plants that showed bigger activity. The extracts were spread 72 h before the inoculation of the virus, in order to measure their effect on the virus as resistance promoters, and local lesions were counted starting from 24 hours comparing with a diseased check; besides was measured the effect of the extract Tv, as an inhibitor of the viral replication, spreading it 72 hours after the inoculation of the virus. The extracts Tv, Sv1, Fp1, Fp2 and Fh1 showed very good effects resistance inducers against this virus, standing out the extracts Tv, Fp2 and Fh1 for their persistence in the time. The phytochemical screening of *Bougainvillea spectabilis* showed the presence of phenols, aminos, triterpens-steroids, alkaloids, flavonoids and sugars reducers, and in the case of *Tagetes erecta*, phytochemical screening showed the presence of tannins, phenols, triterpens-steroids, flavonoids, sesquiterpenlactones and cumarines.

Key words: Virucide effect, Severe Coowpea Mosaic virus, phytochemical screening

INTRODUCCION

Las enfermedades virales constituyen un factor limitante en una producción, debido a su incidencia en la economía del hombre y su desarrollo social, ya que reducen la calidad de las plantas y sus productos, así como su disponibilidad y abastecimiento en los mercados.

Entre los diferentes virus que atacan a la *Vigna* sp., el virus del Mosaico Severo del Caupí (Fig 1) ha sido reportado como uno de los más importantes. En Cuba fue reportado por Lastres et al¹, este virus es eficientemente diseminado en la naturaleza a través de Coleópteros (*Cerotoma ruficarmis* y *Diatrotica balteata*) y las plantas afectadas presentan síntomas de mosaico verde severo, con deformaciones de las hojas, entrenudos cortos y vainas deformes. Además dependiendo de la época de infección el virus puede reducir la productividad de la planta hasta un 81%, afectando la calidad de la semilla.

Se reporta que diversas sustancias procedentes de plantas son capaces de inhibir o alterar el desarrollo de enfermedades virales^{2,3}, basándonos en dichos reportes nos planteamos el estudio de la actividad viral de extractos vegetales obtenidos a partir de la flora cubana frente al Mosaico Severo del Caupí (CpSMV), así como, el estudio fitoquímico de las plantas de mayor actividad.

Fig. 1



MATERIALES Y METODOS

Procesamiento del material vegetal y obtención de los extractos.

Se estudiaron 4 especies de plantas diferentes (**Tabla 1**) las cuales fueron colectadas en áreas del INIFAT en diferentes épocas, las mismas fueron posteriormente secadas en estufa a 40 °C y molidas hasta polvo fino con excepción de la planta *Tagetes erecta* L. cuyas flores se utilizaron frescas.

A partir de los diferentes órganos estudiados se obtuvieron los extractos acuosos por maceración utilizando la agitación en zaranda durante 24 horas, los mismos fueron posteriormente filtrados por gaza y luego al vacío. Todos los extractos fueron preparados al 5 y 10 % de concentración excepto en el caso de *Tagetes erecta* (Fig 2) que se obtuvo al 25%

Fig. 2 *Tagetes erecta*



Fig. 3 *Bouganvillea spectabilis*



Fig. 4 *Solanum globiferum*

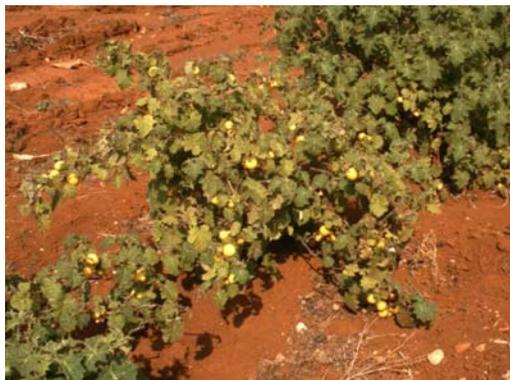


Tabla 1. Plantas estudiadas y extractos obtenidos.

N. CIENTÍFICO	N. común	Familia	Órgano de la planta	Extractos
<i>Tagetes erecta</i> L.	Flor de muerto	Asteraceae	Flores	Tv
<i>Solanum globiferum</i> Dun.	Guirito espinoso	Solanaceae	Frutos	Sv ₁ , Sv ₂
<i>Carica papaya</i> L.	Fruta bomba	Caricaceae	Tallo de la hoja Hojas	Ft ₁ , Ft ₂ Fh ₁ , Fh ₂
<i>Bougainvillea spectabilis</i> Willd	Flor de papel	Nictaginaceae	Hojas	Fp ₁ , Fp ₂

Subíndices: 1- Extracto al 5% 2- Extracto al 10%

Ensayos de la actividad virucida de los diferentes extractos

Tratamiento I (Efecto como inductor de resistencia)

El efecto como inductor de resistencia de los extractos Sv₁, Sv₂, Ft₁, Ft₂, Fh₁, Fh₂, Fp₁ y Fp₂ se evaluó frente al virus del Mosaico Severo del Caupí (CpSMV) aislado a partir de plantas de Caupí variedad H-82 mantenidas en casa de cristal, este virus se inoculó en hojas de frijol negro, variedad Bolita 42 utilizada como planta indicadora. Los extractos se asperjaron 72 h antes de la inoculación del virus y se contaron las lesiones locales a las 24, 48 y 168 horas por comparación con el testigo enfermo.

Tagetes erecta L.

El efecto como inductor de resistencia del extracto Tv fue evaluado de la manera explicada anteriormente a excepción de que el extracto se asperjó a las 24, 48 y 72 horas antes de la inoculación del virus y las lesiones locales se contaron a las 24, 48 y 72 horas.

Tratamiento II (Efecto como inhibidor de la replicación viral)

Se midió el efecto como inhibidor de la replicación viral del extracto Tv frente al virus CpSMV bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, en este caso, el

extracto se asperjó 24, 48 y 72 horas después de la inoculación del virus, determinándose el efecto por el conteo de las lesiones locales a las 24, 48 y 72 horas.

En ambos casos se inocularon plantas con virus solo (Testigo enfermo) y se dejaron plantas sin inocular (Testigo sano).

Estudio fitoquímico.

Se les realizó el tamizaje fitoquímico a las plantas *T. erecta* (Flores) y *B. spectabilis* (Hojas) según el procedimiento descrito por Rondina y Coussio⁴, en el mismo se determinan los diferentes grupos o familias de compuestos presentes en las plantas sobre la base de reacciones de coloración y de precipitación.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Los resultados del efecto virucida de los extractos Sv₁, Sv₂, Fp₁ y Fp₂ se muestran en la **Tabla 2**, en los mismos se observa que los extractos Sv₁ y Fp₂ mostraron buena efectividad, dentro de las primeras 24h, como inductores de resistencia frente al virus, la cual se incrementó a partir de las 48 h, seguidos del extracto Fp₁, sin embargo, al cabo de la semana (168h) el extracto Sv₁ perdió efectividad pero los extractos Fp₁ y Fp₂ obtenidos de la misma planta, pero a diferentes concentraciones, mantuvieron su estabilidad y efectividad en el tiempo, presentando los resultados más positivos, por lo que se puede destacar que los extractos de la flor de papel tuvieron un mayor efecto de persistencia o acumulación en la planta de frijol protegiéndola un mayor período contra la infección del virus. Esto confirma lo planteado por otros autores acerca de la actividad antiviral de extractos foliares de la planta *Bougainvillea spectabilis* (Fig. 3) frente a determinados virus como es el caso del Mosaico de la Caña de Azúcar (VMCA) donde se ha obtenido entre un 80 y 100 por ciento de inhibición a la infección de este virus^{5,6}.

Tabla 2: Porcentaje de efectividad de los extractos como inductores de resistencia al virus del CpSMV (%).

EXTRACTOS	24 H	48H	168H
Sv ₁	69.3	85.8	67.9
Sv ₂	35.0	59.2	52.0
Fp ₁	41.0	81.6	70.8
Fp ₂	69.3	85.8	80.8

Los resultados del efecto virucida de los extractos Ft₁, Ft₂, Fh₁ y Fh₂ se muestran en la **Tabla 3**, todos los extractos mostraron buena efectividad a las 24 horas alcanzándose hasta un 90,9% para el caso del extracto Ft₁, sin embargo, el mismo no mantuvo esa actividad durante las próximas 48 y 168 horas presentando valores de lesiones locales muy por encima del testigo enfermo, sucediendo lo mismo con el extracto Ft₂ al parecer esto se encuentra asociado a la abundancia de carbohidratos en el tallo (pedúnculo) de la planta. El extracto Fh₂ mantuvo su efectividad hasta las 48 horas, disminuyendo a las 168 horas y el extracto Fh₁ mantuvo su efectividad todo este período, presentando los mejores resultados en comparación con los extractos anteriores, al mantenerse en el rango de 63-69%, por lo que se puede

destacar que el mismo tuvo un mayor efecto de persistencia en la planta de frijol protegiéndola un mayor período contra la infección del virus. Otros estudios se han realizado con los extractos de la hoja de fruta bomba para evaluar su actividad frente a tres virus de la propia planta y los resultados han mostrado que los mismos tienen efecto inhibitorio en un rango de 60-80%⁷.

Tabla 3: Porcentaje de efectividad de los extractos como inductores de resistencia al virus del CpSMV (%).

EXTRACTOS	24H	48H	168H
Ft ₁	90.9	-	-
Ft ₂	68.2	-	-
Fh ₁	65.2	69.9	63.4
Fh ₂	72.7	67.0	42.1

***Tagetes erecta* L.**

Como resultado de los experimentos, en el tratamiento I, el número de lesiones locales en las plantas de frijol (Bolita 42) disminuyeron con el tiempo a valores ínfimos respecto al testigo enfermo, resultando el extracto floral efectivo a partir de las 24 y hasta las 72 horas según se observa en la **Tabla 4**, alcanzándose más de un 90% de efectividad. Sin embargo, en el tratamiento II, el número de lesiones locales aumentaron con el tiempo acercándose a valores del testigo enfermo por lo que el extracto no mostró valores significativos como inhibidor de la replicación viral, disminuyendo el porcentaje de efectividad en el tiempo. Por lo tanto podemos concluir que el extracto floral de *Tagetes erecta* mostró un fuerte efecto como inductor de resistencia frente al Virus del Mosaico Severo del Caupí (CpSMV) bajo las condiciones antes expuestas.

Tabla 4. Porcentaje de efectividad del extracto floral (Tv) frente al CpSMV.

TRATAMIENTOS	24H	48H	72H
I Inductor de resistencia	91.6	97.5	99.6
II. Inhibidor de la replicación viral	43.6	24.8	18.1

Haciendo un análisis general de todos los extractos evaluados podemos finalmente decir que aunque los resultados no son concluyentes podemos establecer el siguiente orden entre los extractos evaluados por la efectividad de los mismos:

$$Tv > Fp_1, Fp_2 > Fh_1 > Sv_1$$

Entre estos se destaca por su persistencia y estabilidad los extractos Tv, Fp₂ y Fh₁.

Estas investigaciones contribuyen al conocimiento de los agentes antivirales y constituyen un método potencial de gran importancia para el control de las enfermedades virales.

Resultados del tamizaje fitoquímico

Los tamizajes fitoquímicos de las plantas *T. erecta* y *B. spectabilis* se muestran en la **Tabla 5**.

En el caso de *B. spectabilis* el mismo mostró la presencia de fenoles, aminos, triterpenos-esteroides, alcaloides, flavonoides y azúcares reductores, lo cual concuerda con lo reportado por Molina et al.⁸ y otros investigadores⁹, excepto la presencia de saponinas reportada por la primera autora. Los estudios de Molina et al.⁸ indican que de los grupos de compuestos presentes en extractos foliares de *B. spectabilis* los alcaloides y las proteínas juegan un rol importante en la inhibición que manifiestan estos frente al VMCA, asignándosele a los alcaloides una mayor efectividad antiviral. El efecto antiviral señalado a estos grupos de compuestos pudiera asociarse con la existencia de nitrógenos básicos en ambos, es decir, a una posible relación estructura-actividad biológica.

Tabla 5: Resultados del tamizaje fitoquímico realizado a las plantas.

Grupos químicos	ENSAYOS	<i>t. ERECTA</i>	<i>B. ESPECTABILIS</i>
Aminos	Ninhidrina	(-)	(+)
Taninos y fenoles	Gelatina, cloruro férrico	(+)	(++)
Triterpenos-esteroides	Lieberman-Burchard	(++)	(++)
Quinonas	Borntrager	(-)	(-)
Alcaloides	Mayer, Wagner	(-)	(+)
Cardenólidos	Kedde	(-)	(-)
Flavonoides	Shinoda	(+)	(++)
Proto-antocianidinas	Roseheim	(+/-)	(-)
Azúcares reductores	Fehling	(-)	(++)
Saponinas	Espuma	(-)	(-)
Leuco-antocianidinas	Ácido clorhídrico	(-)	(-)
Sesquiterpenlactonas	Hidroxamato férrico	(+)	(-)
Cumarinas	Vainillina-H ₂ SO ₄	(+)	(-)

(++): positivo, reacción muy fuerte

(+): positivo, reacción fuerte

(-): negativo

El tamizaje fitoquímico de la planta *Tagetes erecta* dió contenido de taninos, fenoles, triterpenos-esteroides, flavonoides, sesquiterpenlactonas y cumarinas, además de los tiofenos ampliamente reportados en la literatura¹⁰ y a los que se les atribuye mayormente la actividad biológica de la planta, estos compuestos azufrados son fototóxicos, es decir, su actividad es dependiente en gran medida de la luz debido a la formación de moléculas electrónicamente excitadas.

El resto de los compuestos también tienen efecto insecticida como es el caso de los fenoles que actúan como anti-alimentarios e inhibidores de enzimas, y como sustancias reactivas o pegajosas sobre la superficie de las plantas, e incluyen los ácidos fenólicos y sus glicósidos; los compuestos de naturaleza terpénica, como el b-ocimeno y la tagetona, siendo ésta última un fitojuvenoide que impide la metamorfosis de los insectos¹¹.

Según diversos autores las sustancias naturales pueden afectar la infección, ya sea interactuando directamente con el virus, o indirectamente, mediante un efecto sobre el hospedante. Existen evidencias de que en muchos casos donde la inhibición es mediada por el hospedante, el incremento de la resistencia se debe a la formación de sustancias que inhiben a los virus dentro de los tejidos ^{6, 12}. Estas y otras incógnitas pudieran ser objetos de futuras investigaciones.

Por el momento, estos estudios contribuyen al conocimiento de agentes antivirales procedentes de extractos de plantas que constituyen un método potencial de gran importancia para el control de las enfermedades virales de manera compatible con el medio ambiente.

CONCLUSIONES

- ✚ El extracto acuoso de *T. erecta* mostró muy buen efecto como inductor de resistencia al CpSMV.
- ✚ Los extractos Sv₁, Fp₁, Fp₂ y Fh₁ mostraron muy buen efecto como inductores de resistencia frente al CpSMV, destacándose el extracto Fp₂ por su persistencia en el tiempo.
- ✚ El tamizaje fitoquímico de *B. spectabilis* mostró la presencia de fenoles, aminos, triterpenos-esteroides, alcaloides, flavonoides y azúcares reductores.
- ✚ El tamizaje fitoquímico de la planta *Tagetes erecta* dió contenido de taninos, fenoles, triterpenos-esteroides, flavonoides, sesquiterpenlactonas y cumarinas.

RECOMENDACIONES

- Continuar profundizando en el estudio del extracto floral de *T. erecta* y del extracto de hojas de la Flor de papel como posibles agentes antivirales frente al virus mencionado y otros más, para su aplicación y extensión.

- Realizar el aislamiento de los crudos de metabolitos que pudieran ser responsables de la actividad virucida de estas plantas basados en los resultados cualitativos de los tamizajes fitoquímicos realizados y probar su actividad antiviral.

REFERENCIAS

- Lastres, N.A. 1993** El virus del mosaico severo del caupí en Cuba. *I Jornada Científico-Técnico-Productiva sobre el cultivo de Vigna en Cuba.*
- Verma, H.N.; Srivastava, S.; Kumar, D. 1996.** Induction of systemic resistance in plants against viruses by a basic protein from *Clerodendrum aculeatum* leaves. *Phytopathology*, 86 (5), pg.485-492.
- Bajpai, S.k.; Chandra, K. 1990.** Studies on the antiviral properties of plants with special reference to *Zingiber capitatum*. *Fitoterapia*, LXI (1).
- Rondina, R. y Coussio, J. 1969.** Estudio fitoquímico de plantas medicinales Argentinas. I. Rev. Inv. Agrop. INTA. Serie 2. Biología y producción vegetal 6.pg. 351-359.

- Molina, M. y León, O. 1991.** Efectividad antiviral de extractos foliares de *Bougainvillea spectabilis*, *Capsicum annuum*, *Datura metel* y *Datura stramonium* sobre el Virus del Mosaico de la Caña de Azúcar. *Rev. Protección Veg.* pg. 150-155.
- Molina, M. 1987.** Resistencia inducida contra el Virus del Mosaico de la Caña de Azúcar por inoculación de extractos de *Bougainvillea spectabilis* en plantas de sorgo. *Rev. Protección Veg.* V-2 pg. 185-188.
- Khurana, S.M.P and Bhargava, K.S. 1970.** Effect of plant extracts on the activity of three papaya viruses. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 16, pg. 225-230.
- Molina, M. y Sánchez, L. María. 1991.** Inhibidores foliares de *Bougainvillea spectabilis*. Naturaleza química y efectividad antiviral sobre el Virus del Mosaico de la Caña de Azúcar (VMCA). *Rev. Protección Veg.* pg., V-6, pg. 58-66.
- Corral, A.; De la Paz, J.; Concepción, E.; Hernández, R. y Lorelay, D. 1997.** Tamizaje, tecnología, control de la calidad y farmacología del extracto fluído de *Bougainvillea spectabilis* Willd. *Rev. Cubana Plant. Med.*, 2 (2-3), pg. 19-25.
- Kagan, J. 1991.** Naturally occurring di y trithiophenes. *Progress in the chemistry of Organic Natural Products.*
- Alfonso, M. et al. 2000** Informe final del proyecto "Obtención de agroquímicos naturales para el manejo integrado de plagas." INIFAT.
- Prasad, V. 1983.** Inhibitors of viruses: Systemic resistance inducers from higher plants. En: *Recent advances in Plant Pathology*, A. Hussain et al. (eds.), pp312-324.