



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

## **Bioactividad del extracto etanólico de *Tagetes lucida* Cav. sobre diversos hongos y bacterias fitopatógenos**

T E S I S      P R O F E S I O N A L  
QUE    PARA    OBTENER    EL    TITULO    DE  
**B      I      O      L      O      G      A**  
P    R    E    S    E    N    T    A:  
ORTIZ      VOLLBERT      ANA      ISABEL

DIRECTORA DE TESIS: M. en C. MARÍA DE JESUS SÁNCHEZ COLÍN



MÉXICO D.F.

JUNIO 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

*“Las ciencias tienen las raíces  
amargas, pero muy dulces los frutos”*

Aristóteles

## AGRADECIMIENTOS

*A la Universidad Nacional Autónoma de México, a su Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, porque al permitirme el acceso al conocimiento y la cultura me brindó las herramientas para subir escalones más altos cada día.*

*A mi asesora, la maestra María de Jesús Sánchez Colín por su confianza y apoyo incondicionales manifestados a través de las numerosas horas y vastos conocimientos compartidos, mismos que fueron fundamentales para el desarrollo del presente trabajo.*

*A los maestros Manuel Rico Bernal, Elvia García Santos y Susana Luna Rosales quienes fungieron como revisores de esta tesis, quiero darles las gracias por el tiempo dedicado y los consejos brindados con lo que contribuyeron a enriquecer este trabajo.*

*Al maestro Carlos Castillejos Cruz, quien además de ser uno de los revisores de esta tesis ha constituido desde primer semestre un pilar significativo para mi formación académica durante mi estancia en la facultad.*

*A mis compañeras tesisistas Cristina, Catalina y Norma por toda la ayuda prestada, por los conocimientos y experiencias compartidas durante nuestra estancia en el laboratorio.*

*Agradezco a todos mis compañeros y al final amigos, que en el transcurso de esta bella carrera, de una u otra manera me ayudaron, acompañaron y enseñaron diversas y valiosas experiencias de vida, a los cuales no es necesario mencionar ya que cada uno de ustedes sabe de que manera influyeron en mí.*

*Y mi agradecimiento sincero y profundo para ti Danny por tu incansable e incondicional apoyo durante todo este tiempo, gracias por la confianza y comprensión que siempre has depositado en mí.*

## DEDICATORIAS

*Quiero dedicar esta tesis a mi familia:*

*A mi padre Luciano Ortiz Herrera por todo lo que has hecho por mí, por hacerme y permitirme ser una persona libre de acción y pensamiento, gracias Pá por enseñarme a no ser conformista y por cada una de las experiencias y conocimientos de vida que me has inculcado.*

*A mi madre Pilar Iglesias Villafuerte porque tu ejemplo contribuyó a hacer de mí una persona capaz de lograr lo que se propone, y he aquí una muestra de ello.*

*A mi madre Ana María Vollbert Fortuño por enseñarme que hay otras formas de ver la vida y por ayudarme a sacar de mí la mejor persona que puedo ser, todos merecemos una segunda oportunidad.*

*A mis hermanos Ernesto, Yerugami y Edai con la firme esperanza de que esta meta obtenida sirva como inspiración que haga también florecer al mejor ser humano que hay en ustedes mismos.*

**Bioactividad del extracto etanólico de *Tagetes lucida* Cav. sobre diversos hongos y bacterias fitopatógenos**

## INDICE

	Pág.
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>CAPITULO I</b> .....	4
MARCO TEÓRICO	
1.1 Plantas con efectos antimicrobianos.....	4
1.2 Metabolitos secundarios de las plantas medicinales.....	6
1.2.1 ¿Qué son los metabolitos secundarios?.....	6
1.2.2 ¿Qué función tienen en las plantas?.....	8
1.2.3 Metabolitos secundarios que presentan efecto antimicrobiano.....	9
1.3 Enfermedades de las plantas.....	11
1.3.1 Concepto de enfermedad en las plantas.....	11
1.3.2 Importancia de las enfermedades en las plantas.....	13
1.3.3 Clasificación de las enfermedades en cuanto al daño.....	15
1.3.4 Factores que determinan la enfermedad.....	16
1.3.5 Agentes que causan enfermedades en las plantas.....	17
1.4 Características generales de bacterias y hongos fitopatógenos.....	19
1.4.1 Diversidad, estructura y morfología de bacterias fitopatógenos....	19
1.4.2 Diversidad, estructura y morfología de hongos fitopatógenos.....	20
1.5 Control de fitopatógenos.....	21
1.6 Características particulares de los fitopatógenos utilizados en el estudio y métodos de control.....	24
1.7 Características de <i>Tagetes lucida</i> Cav. ....	33
1.7.1 Clasificación taxonómica.....	33
1.7.2 Descripción botánica.....	34
1.7.3 Distribución geográfica y ecología.....	34

	Pág.
1.7.4 Usos de <i>Tagetes lucida</i> Cav. ....	35
1.7.5 Composición química.....	36
1.7.6 Estudios previos sobre el efecto antimicrobiano de los extractos de <i>Tagetes lucida</i> Cav. ....	38
<b>CAPITULO II</b> .....	40
HIPÓTESIS.....	40
OBJETIVOS	
Objetivo general.....	40
Objetivos específicos.....	40
<b>CAPITULO III</b> .....	41
MATERIL Y MÉTODO	
3.1 Obtención del extracto.....	41
3.1.1 Obtención de material biológico.....	41
3.1.2 Preparación del material vegetal.....	41
3.1.3 Obtención del extracto etanólico.....	41
3.1.4 Concentración del extracto y obtención del peso seco.....	42
3.2 Pruebas de sensibilidad antimicrobiana.....	42
3.2.1 Obtención de las cepas.....	42
3.2.2 Preparación de las concentraciones.....	43
3.2.3 Impregnación de sensidiscos.....	44
3.2.4 Estandarización del inóculo microbiológico.....	44
3.2.5 Siembra del inóculo.....	45
3.2.6 Preparación de antibiogramas.....	45
3.6.7 Determinación de la Concentración Mínima inhibitoria (CMI).....	46
3.3 Elaboración del diseño experimental.....	46
<b>CAPITULO IV</b> .....	47
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Rendimiento del extracto en peso seco de <i>Tagetes lucida</i> Cav. ....	47
4.2 Pruebas de sensibilidad antimicrobianas (antibiogramas).....	48



	Pág.
4.3 Determinación del patógeno más sensible al extracto de <i>Tagetes lucida</i> .....	68
4.4 Concentración mínima inhibitoria.....	72
<b>CAPITULO V</b>	
CONCLUSIONES.....	74
<b>CAPITULO VI</b>	
RECOMENDACIONES.....	76
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	77

## INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Vías generales del metabolismo secundario de las plantas y su relación con el metabolismo primario.....	7
Figura 2. Funciones básicas de las plantas y la interferencia que sobre ellas ocasionan algunos tipos comunes de enfermedades.....	12
Figura 3. Planta de <i>Tagetes lucida</i> Cav. ....	34
Figura 4. Distribución de <i>Tagetes lucida</i> Cav. ....	35
Figura 5. Efecto del extracto de <i>T. lucida</i> sobre el cultivo de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	51
Figura 6. Efecto del extracto de <i>T. lucida</i> sobre el cultivo de <i>Sclerotium cepivorum</i> .....	54
Figura 7. Efecto del extracto de <i>T. lucida</i> sobre el cultivo de <i>Penicillium</i> sp.	56
Figura 8. Efecto del extracto de <i>T. lucida</i> sobre el cultivo de <i>Penicillium</i> sp.	58
Figura 9. Efecto del extracto de <i>T. lucida</i> sobre el cultivo de <i>Pseudomonas marginalis</i> .....	61
Figura 10. Efecto del extracto de <i>T. lucida</i> sobre el cultivo de <i>Pseudomonas marginalis</i> .....	63
Figura 11. Efecto del extracto de <i>T. lucida</i> sobre el cultivo de <i>Erwinia carotovora</i> .....	65

## INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Agentes responsables de las enfermedades en las plantas.....	18
Cuadro 2. Clasificación taxonómica de <i>Tagetes lucida</i> Cav. ....	33
Cuadro 3. Cepas de fitopatógenos utilizados para las pruebas microbiológicas.....	43
Cuadro 4. Escala de McFarland para la estandarización del inóculo microbiológico.....	44
Cuadro 5. Rendimiento del extracto en peso seco de <i>Tagetes lucida</i> Cav.	47
Cuadro 6. Respuesta de los hongos al extracto de <i>Tagetes lucida</i> Cav. ....	48
Cuadro 7. Respuesta de las bacterias al extracto de <i>Tagetes lucida</i> Cav. ...	49
Cuadro 8. Prueba de comparación múltiple de Tukey por concentración para <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	51
Cuadro 9. Prueba de comparación múltiple de Tukey por concentración para <i>Sclerotium cepivorum</i> .....	53
Cuadro 10. Prueba de comparación múltiple de Tukey por concentración para <i>Penicillium</i> sp. ....	56
Cuadro 11. Prueba de comparación múltiple de Tukey por concentración para <i>Penicillium</i> sp. ....	58
Cuadro 12. Prueba de comparación múltiple de Tukey por concentración para <i>Pseudomonas marginalis</i> .....	60
Cuadro 13. Prueba de comparación múltiple de Tukey por concentración	

	Pág.
para <i>Pseudomonas marginalis</i> .....	62
Cuadro 14. Prueba de comparación múltiple de Tukey por concentración para <i>Erwinia carotovora</i> .....	65
Cuadro 15. Prueba de comparación múltiple de Tukey por concentración para <i>Erwinia carotovora</i> .....	67
Cuadro 16. Prueba de comparación múltiple de Tukey entre hongos.....	69
Cuadro 17. Prueba de comparación múltiple de Tukey entre bacterias.....	71

## INDICE DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Tamaño promedio del halo de inhibición (mm) de las diferentes concentraciones del extracto de <i>T. lucida</i> sobre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	50
Gráfica 2. Tamaño promedio del halo de inhibición (mm) de las diferentes concentraciones del extracto de <i>T. lucida</i> sobre <i>Sclerotium cepivorum</i> .....	53
Gráfica 3. Tamaño promedio del halo de inhibición (mm) de las diferentes concentraciones del extracto de <i>T. lucida</i> sobre <i>Penicillium</i> sp. ...	55
Gráfica 4. Tamaño promedio del halo de inhibición (mm) de las diferentes concentraciones del extracto de <i>T. lucida</i> sobre <i>Penicillium</i> sp. ...	57
Gráfica 5. Tamaño promedio del halo de inhibición (mm) de las diferentes concentraciones del extracto de <i>T. lucida</i> sobre <i>Pseudomonas marginalis</i> .....	60
Gráfica 6. Tamaño promedio del halo de inhibición (mm) de las diferentes concentraciones del extracto de <i>T. lucida</i> sobre <i>Pseudomonas marginalis</i> .....	62
Gráfica 7. Tamaño promedio del halo de inhibición (mm) de las diferentes concentraciones del extracto de <i>T. lucida</i> sobre <i>Erwinia carotovora</i> .....	64
Gráfica 8. Tamaño promedio del halo de inhibición (mm) de las diferentes concentraciones del extracto de <i>T. lucida</i> sobre <i>Erwinia carotovora</i> .....	66

	Pág.
Gráfica 9. Comparación del tamaño promedio de los halos de inhibición entre las diferentes cepas de hongo.....	68
Gráfica 10. Comparación del tamaño promedio de los halos de inhibición entre las diferentes cepas de bacterias.....	70
Gráfica 11. Tamaño promedio de los halos de inhibición encontrados para la CMI de cada patógeno.....	72

## RESUMEN

La tendencia mundial al respecto del uso de agroquímicos ha sido indiscriminada e intensa, lo cual ha generado una problemática sanitaria y medioambiental que se manifiesta con el desarrollo de resistencia por parte de las cepas de patógenos, la agricultura debe establecer nuevas alternativas de control biológico que minimicen estos problemas; en este sentido una alternativa para el control de enfermedades en las plantas es el uso de extractos vegetales, lo que permitiría el manejo integrado de los cultivos, debido a su bajo costo y al menor impacto sobre el ambiente y los alimentos. No obstante, hay pocos trabajos sobre el control de fitopatógenos con extractos de plantas. Por lo tanto, en el presente trabajo se analizó el efecto antifúngico y antibacterial del extracto etanólico de *Tagetes lucida* Cav. (Pericón), mediante el método de difusión en agar con base en la formación de halos de inhibición alrededor de sensidiscos impregnados con el extracto (antibiograma). La acción antifúngica se probó sobre los hongos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotinia* sp. y dos cepas de *Penicillium*, mientras que la acción antibacterial se analizó sobre dos cepas de bacterias fitopatógenas *Pseudomonas marginalis* y *Erwinia carotovora*, evaluándose las concentraciones de 30, 60, 90, 120 y 180 mgmL<sup>-1</sup>. Los antibiogramas se realizaron en medio de cultivo Agar Mueller-Hinton para bacterias y Agar Dextrosa Sabouraud para hongos.

Se encontró que el extracto de *Tagetes lucida* presentó efecto antibacterial en cuatro de las cinco cepas analizadas y antifúngico también en cuatro de las cinco cepas estudiadas. A la concentración de 30 mgmL<sup>-1</sup> se encontró inhibición del hongo *Penicillium* sp. (JUG06-MP14(2)) y la bacteria *Pseudomonas marginalis* (1H), a los 60 mgmL<sup>-1</sup> se observó la inhibición de los hongos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum* y *Penicillium* sp. (JUG06-MP14(3)) y las bacterias *Erwinia carotovora* (4P) y *Erwinia carotovora* (Ls-N6SS5), finalmente, la bacteria *Pseudomonas marginalis* (Ls-1) presentó inhibición a la concentración de 90 mgmL<sup>-1</sup>. Se determinó que el hongo más sensible al extracto fue *Penicillium* sp. (JUG06-MP14(2)) mientras que la bacteria más sensible fue *Pseudomonas marginalis* (1H).

Palabras clave: Fitopatógenos, *Tagetes lucida*, Antibiogramas, Extractos de plantas.

## INTRODUCCIÓN

Todo lo que afecta la salud de las plantas influye en su desarrollo y productividad, lo cual disminuye de manera notable su utilidad para la naturaleza y para el hombre. Por lo que, el crecimiento y rendimiento de las plantas depende no sólo de la disponibilidad de agua y nutrimentos en el suelo donde se desarrollan o de algunos factores del ambiente como la temperatura, luz y humedad; sino también de la resistencia y protección que tengan contra el ataque de plagas, malezas y fitopatógenos (Agrios, 1996).

Los cultivos son producidos con un alto riesgo de ser afectados por enfermedades, por lo que los agricultores utilizan, en su mayoría, productos químicos sintéticos como principal estrategia de combate, lo que puede incrementar la contaminación ambiental, el daño a la salud humana y los costos de producción, esto ha generado una gran preocupación por el medio ambiente y ha motivado a que un gran número de investigadores busquen alternativas viables, efectivas y seguras para el control de plagas y enfermedades de plantas con interés comercial (Agrios, 1996; Gaspari *et al.*, 2006). Sin embargo, en la actualidad el uso de agroquímicos de origen sintético es frecuente a pesar de que acarrea diversos problemas no sólo para las plantas, sino también para el hombre, por lo que el uso de sustancias de origen orgánico o natural, obtenidos a partir de los principios activos de algunas plantas, sería una alternativa para combatir a los fitopatógenos sin causar daños al ambiente, la fauna, los cultivos, al suelo y al hombre (De la Isla, 1994).

Dentro de los fitopatógenos más comunes se encuentran las bacterias y los hongos que causan enfermedades sistémicas que provocan la pudrición de meristemas, de raíz y de vástago y con ello la muerte de las plantas o daños al follaje, flores, frutos o semillas, lo que produce problemas para la comercialización de los productos. Por tal motivo existe la necesidad de emplear diversas sustancias para combatir las, al respecto, existen antecedentes de la capacidad antibacteriana y antifúngica de los extractos de *Tagetes lucida* Cav. planta conocida como pericón (Céspedes *et al.*, 2006; Garduño, 2007).



*Tagetes lucida* es una planta que pertenece a la familia de las compuestas y tradicionalmente ha sido empleada como medicinal para tratar una gran variedad de padecimientos que afectan al ser humano, pero hasta el momento la investigación que se ha desarrollado sobre su capacidad para inhibir el crecimiento de hongos y bacterias que afectan a las plantas es muy limitada. Por tal motivo y al considerar la importancia de la biodiversidad, y particularmente la de los cultivos con interés económico, así como los resultados obtenidos en investigaciones anteriores con los extractos de pericón, en el presente trabajo, se analizó la actividad antimicrobiana del extracto de *Tagetes lucida* Cav. sobre el crecimiento *in vitro* de las bacterias *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas marginalis* y los hongos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotinia* sp. y *Penicillium* sp.

## CAPITULO I

## MARCO TEÓRICO

**1.1 Plantas con efectos antimicrobianos**

De acuerdo con Pitman y Jorgensen (2002) (citados por Mendoza *et al.*, 2007), se estima que en el mundo existen entre 310,000 y 422,000 especies de plantas; dentro de esta vasta diversidad, se estima que existen 20,000 especies vegetales con propiedades de interés para la investigación y el descubrimiento de nuevos productos. Sin embargo, se calcula que menos del 10% de las plantas han sido evaluadas en la búsqueda de actividad biológica (Harvey, 2000; Céspedes *et al.*, 2006).

La actividad biológica o valor medicinal que presenta una planta se debe a la presencia en el tejido de ésta, de una o algunas sustancias químicas (principio activo) que ejercen una acción farmacológica en los seres vivos en general. Sin embargo no todos los productos metabólicos de las plantas tienen propiedades con valor medicinal (Tyler, 1979).

De manera general, los fármacos derivados de fuentes naturales proceden en su mayoría de espermatofitas que predominan en el campo. Entre las espermatofitas, el número de especies con actividad biológica útil están desigualmente repartidos entre las gimnospermas, que producen diversas esencias y resinas útiles, así como el alcaloide efedrina; y las angiospermas, dentro de las cuales el grupo de las dicotiledoneas presenta más especies con estas propiedades (Evans y Trease, 1991).

Los productos terapéuticos de origen biológico, también denominados naturales son sustancias producidas por microorganismos y que a muy bajas concentraciones tienen la capacidad de inhibir, detener o destruir otros microorganismos. En el control de las enfermedades de las plantas podemos incluir a

ciertas sustancias producidas naturalmente por algunas plantas superiores tales como la aliína a la cual debe el ajo su acción antibiótica. Lúpulo, que contiene las cetonas humuleno y lupuleno; en el *Anemone pulsatilla* y en muchas otras ranunculáceas, está la lactona protoanemonina. Diversos compuestos sulfurados se han encontrado en las Crucíferas (Jauch, 1985; Trease, 1987).

Existen también diversas plantas que son utilizadas como insecticidas debido a las sustancias químicas que presentan, dentro de estas, se encuentran: el tabaco (*Nicotiana tabacum*), del cual sus hojas secas y molidas son utilizadas como insecticidas y debe esta propiedad al alcaloide nicotina, las flores de piretro que son los capítulos de *Chrysanthemum cinerariaefolium*, las cuales deben su capacidad insecticida a la presencia de dos sustancias la piretrina y la cinerina (Tyler, 1979).

Otro tipo de compuestos orgánicos que se utilizan para el control de las enfermedades de las plantas son las quinonas, las cuales se encuentran en forma natural en muchas especies vegetales y se producen por la oxidación de los compuestos fenólicos de las mismas, muchas veces muestran propiedades antimicrobianas, por lo que se piensa que guardan alguna relación con la resistencia innata de las plantas ante las enfermedades (Agris, 1996).

## 1.2 Metabolitos secundarios de las plantas medicinales

### 1.2.1 ¿Que son los metabolitos secundarios?

Se llama metabolismo primario de las plantas, a los procesos químicos que intervienen en forma directa en su supervivencia, crecimiento y reproducción. Estos son la fotosíntesis, la respiración, el transporte de solutos, la translocación, la síntesis de proteínas, la asimilación de nutrimentos, la diferenciación de tejidos, y en general la formación de carbohidratos, lípidos y proteínas que intervienen en estos procesos o son parte estructural de las plantas.

Los metabolitos primarios son los compuestos químicos que intervienen en dichos procesos: los aminoácidos destinados a la formación de proteínas, los nucleótidos, los azúcares, los acilglicéridos. Debido a su carácter universal en el reino vegetal, los procesos que intervienen en el metabolismo primario y sus metabolitos, se encuentran en todas las plantas sin excepción.

En contraposición, los metabolitos secundarios de las plantas son compuestos químicos que cumplen funciones no esenciales, de forma que su ausencia no es fatal para la planta, ya que no intervienen en el metabolismo primario, es decir en su crecimiento y desarrollo (Kuklinski, 2000; Croteau *et al.*, 2000; Taiz *et al.*, 2006).

En general, las características de los metabolitos secundarios son:

- No tener funciones metabólicas directas aparentes
- Ser importantes para la supervivencia e interacción con el entorno
- Presentar diferente distribución en el reino vegetal
- No ser clasificados como secundarios basándose en su estructura, ruta biosintética o tipo de distribución (Lock, 1994).

La presencia y concentración de los metabolitos secundarios (principios activos de las drogas vegetales) están influidas por tres factores principales:

- Herencia: los efectos genéticos inducen cambios cuantitativos y cualitativos.
- Ontogenia: si bien puede preverse que la concentración de metabolitos secundarios irá en aumento a medida que la planta envejece, como suele suceder, en general no se aprecia que la identidad de estos constituyentes también varía según la etapa del desarrollo.
- Ambiente: entre los factores ambientales capaces de introducir variaciones en los constituyentes secundarios de las plantas figuran el suelo, clima, flora concomitante y métodos de cultivo (Tyler, 1979).

La biosíntesis de los metabolitos secundarios, parte del metabolismo primario de las plantas del que se desvía acorde con las vías generales que se muestran en la figura 1.

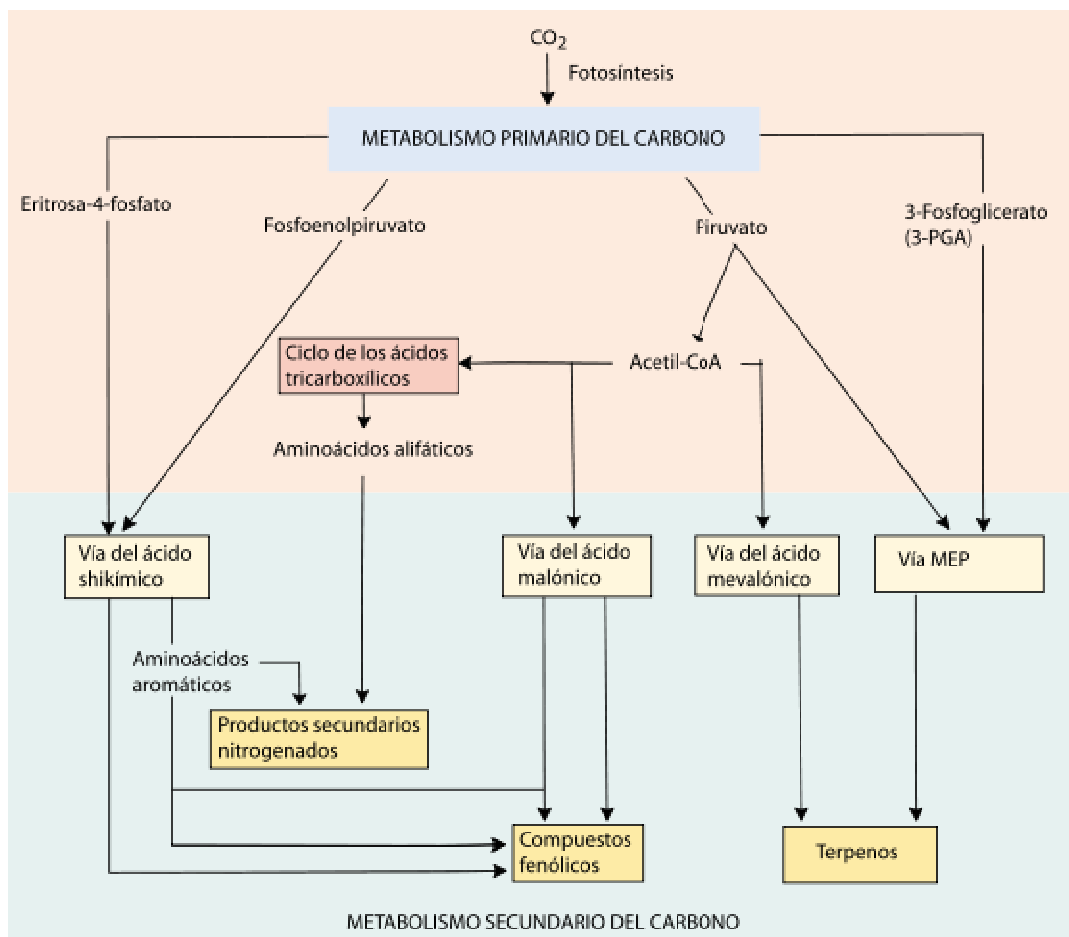


Figura 1. Vías generales del metabolismo secundario de las plantas y su relación con el metabolismo primario (tomado de Taiz, 2006).

Los metabolitos secundarios de las plantas pueden ser divididos en 3 grandes grupos, con base a sus orígenes biosintéticos.

**TERPENOIDES:** Todos los terpenoides, tanto los que participan del metabolismo primario como los más de 25,000 metabolitos secundarios, son derivados del compuesto IPP (Isopentenil difosfato o 5-carbono isopentenil difosfato) que se forman en la vía del ácido mevalónico. Es un grupo grande de metabolitos con actividad biológica importante. Están distribuidos ampliamente en las plantas y muchos de ellos tienen funciones fisiológicas primarias. La distribución de unos pocos de ellos en las plantas es más restringida, como los que forman los aceites esenciales, entre otros.

**COMPUESTOS FENÓLICOS (fenilpropanoides y derivados):** Los más de 8,000 compuestos fenólicos que se conocen están formados o bien por la vía del ácido shikímico o bien por la vía del malonato/acetato. Este grupo también juega una variedad muy heterogénea de roles en las plantas, muchos son productos de defensa contra herbívoros y patógenos, otros proveen soporte mecánico a la planta, otros atraen polinizadores o dispersores de frutos, algunos de ellos absorben la radiación ultravioleta, o actúan como agentes alelopáticos.

**ALCALOIDES (compuestos nitrogenados):** Los alrededor de 12,000 alcaloides que se conocen, que contienen uno o más átomos de nitrógeno, son biosintetizados principalmente a partir de aminoácidos. Los alcaloides poseen una gran diversidad de estructuras químicas. Son fisiológicamente activos en los animales, aún en bajas concentraciones, por lo que son muy usados en medicina (Kuklinski, 2000; Taiz *et al.*, 2006).

### **1.2.2 ¿Qué función tienen en las plantas?**

Los metabolitos secundarios son sustancias que la planta ha sintetizado y almacenado en el curso de su crecimiento. Este tipo de sustancias no se distribuyen

de manera uniforme por toda la planta, pues se concentran preferentemente en las flores, hojas o raíces, aunque en algunas ocasiones también se pueden encontrar contenidos en semillas, frutos y corteza (Tyler, 1979).

Cumplen importantes roles en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente, por ejemplo, defensa contra predadores y patógenos, agentes alelopáticos, atracción de polinizadores o dispersores de semillas, entre otros. Cada uno de ellos tiene una distribución restringida en el vegetal, a veces a sólo una especie o un grupo de ellas (Taiz *et al.*, 2006; Swain, 1973).

### **1.2.3 Metabolitos secundarios que presentan efecto antimicrobiano**

Diversos metabolitos secundarios derivados de las plantas han mostrado efecto antimicrobiano. Entre estos compuestos destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos (Cowan, 1999).

Por lo tanto los metabolitos secundarios también pueden ser clasificados según su actividad biológica, además de los terpenoides y los alcaloides encontramos:

**CUMARINAS Y LIGNANOS:** ambos son metabolitos secundarios que proceden de la ruta metabólica del ácido shikímico. Las cumarinas se hallan ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Hay sin embargo, determinadas familias que poseen gran cantidad de cumarinas como las Leguminosas, Rubiáceas, Rutáceas, Umbelíferas, Apocináceas y Compuestas. Los lignanos se hallan ampliamente distribuidos en los vegetales. Entre sus acciones farmacológicas destacan la actividad antimitótica, antimicótica, antivírica, antihepatotóxica, entre otras.

**FLAVONOIDES Y COMPUESTOS RELACIONADOS:** proceden de la ruta del ácido shikímico y la ruta de los policétidos. Se encuentran prácticamente en todas las plantas superiores, sobre todo, en partes aéreas: hojas, flores y frutos;

principalmente en las Rutáceas, Polygonáceas, Compuestas y Umbelíferas. Los isoflavonoides, furanocumarinas y estirenos han demostrado tener propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas.

TANINOS: las especies con taninos presentan características antisépticas y antifúngicas, entre otras.

QUINONAS Y DERIVADOS ANTRACÉNICOS: dentro de los grupos que presentan estructura quinónica cabe destacar las *Naftaquinonas* con una estructura derivada del naftaleno, lo cual les confiere propiedades antisépticas (tanto antibacteriano como antifúngico).

ISOPRENOIDES son metabolitos secundarios formados a través de la ruta de la condensación isoprénica (Kuklinski, 2000; Judd *et al.*, 2002).

Sus mecanismos de acción son variables; por ejemplo, la toxicidad de los fenoles en microorganismos se atribuye a la inhibición enzimática por oxidación de compuestos. El modo de acción de los terpenos y aceites esenciales no ha sido dilucidado por completo, pero se postula que pueden causar rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofílicos. De los alcaloides se ha postulado que se intercalan con el ADN, y de las lectinas y polipéptidos se conoce que pueden causar canales iónicos en la membrana microbiana o causar la inhibición competitiva por adhesión de proteínas microbianas a los polisacáridos receptores del hospedero (Hernández *et al.*, 2007).

Dichos compuestos les proporcionan importantes características a los extractos elaborados a partir de las plantas, lo que permite su utilización para proteger los cultivos e incrementar la calidad y producción, ya que tienen la propiedad de ser menos tóxicos y más fácilmente degradables (Rodríguez *et al.*, 2000).



## **1.3 Enfermedades de las plantas**

### **1.3.1 Concepto de enfermedad en las plantas**

Las plantas se mantienen sanas cuando llevan a cabo sus funciones fisiológicas hasta donde les permite su potencial genético. Estas funciones comprenden su división celular normal, su desarrollo, la absorción del agua y los minerales del suelo y su translocación por toda la planta, la fotosíntesis y la translocación de los productos fotosintéticos hasta los órganos de utilización o almacenamiento, el metabolismo de los compuestos sintetizados, la reproducción y el almacenamiento de las reservas alimenticias necesarias a la reproducción o a la hibernación (figura 2).

En el momento en el que la planta sufre una desviación marcada o permanente de una o varias de sus funciones por algún organismo patógeno o por determinadas condiciones del medio, la cual le produzca síntomas visibles o que actúe en detrimento de su calidad y valor económico, se considera que presenta una enfermedad (De la Isla, 1994).

Por lo tanto, en términos generales, la enfermedad en las plantas se define como el mal funcionamiento de las células y tejidos del hospedante debido al efecto continuo sobre estos de un organismo patógeno o factor ambiental y que origina la aparición de síntomas, los cuales conducen a la alteración parcial o muerte de la planta o de sus órganos (Agrios, 1996).

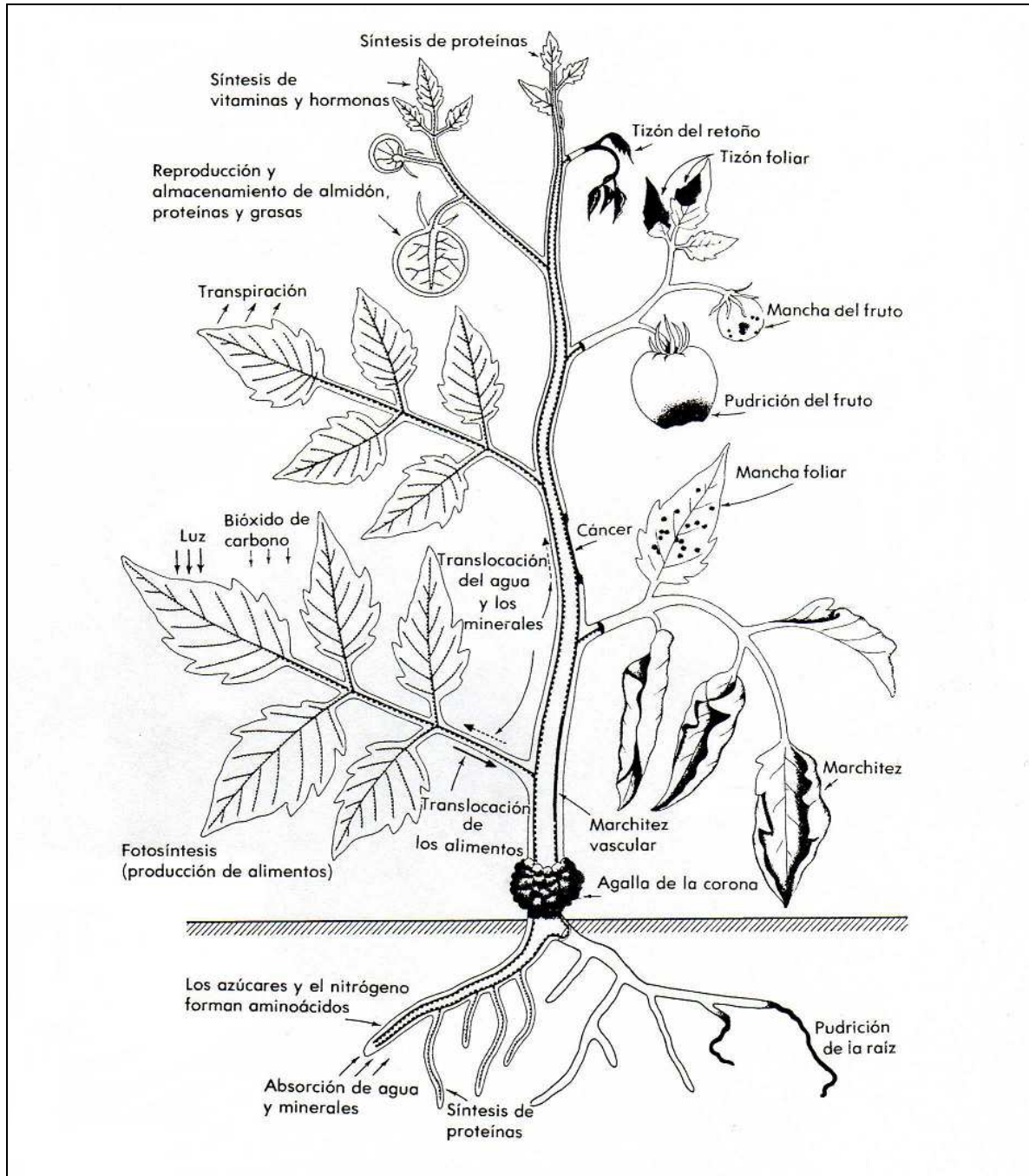


Figura 2. Funciones básicas de las plantas y la interferencia que sobre ellas ocasionan algunos tipos comunes de enfermedades (Tomado de Agrios, 1996)

### **1.3.2 Importancia de las enfermedades en las plantas**

Es evidente que el hombre de los tiempos prehistóricos tuvo oportunidad de observar algunas enfermedades de las plantas, ya que la presencia de hongos fitopatógenos se ha comprobado en fósiles vegetales. Sin embargo, se considera un paso decisivo en la importancia de los fitopatógenos el cambio ecológico resultante de las actividades humanas, al transformarse el hombre en agricultor (De la Isla, 1994).

Las enfermedades de las plantas afectan notablemente el desarrollo social y económico debido a que reducen el rendimiento y calidad de los productos vegetales, así como la producción de las industrias que dependen de las plantas para obtener materias primas. En la historia abundan las pruebas de sufrimiento humano a causa del tizón, la podredumbre, la roya y el marchitamiento de las plantas (Anónimo, 1988).

Para los millones de personas que habitan la Tierra y cuya existencia depende de los productos vegetales, las enfermedades de las plantas pueden marcar la diferencia entre una alimentación adecuada y una vida acosada por el hambre. Para los países donde el alimento es abundante, las enfermedades de las plantas tienen una gran importancia, debido a que provocan que los agricultores sufran pérdidas económicas, propician el aumento en el precio de los productos y destruyen la belleza del medio ambiente.

Así mismo, dichas enfermedades reducen la variedad de plantas que pueden desarrollarse en una determinada zona geográfica al destruir a todas las poblaciones de ciertas especies que son muy susceptibles a una enfermedad en particular. Pueden determinar también el tipo de industria agrícola y el nivel de desempleo de una zona determinada al influir sobre el tipo y la cantidad de productos disponibles para su procesamiento por las industrias de esa zona. Por otra parte, las enfermedades de las plantas son responsables también de la creación de nuevas industrias que producen productos químicos, maquinaria y desarrollan los métodos necesarios para controlarlas (Agrios, 1996).

En las comunidades naturales, las enfermedades son uno de los muchos factores que regulan las poblaciones y que por lo tanto, determinan la diversidad de especies que prosperan en algún hábitat. En particular, las enfermedades tienden a limitar la dispersión de las especies a regiones geográficas menos favorables. Las enfermedades también pueden acelerar o disminuir la sucesión dentro de las comunidades vegetales establecidas (Dickinson *et al.*, 1987).

Las consecuencias sociales y económicas del ataque de enfermedades de vegetales en México, se han traducido durante siglos en miseria de los campesinos, en cambio obligado de cultivos y en agricultura nómada (De la Isla, 1994).

#### 1.3.2.a Pérdidas económicas

Resulta difícil hacer estimaciones correctas de las pérdidas provocadas por las enfermedades de las plantas, y todas las cantidades calculadas deben presentarse con la posibilidad de un margen de error considerable, puesto que las variaciones en los niveles patológicos cambian de un lugar a otro y según la estación del año en la que se presentan (Evan, 1973).

Por otra parte, el tipo y monto de las pérdidas ocasionadas por las enfermedades de las plantas varía también, de acuerdo a la especie de planta o los productos que se obtienen de ella, así como el agente patógeno, la localidad, el medio ambiente y las medidas de control practicadas. El monto de las pérdidas varía desde porcentajes mínimos hasta pérdidas de un 100%. Las plantas o sus productos pueden disminuir cuantitativamente a causa de las enfermedades en el campo, como en el caso de la mayoría de los cultivos, o por las enfermedades que se producen durante el almacenamiento, como ocurre con las pudriciones de los frutos, hortalizas, semillas y fibras almacenadas (Agrios, 1996).

El agricultor puede sufrir pérdidas financieras derivadas de las enfermedades de las plantas al tener que producir variedades o especies vegetales resistentes a las enfermedades pero menos productivas y, al tener que asperjar o controlar de alguna

forma la enfermedad, lo cual origina gastos en compuestos químicos, maquinaria, trabajo y espacio para el almacenamiento de los productos (Agris, 1996).

Así, los efectos de orden económico de las enfermedades de las plantas se miden en términos de: el abatimiento cuantitativo y cualitativo de las cosechas, los costos de las medidas preventivas y curativas y las limitaciones de las áreas de cultivo (De la Isla, 1994).

#### 1.3.2.b En el control de las enfermedades

Algunas enfermedades de las plantas se pueden controlar casi por completo mediante cualquiera de los métodos existentes, lo cual reduce las pérdidas financieras solamente al monto del costo del método de control. Sin embargo, en algunas ocasiones este costo puede ser casi tan alto, como las ganancias que se espera obtener de las cosechas, o inclusive mayor. En lo referente a otras enfermedades que aún no tienen medidas de control efectivas, el levantamiento de la cosecha sólo ha sido posible mediante la combinación de varios sistemas de cultivo tradicionales y la utilización de variedades un tanto resistentes a la enfermedad (Agris, 1996).

### **1.3.3 Clasificación de las enfermedades en cuanto al daño**

Stakman y Harrar (1957) (citados por Evan, 1973 y De la Isla, 1994) sugirieron que las enfermedades de las plantas se agrupan en cuanto a su efecto sobre el cultivo en:

- Aniquiladoras: son las que destruyen rápida y completamente un cultivo en un área o que diezman las poblaciones de modo que sólo quedan unos cuantos supervivientes. Éstas ejercen una gran influencia en la economía mundial, debido a que causan tanto la pérdida del capital como de la cosecha.

- Limitante: son aquellas cuya presencia hace incosteable la producción de ciertos cultivos en un área determinada.
- Devastadoras: se conocen como aquellas que atacan de forma destructiva los cultivos anuales.
- Debilitantes: se consideran a aquellas que causan efectos negativos aunque los síntomas son a veces imperceptibles, y dependen fundamentalmente de las incidencias derivadas de las condiciones climatológicas específicas.

En tanto que las que afectan los productos vegetales en sí, aún cuando no ocasionan bajas sensibles de los rendimientos, pueden designarse como:

- Desfigurantes: siendo aquellas que cambian la apariencia de los productos vegetales y por lo tanto reducen su valor comercial.
- Inhabilitantes: éstas hacen que los productos vegetales sean inadecuados para el consumo de los animales y del hombre, al volverlos venenosos (De la Isla, 1994; Agrios, 1996).

#### **1.3.4 Factores que determinan la enfermedad**

La enfermedad es dinámica, usualmente progresiva y su desarrollo depende de la interacción de numerosos factores; puede permanecer relativamente benigna, o hacerse activa si algún elemento adicional desorganiza la coordinación de la utilización de energía o limita la reacción de la planta. A veces, algunos cambios en los factores secundarios aumentan la susceptibilidad del huésped o la velocidad de reproducción y la capacidad de invasión del patógeno. Así, muchas enfermedades de las plantas se deben a una combinación de factores, algunos bióticos, otros abióticos; y el medio ambiente particular determina el grado en que cada factor ejerce su influencia (Anónimo, 1988).

Las condiciones ambientales que predominan tanto en la atmósfera como en el suelo una vez establecido el contacto entre un patógeno y un hospedante, pueden

influir considerablemente en el desarrollo de una enfermedad y con mayor frecuencia constituyen el mayor factor que determina si se producirá o no esa enfermedad. Los factores del medio ambiente que afectan mayormente el inicio y desarrollo de las enfermedades infecciosas de las plantas son la temperatura, la humedad, la luz, los nutrimentos y el pH del suelo. Los efectos sobre las enfermedades son el resultado de su influencia sobre el desarrollo y la susceptibilidad del hospedante, sobre la propagación y actividad del patógeno o sobre la interacción entre ambos y de su efecto sobre el desarrollo de los síntomas de la enfermedad.

Por lo tanto, en términos generales, para que una enfermedad se produzca y desarrolle óptimamente, debe haber una combinación de tres factores: una planta susceptible, un patógeno infeccioso y un medio favorable. Por lo general, las enfermedades de las plantas aparecen durante una amplia variedad de condiciones ambientales. Sin embargo, su extensión y frecuencia de aparición, así como su impacto sobre las plantas individuales, se ven afectadas por el grado de desviación de cada condición del ambiente a partir del punto de desarrollo óptimo de la enfermedad (De la Isla, 1994; Agrios, 1996).

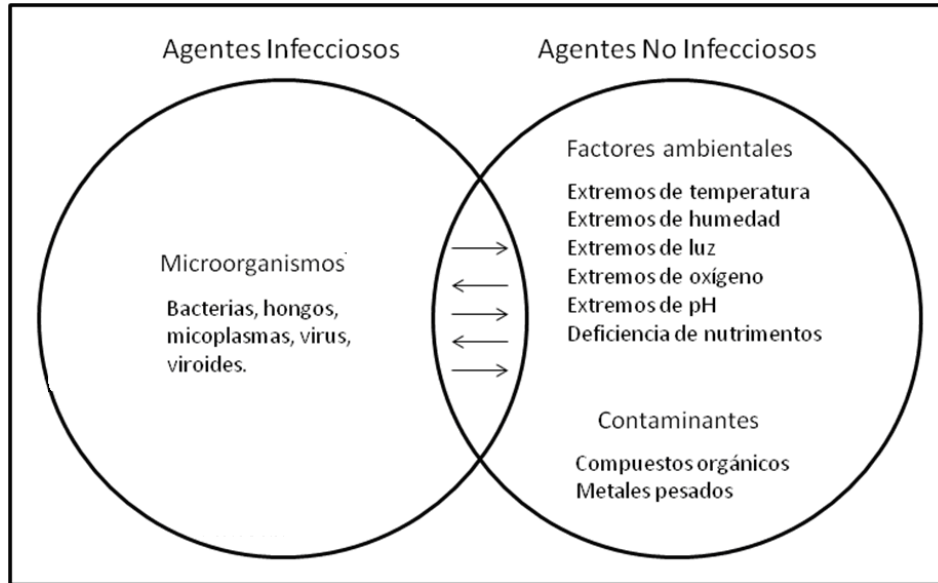
### **1.3.5 Agentes que causan enfermedades en las plantas**

Los agentes que originan enfermedades en las plantas, pueden ser divididos en dos grupos: a) los de naturaleza no infecciosa o abióticos y b) los de naturaleza infecciosa o biótico.

Los agentes no infecciosos o abióticos que ocasionan enfermedades en las plantas incluyen factores variados como temperaturas desfavorables para el desarrollo de la planta, exceso o deficiencia de humedad, exceso o deficiencia de nutrimentos, daños por radiación, entre otros (cuadro 1) (Dickinson *et al.*, 1987; De la Isla, 1994).

Por su parte, los patógenos infecciosos son de naturaleza variada e incluyen viroides, virus, bacterias, hongos, nemátodos e incluso algunos protozoarios (cuadro 1) (De la Isla, 1994).

Cuadro 1. Agentes responsables de las enfermedades en las plantas



(Dickinson *et al.*, 1987)



## **1.4 Características generales de bacterias y hongos fitopatógenos**

### **1.4.1 Diversidad, estructura y morfología de bacterias fitopatógenas**

Se conocen alrededor de 1,600 especies de bacterias patógenas y más de 80 son bacterias fitopatógenas, aunque se estiman alrededor de 200 incluidas los patovares (Agrios, 1996).

Cerca de una mitad de las bacterias patógenas de plantas pertenecen al género *Pseudomonas*, una tercera parte al género *Xanthomonas* y una octava parte al género *Erwinia*. Otros géneros como *Agrobacterium*, *Corynebacterium* (*Clavibacter*), *Streptomyces* y *Nocardia* se encuentran en menor proporción (Roberts *et al.*, 1978; De la Isla, 1994).

Las bacterias son microorganismos procariotas, unicelulares, de tamaño microscópico. En general, están constituidas por pared celular, membrana citoplasmática, citoplasma, ribosomas, y nucleóide. Dependiendo de la bacteria puede poseer flagelos, cápsula, esporas, glucocalix y fimbrias (Evan, 1973).

Las características específicas de las bacterias fitopatógenas son: la mayoría son saprofitas facultativas, la proliferación es por fisión binaria, producen enzimas extracelulares, todas tienen forma de bastones (bacilos), generalmente aislados o en cadena; la mayoría poseen flagelos, casi todas son móviles; todas son aerobias o anaerobias facultativas, y/o forman endosporas. Todas son Gram negativas con excepción del género *Clavibacter* (Roberts *et al.*, 1978; Jauch, 1985; Dickinson *et al.*, 1987; De la Isla, 1994; Agrios, 1996).

La mayoría de las bacterias fitopatógenas están rodeadas por una cápsula mucilaginosa, más o menos densa y de espesor variable, formada por polisacáridos; este material externo tiene importancia en la patogénesis y en la sobrevivencia de las bacterias (González, 1985).

### **1.4.2 Diversidad, estructura y morfología de hongos fitopatógenos**

Existen alrededor de 100,000 especies de hongos, de las cuales más de 8,000 producen enfermedades en las plantas (Agrios, 1996).

A diferencia de otros patógenos, los hongos presentan mayor variedad de formas, funciones y ciclos de vida (Anónimo, 1988).

Sin embargo, se puede decir de manera general que los hongos fitopatógenos son organismos microscópicos, eucariotas, ramificados y a menudo filamentosos que carecen de clorofila, tienen pared celular de quitina, celulosa o ambos, lo cual les permite tener un alto grado de interacción con el sustrato; en el caso de los hongos fitopatógenos eso tiene gran importancia, tanto para la absorción de nutrientes como para la secreción de enzimas y metabolitos. Su nivel de parasitismo fluctúa de saprofitismo facultativo a parasitismo obligado. Al soma se le denomina micelio, y a las bifurcaciones individuales o filamentos del micelio se les denomina hifas, las hifas secretan enzimas extracelulares que digieren moléculas complejas. Las estructuras reproductivas son comúnmente esporas bien definidas. En la mayoría de los hongos fitopatógenos por lo general, el micelio se extiende dentro de los tejidos del hospedante, y no es posible observarlo a simple vista (González, 1985; Dickinson *et al.*, 1987; De la Isla, 1994; Agrios, 1996).

## 1.5 Control de fitopatógenos

Las plantas, tanto en su ambiente natural como en ambientes de cultivo, necesitan defenderse de condiciones adversas y enemigos naturales. Sin embargo, los cultivos agrícolas han sido modificados por la domesticación de tal manera que se ha reducido su capacidad para producir sustancias de defensa. De esta manera, se ha generado una dependencia hacia sustancias externas que ofrecen protección contra animales, malezas y microorganismos fitopatógenos (FAO, 2004).

Gabriel y Cook (1990) (citados por Agrios, 1996) propusieron que, conceptualmente, los métodos de control de plagas y enfermedades debieran dividirse en sólo tres categorías: físicos, químicos y biológicos. Los métodos físicos incluirían las cuarentenas, solarización, entre otros. El control biológico incluiría la resistencia al hospedero, tanto natural como producto de la manipulación genética, entre otros. El control químico incluiría el uso de compuestos químicos tanto naturales como sintéticos, tanto orgánicos como inorgánicos.

Sin embargo, los métodos que más se utilizan para controlar las enfermedades de las plantas en el campo y en el invernadero y, a veces, en almacén, consisten en el uso de compuestos químicos que son tóxicos para los fitopatógenos. Dichos químicos inhiben la germinación, el crecimiento o la reproducción del patógeno, o bien son letales para él. Dependiendo del tipo de patógeno que afecten, los compuestos químicos se denominan como fungicidas, bactericidas, nematocidas, viricidas o, en el caso de plantas superiores parásitas, herbicidas. Algunos compuestos químicos son tóxicos para todos los tipos de patógenos o la mayoría de ellos, otros sólo afectan a un tipo de patógeno y, ciertos compuestos son tóxicos únicamente para un solo patógeno específico o algunos de ellos (Agrios, 1996).

El combate de este tipo de enfermedades es difícil y las estrategias utilizadas actualmente son poco efectivas. La rotación de los cultivos no es eficaz en la mayoría de los casos; el combate químico no es una técnica ni económicamente factible,

debido, principalmente, al riesgo de degradación de los productos en el suelo y a las altas dosis utilizadas, además, no es posible una adecuada cobertura de los sitios de infección, lo que provoca la presencia de residuos sobre las partes comestibles y contaminación ambiental. Hartman y Datnoff (1997) (citados por Granados, 2005) citan que los fungicidas frecuentemente tienen un costo elevado y proporcionan solamente control parcial de las enfermedades (Granados, 2005).

Las enfermedades causadas por bacterias y hongos son difíciles de controlar utilizando compuestos químicos, ya que éstos pueden provocar resistencia al agente causal, selección de microorganismos del suelo que tengan la capacidad de metabolizarlos, además las bacterias fitopatógenas producen abundantes cantidades de polisacáridos extracelulares, los cuales las protegen de algunos agentes químicos antibacteriales (Delgadillo *et al.*, 2002).

Otro de los problemas que presenta el uso de compuestos químicos sintéticos para la erradicación de hongos y bacterias patógenas es que en muchas ocasiones se llega a observar una disminución en el peso seco tanto de la raíz, del follaje, de los frutos o de los bulbos, lo que se atribuye al efecto negativo de los agroquímicos sobre las plantas tratadas. Por lo que, la eficacia de estos en el control de enfermedades está en función de la cantidad de agroquímico aplicado (Delgadillo *et al.*, 2002).

Por otro lado, dada la tendencia mundial a racionalizar el uso de agroquímicos por la problemática sanitaria (residuos en los productos) y medioambiental que conlleva su uso indiscriminado, las restricciones respecto a los fungicidas y bactericidas de síntesis son cada vez más estrictas (Meier *et al.*, 2006).

En este marco y debido, a la detección del desarrollo de resistencia de cepas de patógenos a algunos agroquímicos, así como a sus características, una alternativa de control biológico es el uso de extractos vegetales, que en algunas investigaciones revelan un efecto positivo sobre el control de hongos y bacterias fitopatógenas (Mendoza *et al.*, 2007).

El reconocimiento de las propiedades biológicas de muchos metabolitos secundarios presentes en los extractos vegetales se ha realizado ampliamente desde mediados del siglo XIX y ha conducido a la búsqueda de nuevos fármacos, antibióticos, insecticidas y herbicidas. Ejemplos de agroquímicos derivados de productos naturales son los piretroides sintéticos la azadiractina, la nicotina, la rotenona, la sabadilla y la ryanina (Levin, 1976; Judd *et al.*, 2002).

La agricultura del nuevo milenio debe establecer nuevas alternativas de control que produzcan un menor impacto ambiental. La utilización de extractos vegetales para el control de enfermedades representa una alternativa para el manejo integrado de los cultivos, debido a su bajo costo y al menor impacto sobre el ambiente y los alimentos (Guevara *et al.*, 2000).

## **1.6 Características particulares de los fitopatógenos utilizados en el estudio y métodos de control**

### **HONGOS**

#### ***Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary**

- Taxonomía

Subdivisión: Ascomycotina

Clase: Discomycetes

Orden: Helotiales

Género: *Sclerotinia*

Especie: *S. sclerotiorum*

- Hospedantes

Es uno de los hongos más inespecíficos; las plantas sensibles a este agente patógeno abarcan 64 familias, 225 géneros y 361 especies. Algunas de los cultivos más frecuentemente afectados son repollo, frijól, apio, cilantro, melón, calabaza, soya, tomate, lechuga, pepino y cítricos en general (Purdy, 1979).

- Síntomas

Este hongo, produce la pudrición blanda acuosa de las hortalizas. Aproximadamente 90% de su ciclo de vida se produce en el suelo como esclerocios. La infección empieza cuando los esclerocios, que son las estructuras de resistencia, germinan para producir un apotecio que alternadamente libera ascosporas, las cuales se diseminan con el viento. Los síntomas más comunes son la formación de manchas en los frutos, tallos, hojas. Estas manchas crecen y se cubren con un micelio algodonoso, cubriendo así la zona afectada. El micelio generalmente produce numerosos esclerocios negros, que son las estructuras de propagación y de resistencia (Purdy, 1979; Tu, 1997).

- Patogenicidad

En la línea del suelo, la infección puede desarrollarse a partir de los esclerocios o de las ascosporas. Mientras que las infecciones subterráneas se deben a la infección por el micelio producido por los esclerocios. Las ascosporas transportadas por medio del aire son la forma más importante para la diseminación de la enfermedad. El micelio puede también causar la infección, pero generalmente de este modo la enfermedad permanece sólo en un área (Purdy, 1979; Tu, 1997).

- Distribución

*S. sclerotiorum* geográficamente es cosmopolita y tiene una amplia distribución ecológica, aunque es más común en las regiones templadas (Tu, 1997).

- Métodos de control

El control de las enfermedades por *Sclerotinia sclerotiorum* depende de varias prácticas de cultivo, evitar la acumulación de humedad debajo y entre el follaje, dar un mayor espaciamiento entre plantas y evitar el contacto del follaje con el suelo (Steadman, 1979). Por su parte, el control químico en la mayoría de los casos está en función del hospedante, a este respecto se ha encontrado que el Benomyl presenta un buen control de la enfermedad en girasol, tomate, y haba; pero no en coliflor; por otra parte, el fungicida Roval (iprodione) y Ronilan (vinclozolin) proporcionan actualmente control eficaz de la enfermedad en lechuga, cacahuetes y otros. Sin embargo también se ha encontrado un efecto fitotóxico de estos sobre las plantas tratadas (Yarden *et al.*, 1986).

### ***Sclerotium cepivorum* Berk**

- Taxonomía

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Agonomycetes

Orden: Agonomycetales (Myceliales)

Género: *Sclerotium*

Especie: *S. cepivorum*

- Hospedantes

Es un patógeno específico del género *Allium*; entre las principales especies que son afectadas se encuentran la cebolla y el ajo; además, puede atacar el puerro, las cebollinas, el chalote, el ajo-porro y el ajo silvestre (Luna *et al.*, 2003; Granados, 2005).

- Síntomas

El hongo causa la pudrición de las raíces y las partes externas de los bulbos cercanas al suelo. En la planta, los primeros síntomas que se observan son un amarillamiento apical que, con el tiempo, se distribuye en toda el área de las hojas en forma descendente, hasta causar necrosis y muerte del tejido, ocasionando la caída de las hojas inferiores. En los bulbos se puede apreciar la formación de un micelio blanquecino y una vez que este madura, se observan los esclerocios esféricos, de color negro y sumamente pequeños. Esta enfermedad puede afectar plantas en cualquier estado de desarrollo y se incrementa conforme se desarrolla el sistema radical (Moreno *et al.*, 2002; Luna *et al.*, 2003; Granados, 2005).

- Patogenicidad

El inóculo primario de *S. cepivorum* está constituido por los esclerocios, los cuales pueden sobrevivir por más de 20 años en el suelo aún en ausencia de la planta huésped y pueden diseminarse de un campo a otro por equipo contaminado, por el uso de semillas contaminadas con el patógeno, los esclerocios son diseminados por vientos fuertes, inundaciones e irrigación. Su germinación es estimulada a bajas temperaturas, tornándose óptima entre los 14-18 °C (Luna *et al.*, 2003; Granados, 2005).

La germinación de los esclerocios es estimulada únicamente por exudados de las raíces de las especies del género *Allium*. Una vez que los esclerocios han germinado, penetran en las raíces por medio de un apresorio, creciendo intra e intercelularmente entre las células parenquimáticas, el tejido cortical se desintegra y luego el tejido vascular es invadido y macerado. El micelio se propaga planta a



planta por el contacto de las raíces infectadas con las sanas, si se encuentran a una distancia de 1 a 2 cm (Granados, 2005).

- Distribución

Las enfermedades por *Sclerotium cepivorum* se presentan principalmente en regiones con climas cálidos.

- Métodos de control

Hasta la fecha el control de *S. cepivorum* ha sido difícil, los intentos de combate empleando métodos químicos no han resultado del todo satisfactorios y tienen un elevado costo económico y ecológico. Aunque depende en parte de la rotación de los cultivos (Granados *et al.*, 2005).

La forma más común de control es mediante la aplicación de fungicidas, tales como los de los grupos dicarboximide (procymidone), triazoles (tebuconazole), y pirimidinas (fluazinam) han mostrado buenos resultados en el control de la pudrición blanda. En México no se ha logrado consistencia en el control de *S. cepivorum* mediante la aplicación de fungicidas, y una de las causas importantes es la alta cantidad de esclerocios presentes en el suelo (Delgadillo *et al.*, 2002).

### ***Penicillium spp.***

- Taxonomía

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Hyphomycetes

Orden: Hypales (Moniliales)

Género: *Penicillium*

- Hospedantes

Son las más comunes y a menudo las más destructivas de todas las enfermedades de postcosecha, ya que afectan a todo tipo de cítricos, manzanas,

peras, membrillos, uvas, cebollas, melones y muchos otros frutos y hortalizas. Con frecuencia los mohos azules y verdes son responsables de más del 90% de la descomposición de los frutos durante su transporte, almacenamiento y en el mercado. La mayoría son saprófitos, pero algunas especies causan pudriciones en órganos vegetales carnosos (González, 1985; Agrios, 1996; Ramírez *et al.*, 2007).

- Síntomas

Las distintas especies de este género causan las pudriciones por los mohos azules y los mohos verdes. Las pudriciones causadas por *Penicillium* al principio tienen el aspecto de manchas blandas, aguanosas, ligeramente decoloradas y de tamaño variable, las cuales pueden aparecer en cualquier parte del fruto. Estas manchas son superficiales al principio, pero se hunden con rapidez y, a la temperatura ambiente, gran parte del fruto o todo el fruto se descompone en tan sólo unos cuantos días. Poco después de que se desarrolle la pudrición, un moho blanco comienza a crecer sobre la superficie de la cáscara o corteza del fruto. Posteriormente, el hongo prosigue su desarrollo y produce esporas. El área esporulante tiene un color azul, verde azulado o verde olivo (Smith, 1992).

- Patogenicidad

*Penicillium* penetra en los tejidos de su hospedante a través de aberturas en la cáscara o corteza e incluso a través de lenticelas. Puede propagarse también, desde los frutos infectados hasta los sanos cuando la cáscara intacta de estos últimos entra en contacto con la cáscara infectada de los primeros y es más recurrente cuando existen heridas (Agrios, 1996; Donoso *et al.*, 2006).

- Distribución

*Penicillium* es común en todas las áreas, es un hongo cosmopolita asociado a materia orgánica en contacto con el suelo (Smith, 1992; Donoso *et al.*, 2006).

## **BACTERIAS**

### ***Pseudomonas marginalis* (Brown) Stevens**

- Taxonomía

Orden: Pseudomonadales

Familia: Pseudomonadaceae

Género: *Pseudomonas*

Especie: *P. marginalis*

#### -Morfología

Son bacilos cortos, Gram-negativos, no producen cápsulas, son aerobios, presentan flagelación polar con flagelos monotricos, estrictamente aerobios, reducen nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), producen pigmentos solubles y difusibles en el medio (pigmentos verdes y azules en medio King) no degradan almidón, son resistentes a los antibióticos (Jauch, 1985; González, 1985; De la Isla, 1994; Agrios, 1996).

- Hospedantes

Es comúnmente la causa de podredumbres bacterianas blandas de tejidos de reserva y tejidos blandos de hojas y tallos, especialmente en productos horticolas. Produce el ojo rosado de la papa y las pudriciones blandas de otras hortalizas suculentas; siendo sus principales hospederos: el apio, coliflor, azafrán, clavel, girasol, lechuga, tomate, tabaco, frijol, durazno, papa, entre otros (Smith, 1992; Agrios, 1996).

- Síntomas

En tubérculos, bulbos, raíces tuberosas y tallos blandos se presentan lesiones blandas, hidrópicas, a veces con un cambio de coloración a verde oscuro, castaño claro u oscuro. En las hojas se forman lesiones grandes, normalmente de color oscuro, que se extienden a partir de lesiones iniciales pequeñas en los márgenes o en los espacios intervenales. En algunos huéspedes se desarrollan con frecuencia

márgenes cloróticas estrechas en torno a las lesiones con escurrimientos gomosos (Smith, 1992; García, 1994; Mansilla *et al.*, 1999).

- Patogenicidad

Se encuentra normalmente en la superficie de las plantas, en la rizosfera y en suelos agrícolas. La infección a menudo tiene lugar a través de heridas, sin embargo, cuando existe suficiente humedad sobre la superficie de las plantas, es posible también que penetre por aberturas naturales tales como estomas, lenticelas e hidátodos (Smith, 1992).

- Distribución

Esta bacteria patógena es ubicua, aunque es más frecuente en climas templados que en tropicales (Smith, 1992).

- Métodos de control

Para el control de las enfermedades provocadas por *P. marginalis* se recomienda la rotación de cultivos, no emplear los bulbos contaminados en nuevas plantaciones y desinfectar los bulbos sanos con Captan o Arasan-75, en almacén es recomendable evitar al máximo la humedad sobre la superficie de los productos (Smith, 1992; García, 1994).

### ***Erwinia carotovora* (Jones) Bergey**

- Taxonomía

Orden: Eubacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Erwinia*

Especie: *E. carotovora*

- Morfología

Son bacilos cortos, Gram-negativos, móviles por flagelos peritricos, anaerobios facultativos, produce enzimas pectolíticas. Las colonias en agar nutriente son de

color blanco, tienen un crecimiento lento. No hidrolizan caseína, gelatina ni almidón; no reducen nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) ni indol, producen ácidos y gas a partir de glucosa (Jauch, 1985; González, 1985; De la Isla, 1994; Kunstmann *et al.*, 2006).

- Hospedantes

Afecta a un gran número de cultivos de hortalizas y ornamentales atacando principalmente los tejidos blandos. Provoca la pudrición suave del ajo, apio, camote, cebolla, zanahoria, entre otras (Smith, 1992; García, 1994, Hernández *et al.*, 2004).

- Síntomas

Frecuentemente, los bulbos o raíces afectadas despiden mal olor y sus tejidos internos se encuentran desintegrados, apreciándose una masa interna amarillenta. Las altas temperaturas aceleran su multiplicación en los espacios intercelulares. La bacteria es incapaz de penetrar las células vivas, pero produce sustancias que terminan matándolas y desintegrándolas (Roberts *et al.*, 1978; García, 1994; Kunstmann *et al.*, 2006).

- Patogenicidad

Se encuentra en restos vegetales en el suelo o en la rizosfera de malezas no hospedantes. Requiere humedades superiores al 90% para infectar, progresar y continuar con éxito la producción de una enfermedad. Las *Erwinias* pectolíticas que atacan los tubérculos y tallos de las plantas no son patógenos agresivos, ya que solo causan infección cuando existen factores predisponentes (Agrios, 1996; García, 2000).

La bacteria penetra en las raíces o bulbos a través de heridas ocasionadas por insectos o por la labranza, o por heridas causadas por el manejo de los productos, o en el almacenamiento y tránsito; a veces en suelos muy húmedos puede penetrar a través de las lenticelas. Son diseminadas por insectos, herramientas, manos, lluvia y agua de riego (Jauch, 1985; Smith, 1992; García, 2000).

- Distribución

*E. carotovora* está distribuida en zonas tropicales y templadas. La enfermedad es más frecuente en lugares oscuros (Smith, 1992; García, 2000).

- Métodos de control

Para el control es recomendable evitar heridas, evitar excesos de humedad en el suelo y partes aéreas de la planta. Puede ser eficiente la aplicación de bactericidas sistémicos al suelo, cuello de la raíz y partes aéreas, periódicamente (García, 2000). También se puede recomendar el tratamiento de rizomas y tubérculos, con Thiram o Captan (García, 1994).

## 1.7 Características de *Tagetes lucida* Cav.

### 1.7.1 Clasificación taxonómica

El género *Tagetes* pertenece a la familia Asteraceae (cuadro 2) tiene amplia distribución en el continente americano y está constituido por aproximadamente 53 especies de las cuales cerca del 40% estas representadas en México, cuenta con muy pocas especies con interés económico, siendo que su potencial de uso es amplio por las propiedades químicas del taxa (Serrato, 2003; Cicció, 2005). Dentro de las características distintivas de este género está la presencia de sustancias aromáticas, tales sustancias están relacionadas con la presencia de aceites esenciales (Serrato *et al.*, 2003).

*Tagetes lucida* Cav. es conocida en México como Pericón, Anisillo, Flor de Santa María, Hierbanís, Periquillo y Curucumin (Linares, 1996; Céspedes *et al.*, 2006).

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Tagetes lucida* Cav.

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta (plantas vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (plantas con semillas)
División	Magnoliophyta (plantas con flor)
Clase	Magnoliopsida (dicotiledóneas)
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Tagetes</i>
Especie	<i>T. lucida</i>

CONABIO, 2005

### 1.7.2 Descripción botánica

Planta herbácea perenne, erecta, hasta de 80 cm de altura, tallos generalmente varios o muchos partiendo de la base, más o menos ramificados, glabros; hojas simples, sésiles, lineares a oblongas, elípticas u oblanceoladas, de 2 a 10 cm de largo, de 0.5 a 2 cm de ancho, agudas a redondeadas en el ápice, márgenes aserrados; capítulos en corimbos, sobre pedúnculos bracteados hasta de 1 cm de largo; involucre cilíndrico, de 4 a 12 mm de alto, brácteas 5 a 7, con los ápices subulados; flores liguladas 3 o 4, amarillas, láminas flabeladas o suborbiculares, de 3 a 6 mm de largo; flores del disco 5 a 8, corolas amarillas, de 4 a 6 mm de largo (figura 3) (Rzedowski *et al.*, 2001).



Figura 3. Planta de *Tagetes lucida* Cav.

### 1.7.3 Distribución geográfica y ecología

Originaria de Mesoamérica, *Tagetes lucida* Cav. se distribuye en México desde Sonora, Chihuahua y Nuevo León hasta Honduras (figura 4) (Orellana, 2002).





Figura 4. Distribución de *Tagetes lucida* Cav.

Se desarrolla en bosques de encino, bosques de pino-encino y pastizales donde es común encontrarla en claros ocasionados por disturbios antropogénicos; predomina en climas templados a fríos, en altitudes de 1000 a 2700 m con temperaturas de 15 a 20 °C y 1000 a 1500 mm de lluvia anual. (Rzedowski, *et al.*, 2001; Orellana, 2002; Ciccío, 2005). En condiciones naturales se encuentra en suelos arcillosos y bien drenados, pero bajo cultivo responde mejor en suelos francos con suficiente materia orgánica (Martínez, 1994; Orellana, 2002; Garduño, 2007).

#### 1.7.4 Usos de *T. lucida* Cav.

##### 1.7.4.a Uso en la medicina popular

Las partes usadas principalmente son los capítulos y las hojas. En México, es utilizada en infusión vía oral principalmente para el tratamiento de diarreas, disentería, flatulencias, parásitos intestinales, cólicos, y otros malestares gastrointestinales; también es empleada contra la tos, dolor de cabeza, fiebre, y cuando las mujeres dan a luz (Martínez, 1967; Olivas, 1999; Ciccío, 2005; Céspedes

*et al.*, 2006); puede usarse incluso como cataplasma sobre el lugar afectado por piquetes de alacrán (Linares, 1996).

Se le atribuyen propiedades antiespasmódicas, antisépticas, antibacterianas, antidiarréicas, antiinflamatorias, antioxidantes, carminativas, digestivas, diuréticas, febrífugas, aromáticas y contra tumores (Orellana, 2002; De la Cruz, 2005).

#### 1.7.4.b Otros usos

En México se fomenta su crecimiento en huertos familiares y en los campos de cultivo; las partes aéreas de la planta también son utilizadas para condimentar alimentos, principalmente elotes y chayotes, bebidas y licores. Quemada sirve para ahuyentar a los mosquitos, se utiliza en ceremonias religiosas (Fiesta de San Miguel Arcángel) y se cultiva para su uso como planta ornamental (Linares, 1996; Olivas, 1999).

En Estados Unidos, Francia e Inglaterra se cultiva para uso ornamental y en los estados del sur de Estados Unidos y Costa Rica la planta se utiliza como especia en la comida (Ciccio, 2005; De la Cruz, 2005).

#### **1.7.5 Composición química**

Contiene grasas, resinas ácidas, esencias, clorofila, caucho, ácido gálico, taninos, glucosa, dextrina, materias pécticas y sales minerales (Martínez, 1967).

Existen diversos trabajos, en los cuales se ha estudiado la composición del extracto de *Tagetes lucida*, así como de los metabolitos secundarios aislados e identificados a partir de éste; dentro de estos se encuentran trabajos realizados en México, Costa Rica, India, Estados Unidos y Francia.

Químicos franceses en 1938 identificaron al fenilpropanol (metilchavicol) como el mayor constituyente presente en el aceite esencial de *Tagetes lucida*. Guzmán y Manjarrez en 1962, determinaron al metileugenol como el mayor constituyente (80%) y al metilchavicol (12%). A partir del extracto metanólico de la planta entera colectada en México, Rios y Flores (1976), aislaron 4 coumarinas (Ciccío, 2005).

En 1997, Bicchi y colaboradores, identificaron 53 componentes presentes en el aceite esencial de pericón, encontrando que los mayores constituyentes fueron anetol (23.8%), metileugenol (24.3%) y estragol (33.9%) (Bicchi *et al.*, 1997).

Cuatro glicosidos precursores de flavonoides fueron identificados en el extracto de tallos y hojas de plantas colectadas en Argentina (Abdala, 1999). Posteriormente, Aquino y colaboradores en 2002 (citado por Ciccío, 2005), aislaron un nuevo glicosido precursor de flavonoides y dos ácidos fenólicos de las hojas de plantas colectadas en Guatemala.

Ciccío en 2005, identificó 30 compuestos presentes en el extracto de plantas de *Tagetes lucida* colectadas en Costa Rica, donde el aceite esencial metil chavicol es el mayor constituyente con un 95-97% (Ciccío, 2005).

El estudio más reciente sobre la composición fitoquímica de *Tagetes lucida*, la reporta Céspedes y colaboradores en 2006, quienes aislaron e identificaron 7 cumarinas y 3 flavonoides presentes en los extractos metanólico y clorofórmico de las partes aéreas de *T. lucida* colectadas en Michoacán, México (Céspedes *et al.*, 2006).

Estudios recientes afirman que los flavonoides y cumarinas aislados de algunas especies del género *Tagetes* tienen diferentes actividades biológicas como antiinflamatorios, antioxidantes, antivirales, antiagregantes plaquetarios y nematocidas. En algunos casos, se reporta que las cumarinas son responsables de toxicidad en mamíferos, insectos, hongos y bacterias (Céspedes *et al.*, 2006).

De manera general, diversos estudios han demostrado que las hojas y flores de las plantas de Pericón contienen: aceite esencial (limoneno 16.5%,  $\beta$ -ocimeno 14%,  $\beta$ -cariofileno 28%, mirceno 4-5%, anetol, alilanol, estragol, éter metílico de eugenol, tagetona) alcaloides cuaternarios, flavonoides (quercetagetina, patuletina), saponinas, taninos, leucoantocianinas, ácido gálico, glucósidos cianogénicos, cumarinas (herniarina, dimetil alileter de 7 hidroxycumarina, 6,7,8-trimetoxicumarina) y pectina (De la Cruz, 2005).

### **1.7.6 Estudios previos sobre el efecto antimicrobiano de los extractos de *T. lucida***

En la literatura especializada son escasos los trabajos que se refieren al efecto antimicrobiano de *Tagetes lucida* sobre patógenos de plantas; sin embargo, se ha encontrado un importante efecto antimicrobiano sobre bacterias y hongos patógenos del hombre.

Céspedes y colaboradores en 2006 probaron los extractos metanólico y clorofórmico de *Tagetes lucida*, así como los flavonoides y cumarinas aislados a partir éstos extractos, y reportaron su efecto sobre bacterias patógenas del hombre tales como *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* sp., *Vibrio cholerae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Salmonella typhi*, *Shigella boydii*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*. Así como sobre los hongos *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium sporotrichum*, *Rhizoctonia solani*, *Trichophyton mentagrophytes* (Céspedes *et al.*, 2006).

Por su parte, Hernández y colaboradores en el mismo año, reportan el efecto antimicrobiano del extracto de acetato de etilo de pericón sobre las bacterias *Shigella boydii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Sarcina lutea*; identificando a la 5,7,4'-trimethoxyflavona como el compuesto que confiere el efecto antibacteriano (Hernández *et al.*, 2006).

Finalmente, Garduño en 2007 probó el extracto etanólico de pericón, igualmente sobre bacterias patógenas del hombre, reportando que el extracto presentó efecto antimicrobiano sobre las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium xerosis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus*  $\beta$ - hemolítico, *Enterococcus faecalis*, *Micobacterium phlei* y *Escherichia coli*. Y sobre los hongos *Candida albicans*, *Candida stellatoidea*, *Geotrichum* sp., *Candida krusei*, *Candida tropicales* y *Criptococcus neoformans* (Garduño, 2007).

En la literatura se han reportado algunos de los principios activos que son responsables de las diferentes actividades terapéuticas de *T. lucida*, tales como la 5,7,4'-trimethoxyflavona la cual le confiere efecto antimicrobiano,  $\alpha$ - tertienilo que presenta actividad antimicrobiana y, herniarina (7-metoxicumarina) la cual presenta actividad antibacteriana, espasmolítica, diurética y antiinflamatoria (De la Cruz, 2005; Hernández *et al.*, 2006).

## CAPITULO II

### HIPÓTESIS

Se conoce que *Tagetes lucida* Cav. presenta efecto antimicrobiano sobre diversos hongos y bacterias patógenos del hombre, por lo que se propone tenga el mismo efecto sobre hongos y bacterias patógenos de plantas, tales como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotinia* sp. y *Penicillium* sp. (hongos) y *Pseudomonas marginalis* y *Erwinia carotovora* (bacterias).

### OBJETIVOS

#### Objetivo general

- Evaluar la actividad antimicrobiana de *Tagetes lucida* Cav. sobre diversas cepas de hongos y bacterias fitopatógenos.

#### Objetivos específicos

- Obtener el extracto etanólico de *Tagetes lucida* Cav. y determinar el rendimiento del extracto en peso seco
- Probar las concentraciones de 30, 60, 90, 120 y 180 mgmL<sup>-1</sup> del extracto de *Tagetes lucida* sobre cepas de los hongos: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotinia* sp. y *Penicillium* sp.; y cepas de las bacterias: *Pseudomonas marginalis* y *Erwinia carotovora*
- Determinar la dosis mínima inhibitoria del extracto en cepas de los hongos: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotinia* sp. y *Penicillium* sp.; y cepas de las bacterias: *Pseudomonas marginalis* y *Erwinia carotovora*

## CAPITULO III

### MATERIAL Y MÉTODO

#### **3.1 Obtención del extracto**

##### **3.1.1 Obtención de material biológico**

Las plantas silvestres de *Tagetes lucida* (Pericón) fueron colectadas en el municipio de Tetela del Volcán, Estado de Morelos, ubicado a 2099 m de altitud, en el mes de septiembre del 2006 y durante las primeras horas del día.

##### **3.1.2 Preparación del material vegetal**

Las partes aéreas de las plantas se secaron a la sombra, a temperatura ambiente y sobre una superficie limpia; una vez secas se pesaron para obtener el peso total de la muestra y, se cortaron en trozos pequeños con el fin de obtener una mayor superficie de contacto con el disolvente. Hecho esto, se dejó reposar en una solución de hipoclorito de sodio al 10% por 5 minutos para realizar una desinfestación y se enjuagó abundantemente al chorro de agua, con un último lavado con agua destilada estéril. Finalmente el material se extendió sobre una superficie limpia y se dejó secar a la sombra a temperatura ambiente de 3 a 5 días dentro de una campana estéril (Alfaro *et al.*, 2000).

##### **3.1.3 Obtención del extracto etanólico**

El extracto se obtuvo por medio de una maceración alcohólica (Método Galénico) utilizando como agente extractante alcohol etílico. Para lo cual, 484g de material vegetal desinfestado y seco se colocaron en frascos color ámbar de boca ancha y se le agregó un total de 3,650 mL de alcohol etílico del 96°, cubriendo por completo el

material vegetal. Las muestras se taparon perfectamente, para evitar al máximo la evaporación del etanol, y mantuvieron a temperatura ambiente y protegidas de la luz, agitándose cada tercer día durante 15 días. La tintura obtenida se filtró sobre papel Whatman No.42 estéril y se midió el volumen final obtenido, almacenándola en frascos color ámbar y protegida de la luz (Kuklinski, 2000; Maldonado *et al.* 2004).

La filtración de la tintura se llevó a cabo bajo campana estéril y el material utilizado para la filtración y medición del volumen de la tintura fue esterilizado a 120 lb/plg<sup>2</sup> durante 20 minutos.

### **3.1.4 Concentración del extracto y obtención del peso seco**

El extracto fue concentrado mediante una destilación *in vacuo* de la tintura vegetal previamente obtenida, para ello se utilizó un equipo rota-vapor marca Büchi, con baño maría a una temperatura de 60 °C y una presión de vacío de 10<sup>-4</sup> bar (Miranda, 2000).

El extracto obtenido se conservó en cajas Petri estériles previamente pesadas. Después de haber obtenido todo el extracto, se pesaron las cajas Petri para conocer el peso seco y se calculó el rendimiento dividiendo la masa del extracto en peso seco entre la masa en peso seco de la planta.

## **3.2 Pruebas de sensibilidad antimicrobianas**

### **3.2.1 Obtención de las cepas**

Las cepas tanto de hongos como de bacterias fitopatógenas utilizadas en el diseño experimental fueron donadas por el Dr. Ronald Ferrera-Cerrato Coordinador del Laboratorio de Microbiología, Edafología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, y son las que se muestran en el cuadro 3.



Cuadro 3. Cepas de fitopatógenos utilizados para las pruebas microbiológicas

	<b>Clave de cepas</b>	<b>Clasificación Taxonómica</b>	<b>Planta hospedera</b>	<b>Lugar de Procedencia</b>
<b>H O N G O S</b>	SP	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Lechuga	Salamanca, Gto.
	SS	<i>Sclerotinia</i> sp.	Lechuga	San Miguel de Allende, Gto.
	Sc-As	<i>Sclerotium cepivorum</i>	Ajo	Salamanca, Gto.
	JUG06-MP14(2)	<i>Penicillium</i> sp.	Ajo	Salamanca, Gto.
	JUG06-MP14(3)	<i>Penicillium</i> sp.	Ajo	Salamanca, Gto.
<b>B A C T E R I A S</b>	1H	<i>Pseudomonas marginalis</i>	Ajo	León, Gto.
	Ls-1	<i>Pseudomonas marginalis</i>	Lechuga	Salamanca, Gto.
	Ls-MM4	<i>Pseudomonas marginalis</i>	Lechuga	Salamanca, Gto.
	4P	<i>Erwinia carotovora</i>	Ajo	León, Gto.
	Ls-N6SS5	<i>Erwinia carotovora</i>	Lechuga	Salamanca, Gto.

### 3.2.2 Preparación de las concentraciones

Se preparó una serie de cinco diluciones con el extracto en peso seco de Pericón, la dilución se hizo con alcohol etílico en las concentraciones de 30, 60, 90, 120 y 180 mgmL<sup>-1</sup>. Las diluciones se prepararon dentro de una campana para conservar las condiciones de asepsia.

Una vez preparadas, se colocaron en frascos ámbar y se taparon perfectamente para evitar la evaporación del etanol, se mantuvieron a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

### 3.2.3 Impregnación de sensidiscos

Se elaboraron sensidiscos de papel Whatman No. 41 con un diámetro de 6 mm, los cuales fueron esterilizados en autoclave a 120 lb/plg<sup>2</sup> durante 20 minutos. Posteriormente se impregnaron con cada una de las cinco concentraciones preparadas, además, se utilizó como testigo uno impregnado con etanol; estos se dejaron secar por 24 horas antes de utilizarse según lo recomendado por Koneman *et al.*, (1999).

### 3.2.4 Estandarización del inóculo microbiológico

La estandarización del inóculo microbiológico se llevó a cabo mediante el método de Kirby-Bauer y la escala turbidimétrica de McFarland. Para lo cual, primero se preparó el tubo No. 1 acuerdo al Cuadro 4, el cual fue utilizado como estándar.

Cuadro 4. Escala de McFarland para la estandarización del inóculo microbiológico

No. De tubo	BaCl <sub>2</sub> 1.0% mL	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1.0% mL	No. aprox. UFC representadas 10 <sup>6</sup> mL <sup>-1</sup>
<b>1</b>	<b>0.1</b>	<b>9.9</b>	<b>300</b>
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1,200
5	0.5	9.5	1,500
6	0.6	9.4	1,800
7	0.7	9.3	2,100
8	0.8	9.2	2,400
9	0.9	9.1	2,700
10	1.0	9.0	3,000

Koneman *et al.*, 1997

Una vez preparado, se estandarizaron los inóculos de cada microorganismo. A partir de un cultivo fresco y con la ayuda de un asa bacteriológica se tomaron de 3 a 4 colonias de las bacterias y hongos, según el caso, y se resuspendieron en un tubo de ensaye con 1 mL de solución fisiológica estéril (NaCl al 0.1%) y, se ajustó la

suspensión por comparación visual hasta llegar a la misma turbidez del estándar (tubo No. 1 de la escala de McFarland) (Koneman *et al.*, 1999; Celeste *et al.*, 2008).

### **3.2.5 Siembra del inóculo**

La siembra del inóculo se realizó según la Técnica de Barry, para ello, primeramente se preparó el medio de cultivo, que para bacterias fue Agar Mueller-Hinton y para hongos Agar Dextrosa Sabouraud. El medio de cultivo preparado se esterilizó en autoclave por 20 minutos, una vez esterilizado se vertieron aproximadamente 15 mL en cajas Petri estériles, se dejó enfriar un poco el medio para evitar dañar al inóculo y posteriormente se inoculó con cada uno de los microorganismos estandarizados anteriormente (1 mL). Se mezcló perfectamente el inóculo con el medio hasta homogeneizar la mezcla y se dejó solidificar perfectamente (González, 1997; Jiménez, 1999).

### **3.2.6 Preparación de antibiogramas**

La determinación de la sensibilidad de los fitopatógenos ante el extracto de *Tagetes lucida* se realizó por el Método de Difusión en Agar. Para ello se colocaron en las cajas Petri con el medio de cultivo inoculado 5 sensidiscos impregnados con cada una de las concentraciones del extracto (30, 60, 90, 120 y 180 mgmL<sup>-1</sup>.), así como un sensidisco testigo (impregnado con etanol). Los discos se coloraron sobre la superficie del agar con unas pinzas estériles aplicando una ligera presión sobre el sensidisco para asegurar el contacto completo con la superficie del agar.

La distribución y posición de los sensidiscos en la caja Petri se realizó conforme a la dirección de las manecillas del reloj colocando al inicio la concentración menor y los otros en secuencia sucesiva y al centro se colocó el sensidisco testigo.

Finalmente, las cajas se sellaron con parafilm, y se incubaron a 28 °C por 24 horas para bacterias y por 48 horas para hongos, ambas bajo condiciones de oscuridad y para el caso de las bacterias también bajo anaerobiosis (Koneman *et al.*, 1999; Celeste *et al.*, 2008).

### **3.2.7 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

Transcurrido el período de 24 horas en el caso de bacterias y 48 horas en el caso de hongos, se midieron con una regla graduada en centímetros los halos de inhibición, (incluyendo el área del sensidisco), formados para cada concentración, determinándose así la concentración mínima inhibitoria, de las cinco probadas, para cada fitopatógeno (Koneman *et al.*, 1999; Celeste *et al.*, 2008).

Para determinar si existía diferencia entre los tratamientos se realizó un análisis estadístico mediante la comparación de medias por la prueba de Tukey, con un nivel de confianza de 95% y una  $\alpha$  de 0.05 (Cervantes *et al.*, 2006).

## **3.3 Elaboración del diseño experimental**

El diseño experimental constó de 6 tratamientos con 8 repeticiones y 10 cepas de microorganismos (5 cepas de hongos y 5 cepas de bacterias). Los 6 tratamientos corresponden a las 5 concentraciones de extracto utilizadas (30, 60, 90, 120 y 180 mgmL<sup>-1</sup>) y el testigo absoluto (impregnado con etanol).

## CAPITULO IV

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**4.1 Rendimiento del extracto en peso seco de *Tagetes lucida* Cav.**

Conocer el rendimiento que presenta el extracto vegetal de una planta es importante debido a que, mientras mayor sea el rendimiento del extracto obtenido a partir del material vegetal, menor será la cantidad de planta que se deberá utilizar y por lo tanto el impacto a las comunidades vegetales será menor. Lo cual también influye en sí la elaboración de medicamentos o tratamientos a partir de dichas plantas es rentable. De manera particular el conocimiento del rendimiento es útil para conocer y determinar la cantidad de planta seca que se debe utilizar para obtener la dosis deseada o previamente determinada, y con esto poder combatir un patógeno o tratar un padecimiento. En el campo de la investigación es importante ya que nos permite determinar con que cantidad de planta seca es posible obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI) para combatir un patógeno y así tener las bases para futuras investigaciones.

En este caso, en el cuadro 5 se detallan los resultados del rendimiento obtenido a partir del material vegetal (484 g) de las partes aéreas (Garduño, 2007) en peso seco, a los cuales se añadió 3650 mL de alcohol etílico obteniéndose un volumen de tintura final de 2880 mL, a partir de los cuales, se obtuvieron 31.57 g de extracto en peso seco después de la destilación, observándose finalmente que los 484 g de material vegetal utilizado dieron un rendimiento del 6.52%.

Cuadro 5. Rendimiento del extracto en peso seco de *Tagetes lucida* Cav.

Peso de la planta seca (g)	Alcohol añadido (mL)	Tintura final obtenida (mL)	Extracto en peso seco (g)	Rendimiento (%)
484	3650	2880	31.5731	6.52

## 4.2 Pruebas de sensibilidad antimicrobiana (antibiogramas)

En el cuadro 6 se muestra de manera general la respuesta que tuvieron las 5 cepas de hongos utilizados en el estudio, donde se observa que en la mayoría de los casos se presentó respuesta positiva frente al extracto de pericón, misma que fue a una concentración de 30 mgmL<sup>-1</sup> en la cepa de *Penicillium* (JUG06-MP14(2)) y para las otras, la repuesta se presentó a una concentración de 60 mgmL<sup>-1</sup> tal fue el caso de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum* y *Penicillium* (JUG06-MP14(3)), mientras que la cepa *Sclerotinia* sp. (SS) fue la única que no presentó respuesta positiva ante el extracto de pericón en ninguna de las concentraciones probadas.

Cuadro 6. Respuesta de los hongos al extracto de *Tagetes lucida* Cav.

Clave de cepas	Clasificación Taxonómica	Tratamientos (concentraciones en mgmL <sup>-1</sup> )					
		Testigo	30	60	90	120	180
SP	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	-	-	+	+	+	+
SS	<i>Sclerotinia</i> sp.	-	-	-	-	-	-
Sc-As	<i>Sclerotium cepivorum</i>	-	-	+	+	+	NP
JUG06-MP14(2)	<i>Penicillium</i> sp.	-	+	+	+	+	+
JUG06-MP14(3)	<i>Penicillium</i> sp.	-	-	+	+	+	+

(-) El patógeno no presentó respuesta (+) El patógeno presentó respuesta (NP) Concentración no probada

Para el caso de las bacterias, en el cuadro 7 se muestra la respuesta que presentaron frente al extracto de pericón y en las cinco concentraciones evaluadas. Se probaron tres cepas diferentes de *Pseudomonas marginalis* (1H, Ls-1 y Ls-MM4) y dos cepas de *Erwinia carotovora* (4P y Ls-N6SS5), donde se encontró que de las cepas estudiadas de *Pseudomonas marginalis* (Ls-MM4) no presentó respuesta positiva frente al extracto de pericón en ninguna de las cinco concentraciones probadas, mientras que la cepa 1H presentó respuesta positiva a partir de los 30 mgmL<sup>-1</sup> observándose diferencia con la cepa Ls-1 la cual tuvo respuesta ante el extracto de pericón a partir de la concentración de 90 mgmL<sup>-1</sup>.

Por su parte, las cepas de *Erwinia carotovora* presentaron una respuesta similar, ya que ambas tuvieron respuesta positiva a partir de la concentración de 60

mgmL<sup>-1</sup>. Sin embargo, debido a los resultados obtenidos en las concentraciones de 60 a 120 mgmL<sup>-1</sup> sólo se probó la concentración de 180 mgmL<sup>-1</sup> en la cepa 4P y no en la cepa Ls-N6SS5.

Cuadro 7. Respuesta de las bacterias al extracto de *Tagetes lucida* Cav.

Clave de cepas	Clasificación taxonómica	Tratamientos (concentraciones en mgmL <sup>-1</sup> )					
		Testigo	30	60	90	120	180
1H	<i>Pseudomonas marginalis</i>	-	+	+	+	+	<b>NP</b>
Ls-1	<i>Pseudomonas marginalis</i>	-	-	-	+	+	<b>NP</b>
Ls-MM4	<i>Pseudomonas marginalis</i>	-	-	-	-	-	-
4P	<i>Erwinia carotovora</i>	-	-	+	+	+	+
Ls-N6SS5	<i>Erwinia carotovora</i>	-	-	+	+	+	<b>NP</b>

(-) El patógeno no presentó respuesta (+) El patógeno presentó respuesta (NP) Concentración no probada

La concentración de 180 mgmL<sup>-1</sup> no fue probada en dos cepas de hongos y tres cepas de bacterias en dos casos específicos: cuando con las concentraciones anteriores no se detectó efecto de inhibición positivo, tal fue el caso de la cepa de hongo *Sclerotinia* sp. (SS) y la cepa bacteriana *Pseudomonas marginalis* (Ls-MM4); y cuando el efecto de inhibición presentado por los patógenos ante las concentraciones de 30 a 120 mgmL<sup>-1</sup> del extracto de pericón fueron determinadas como satisfactorias, como en el resto de las cepas analizadas.

A continuación se presentan los resultados detallados para cada microorganismo con base en el tamaño de los halos de inhibición.

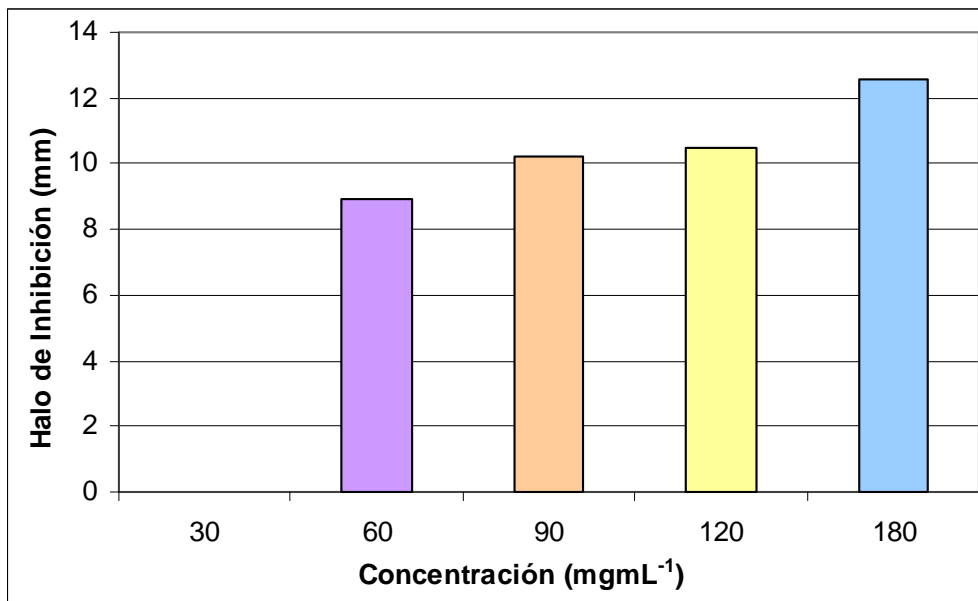
## HONGOS

### *Sclerotinia sclerotiorum* (SP)

La concentración de 30 mgmL<sup>-1</sup> no inhibe el crecimiento de esta cepa, la respuesta se presentó a partir de la concentración de 60 mgmL<sup>-1</sup> en donde el halo de inhibición fue de 8.9 mm.

En la gráfica 1 se observa el comportamiento en cuanto al tamaño promedio de los halos de inhibición presentados por *Sclerotinia sclerotiorum*, donde se puede apreciar que los valores promedios de los halos de inhibición fueron de 8.9, 10.2, 10.5 y 12.6 mm de diámetro para las concentraciones de 60, 90, 120 y 180 mgmL<sup>-1</sup> respectivamente.

Gráfica 1. Tamaño promedio del halo de inhibición (mm) de las diferentes concentraciones del extracto de *T. lucida* sobre *Sclerotinia sclerotiorum*



Así mismo se puede ver que entre los valores obtenidos para las concentraciones de 90 y 120 mgmL<sup>-1</sup> el efecto inhibitorio del extracto frente al patógeno es similar y que no hay diferencia significativa, en comparación con los valores obtenidos en las concentraciones de 60 y 180 mgmL<sup>-1</sup>. Lo cual se corrobora con el análisis estadístico realizado mediante la prueba de Tukey, donde se determina que existe una diferencia estadística significativa entre las concentraciones de 60 y 120 mgmL<sup>-1</sup> no así entre las concentraciones de 60 y 90 mgmL<sup>-1</sup> y 90 y 120 mgmL<sup>-1</sup>. En el caso de la concentración de 180 mgmL<sup>-1</sup> se encontró que presenta diferencia estadística significativa en comparación con todas las demás concentraciones (cuadro 8).



Cuadro 8. Prueba de comparación múltiple de Tukey por concentración para *Sclerotinia sclerotiorum*

Pruebas de rango múltiple para halos de inhibición por concentración Método: 95.0 % LSD			
Concentración	Conteo	Significado	Grupos homogéneos
30	8	0	X
60	5	8.9	X
90	5	10.2	XX
120	5	10.5	X
180	5	12.6	X
Contraste	Diferencia		+/- Límites
30-60	*-8.94		1.22232
30-90	*-10.28		1.22232
30-120	*-10.5		1.22232
30-180	*-12.62		1.22232
60-90	-1.34		1.35605
60-120	*-1.56		1.35605
60-180	*-3.68		1.35605
90-120	-0.22		1.35605
90-180	*-2.34		1.35605
120-180	*-2.12		1.35605
* denota una diferencia estadística significativa			

Finalmente se encontró que para todas las diluciones, a medida que se aumentó la concentración hubo un aumento en el tamaño del halo de inhibición, lo cual se puede apreciar en la figura 5 donde se muestra la formación de los halos de inhibición alrededor de los sensidiscos impregnados con el extracto de pericón.

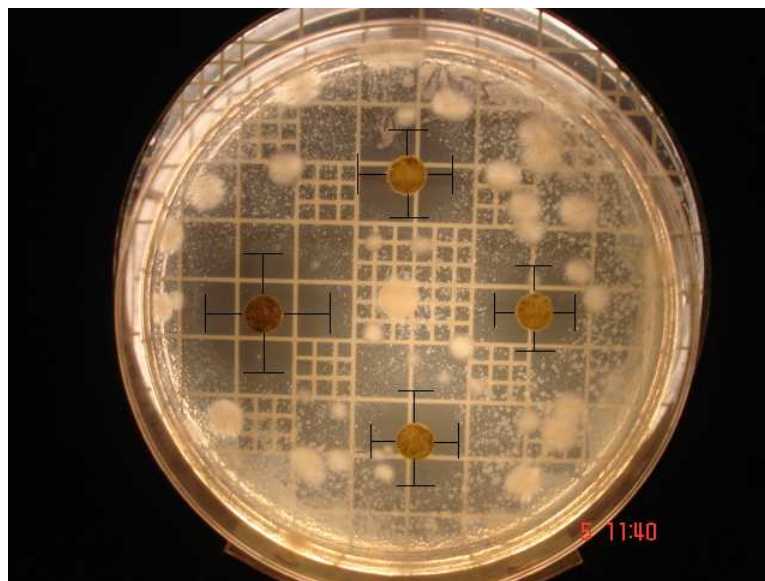


Figura 5. Efecto del extracto de *T. lucida* sobre el cultivo de *Sclerotinia sclerotiorum*

Cabe señalar que se ha reportado que la fracción fenólica de aceites esenciales de varias plantas aromáticas ha demostrado ser tóxica para este hongo (Müller-Riebau *et al.*, 1995). Lo cual concuerda con los resultados obtenidos ya que *Tagetes lucida* también presenta aceites esenciales tales como el metil chavicol.

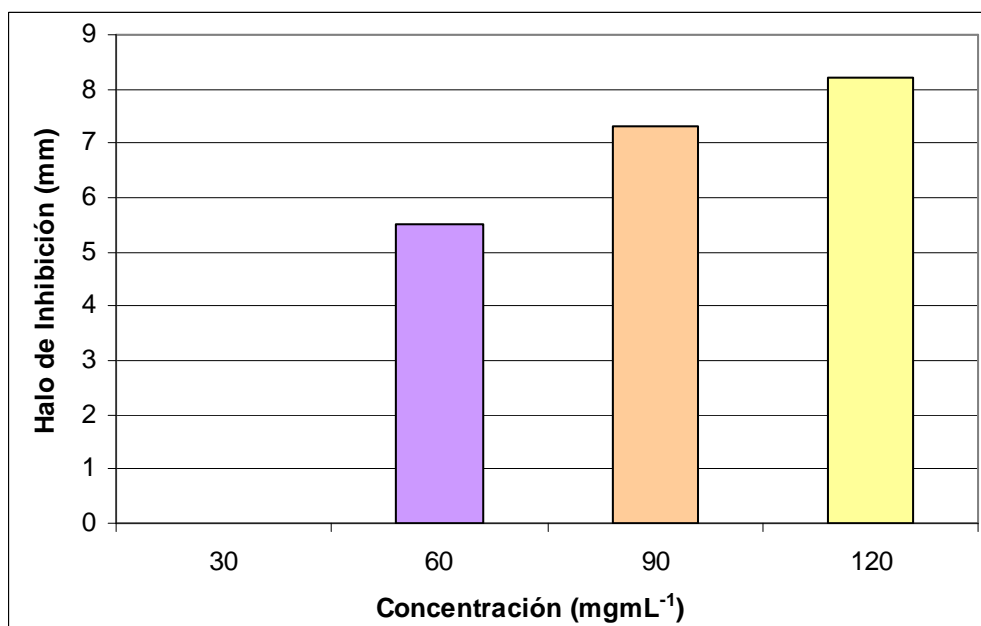
### *Sclerotium cepivorum* (Sc-As)

*Sclerotium cepivorum* es un hongo que produce la enfermedad denominada "pudrición blanda", misma que es considerada muy perjudicial ya que ocasiona pérdidas hasta de un 100% de la producción particularmente en ajo. Según Hermsillo-Gómez *et al.* el control de *S. cepivorum* representa un gran reto, debido principalmente a que este hongo tiene la capacidad para formar estructuras de resistencia denominadas esclerosios, los cuales le permiten mantenerse en un periodo de latencia durante más de 20 años, por otro lado, los productos antimicóticos comerciales que se han empleado para su control no son del todo efectivos (Delgadillo *et al.*, 2002).

Al aplicar el extracto de *Tagetes lucida*, *S. cepivorum* presentó respuesta positiva en tres de las cuatro concentraciones evaluadas, observándose la sensibilidad a partir de la concentración de 60 mgmL<sup>-1</sup> donde el tamaño promedio de los halos de inhibición fue de 5.5 mm de diámetro.

En la gráfica 2 se muestra la respuesta del patógeno ante el extracto de pericón con base en el valor promedio de los halos de inhibición obtenidos para cada una de las concentraciones probadas, se encontró que el patógeno no presentó inhibición a la concentración de 30 mgmL<sup>-1</sup>. Por su parte, para las concentraciones de 60, 90 y 120 mgmL<sup>-1</sup> se obtuvieron halos de inhibición de 5.5, 7.3 y 8.2 mm respectivamente. Estos valores demuestran que la inhibición del patógeno se da en una relación directamente proporcional con la concentración.

Gráfica 2. Tamaño promedio del halo de inhibición (mm) de las diferentes concentraciones del extracto de *T. lucida* sobre *Sclerotium cepivorum*



No obstante que en la gráfica 2, los valores de los halos de inhibición denotan diferencias, el análisis estadístico determinó que sólo existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos de 60 y 90 mgmL<sup>-1</sup> y 60 y 120 mgmL<sup>-1</sup> en comparación con los tratamientos de 90 y 120 mgmL<sup>-1</sup> los cuales son iguales estadísticamente (cuadro 9).

Cuadro 9. Prueba de comparación múltiple de Tukey por concentración para *Sclerotium cepivorum*

Pruebas de rango múltiple para halos de inhibición por concentración			
Método: 95.0 % LSD			
Concentración	Conteo	Significado	Grupos homogéneos
30	8	0	X
60	6	5.5	X
90	8	7.3	X
120	8	8.2	X
Contraste		Diferencia	+/- Límites
30-60		*-5.55	1.0834
30-90		*-7.3125	1.00304
30-120		*-8.2	1.00304
60-90		*-1.7625	1.0834
60-120		*-2.65	1.0834
90-120		-0.8875	1.00304

\* denota una diferencia estadística significativa

En el caso de este microorganismo no se probó la concentración de 180 mgmL<sup>-1</sup> debido a que los resultados obtenidos con las concentraciones del extracto de pericón probadas, mostraron una respuesta notable, lo cual se puede observar en la figura 6.

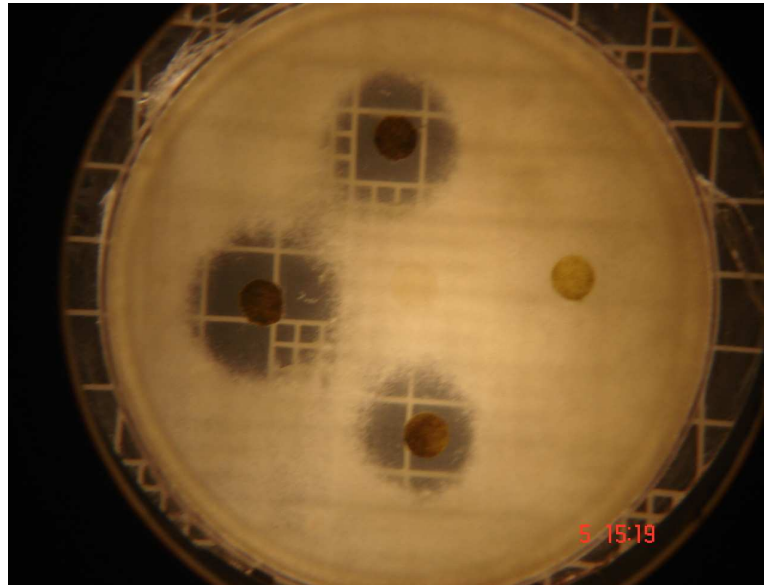


Figura 6. Efecto del extracto de *T. lucida* sobre el cultivo de *Sclerotium cepivorum*

Para este patógeno el extracto de *T. lucida* puede resultar una alternativa para el manejo y control.

#### *Penicillium* sp. (JUG06-MP14 (2))

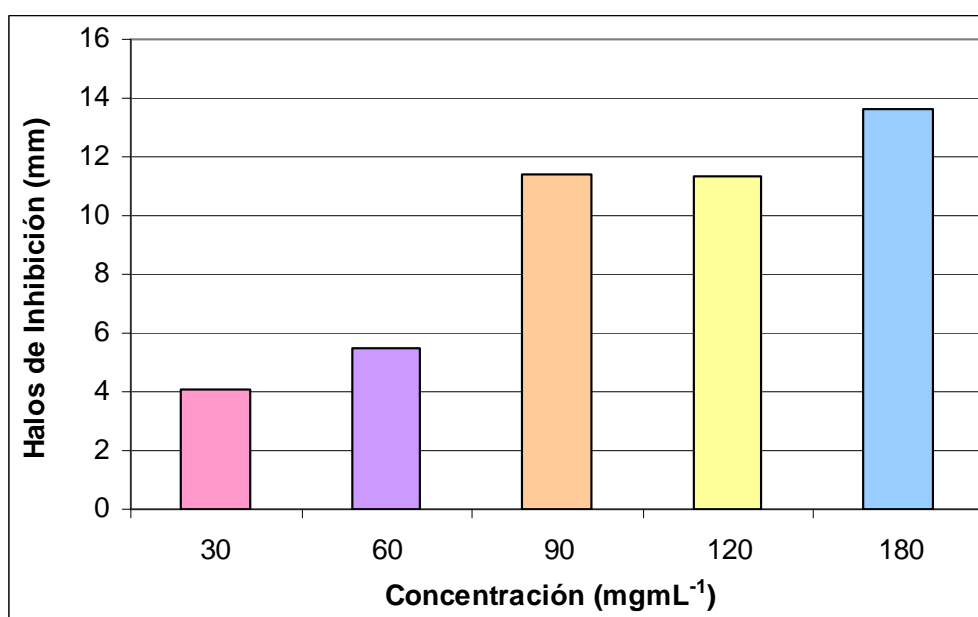
De entre los hongos fitopatógenos más comunes y más destructivos para productos postcosecha, principalmente cítricos, uvas, cebollas se encuentran varias de las especies del género *Penicillium*, mismas que son consideradas muy dañinas y causan grandes pérdidas económicas especialmente en productos de exportación (Meier, 2005). Tradicionalmente se había atacado a estos fitopatógenos mediante la aplicación de fungicidas sintéticos, sin embargo el uso indiscriminado de estos productos provocó la adquisición de resistencia y en algunos países efectos secundarios sobre organismos considerados como benéficos, por esta razón la legislación sobre el uso y producción de fungicidas es cada vez más estricto (Usall *et*

*al.*, 2005). Por tal motivo, el uso de tratamientos alternativos para el control de la podredumbre en post cosecha constituye una de las líneas de investigación en la que más esfuerzos se dedican a nivel mundial. En este trabajo al probar los extractos de *T. lucida* se obtuvieron los siguientes resultados.

La cepa de *Penicillium* (JUG06-MP14 (2)) es la primera de las tres cepas de hongos no identificadas hasta especie para la cual se obtuvieron resultados positivos de inhibición por parte del extracto de pericón, sin embargo se debe decir que la taxonomía de las especies de *Penicillium* es complicada y en muchos de los trabajos citados en la literatura se han presentado resultados y tratamientos a nivel genérico; sin embargo, conocer la especie de dicha cepa posibilitaría que los resultados tuvieran un mayor intervalo de aplicación.

En la cepa *Penicillium* (JUG06-MP14 (2)) se probaron cinco concentraciones, encontrándose respuesta para todas ellas, es decir, la respuesta positiva se encontró desde la concentración de 30 mgmL<sup>-1</sup> hasta la de 180 mgmL<sup>-1</sup>, en la gráfica 3 se muestran los resultados obtenidos en donde los valores promedios de los halos de inhibición encontrados fueron de 4.1, 5.5, 11.4, 11.3 y 13.6 mm respectivamente.

Gráfica 3. Tamaño promedio del halo de inhibición (mm) de las diferentes concentraciones del extracto de *T. lucida* sobre *Penicillium* sp.



En el caso de esta cepa, el extracto de pericón presentó la mejor respuesta así como los halos mejor definidos los cuales se pueden apreciar en la figura 7.

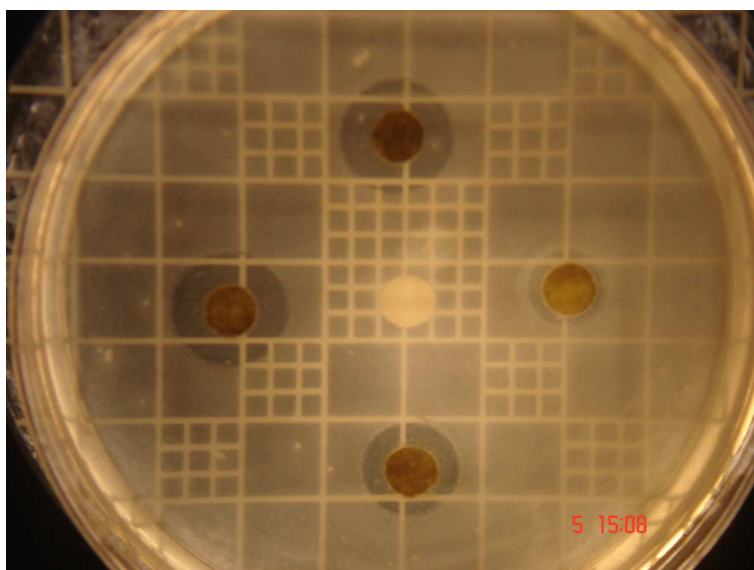


Figura 7. Efecto del extracto de *T. lucida* sobre el cultivo de *Penicillium* sp.

Con base en el análisis estadístico realizado se determinó que para esta cepa existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, con excepción de las concentraciones 90 y 120 mgmL<sup>-1</sup> (cuadro 10); tratamientos entre los cuales se puede apreciar que los valores promedio de los halos de inhibición disminuyeron conforme aumentó la concentración lo que determina que existe un comportamiento inversamente proporcional.

Cuadro 10. Prueba de comparación múltiple de Tukey por concentración para *Penicillium* sp.

Pruebas de rango múltiple para halos de inhibición por concentración Método: 95.0 % LSD			
Concentración	Conteo	Significado	Grupos homogéneos
30	8	4.1	X
60	8	5.5	X
90	7	11.4	X
120	7	11.3	X
180	7	13.6	X
Contraste	Diferencia		+/- Límites
30-60	*-1.375		0.99451
30-90	*-7.30357		1.02942
30-120	*-7.20357		1.02942
30-180	*-9.56071		1.02942
60-90	*-5.92857		1.02942
60-120	*-5.82857		1.02942
60-180	*-8.18571		1.02942
90-120	0.1		1.06318
90-180	*-2.25714		1.06318
120-180	*-2.35714		1.06318

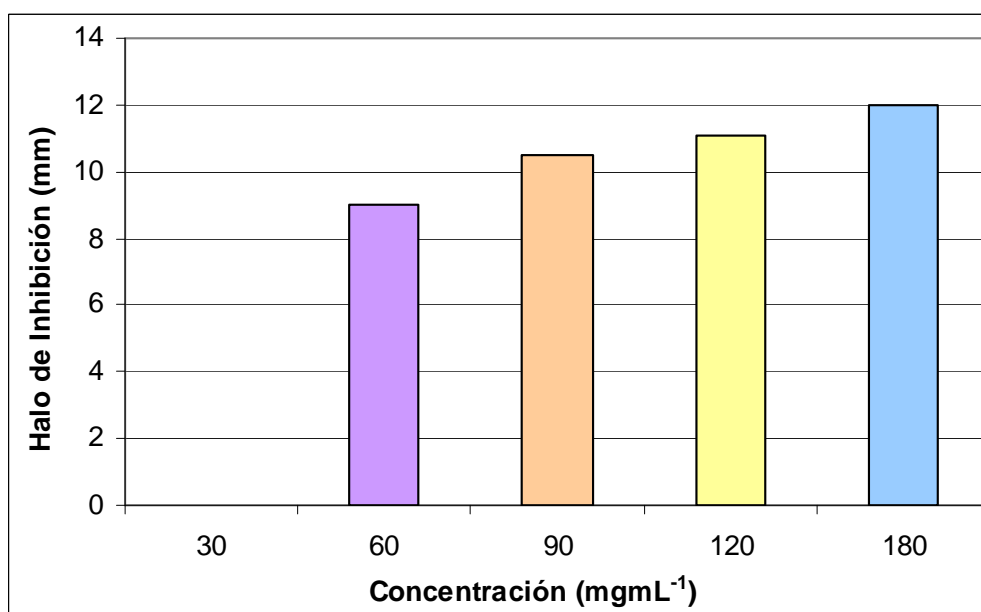
\* denota una diferencia estadística significativa

*Penicillium* sp. (JUG06-MP14 (3))

La cepa *Penicillium* (JUG06-MP14 (3)), también fue inhibida en su crecimiento por el extracto de pericón, observándose no sólo halos grandes sino también perfectamente bien diferenciados (figura 8).

Para este patógeno se probaron las concentraciones de 30, 60, 90, 120 y 180 mgmL<sup>-1</sup> y se encontró que para la concentración de 30 mgmL<sup>-1</sup> no hubo inhibición, tal como se observa en la gráfica 4, por lo tanto de las cinco concentraciones probadas sólo en cuatro se encontró respuesta positiva.

Gráfica 4. Tamaño promedio del halo de inhibición (mm) de las diferentes concentraciones del extracto de *T. lucida* sobre *Penicillium* sp.



Como muestra la gráfica 4 los valores promedio de los halos de inhibición encontrados fueron de 9.0, 10.5, 11.1 y 12.0 mm de diámetro respectivamente para las concentraciones de 60, 90, 120 y 180 mgmL<sup>-1</sup>. También se observa que el tamaño de los halos, así como el efecto de inhibición, aumentó con relación al aumento de la concentración. Finalmente, con base en el análisis estadístico se encontró que existe diferencia estadística significativa entre las concentraciones de 60 y 90 mgmL<sup>-1</sup> así como entre las de 90 y 180 mgmL<sup>-1</sup>, y no así entre las concentraciones de 90 y 120 mgmL<sup>-1</sup> y entre 120 y 180 mgmL<sup>-1</sup> (cuadro 11).

Cuadro 11. Prueba de comparación múltiple de Tukey por concentración para *Penicillium* sp.

Pruebas de rango múltiple para halos de inhibición por concentración Método: 95.0 % LSD			
Concentración	Conteo	Significado	Grupos homogéneos
30	8	0	X
60	8	9.0	X
90	8	10.5	X
120	8	11.1	XX
180	8	12.0	X
Contraste	Diferencia		+/- Límites
30-60	*-9.0375		1.21288
30-90	*-10.5125		1.21288
30-120	*-11.1875		1.21288
30-180	*-12.025		1.21288
60-90	*-1.475		1.21288
60-120	*-2.15		1.21288
60-180	*-2.9875		1.21288
90-120	-0.675		1.21288
90-180	*-1.5125		1.21288
120-180	-0.8375		1.21288

\* denota una diferencia estadística significativa

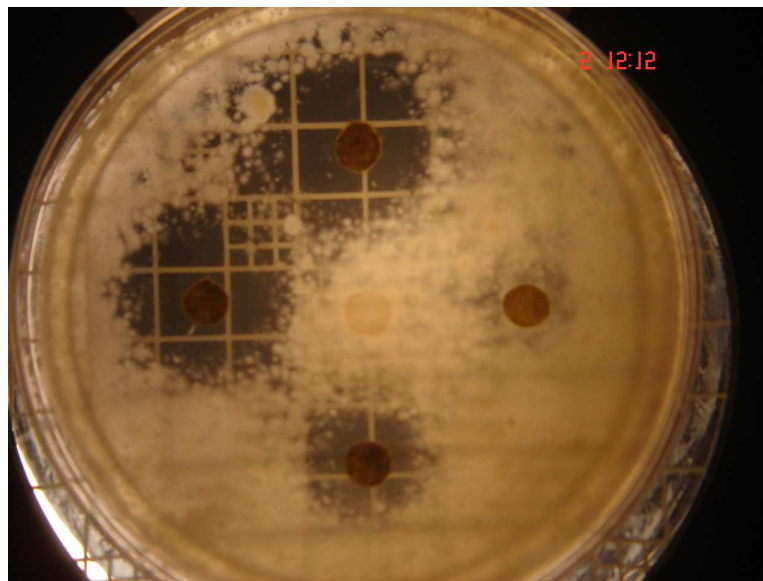


Figura 8. Efecto del extracto de *T. lucida* sobre el cultivo de *Penicillium* sp.

Hernández *et al.*, en 2007 encontraron un efecto positivo sobre la inhibición micelial de *Penicillium digitatum* Lind. en tratamientos *in vitro* con extractos de guamúchil (*Pithecellobium dulce* Roxb.), así como la inhibición de la germinación de conidios de *Penicillium expansum* Link. con derivados semipuros o crudos de chile (*Capsicum frutescens* L.) (Hernández, *et al.*, 2007). Lo que apoya estos resultados debido a que aún y cuando no se conoce la especie para las dos cepas del género *Penicillium* analizadas, se encontró un efecto positivo y una inhibición del crecimiento del patógeno *in vitro*.



## BACTERIAS

### *Pseudomonas marginalis* (1H)

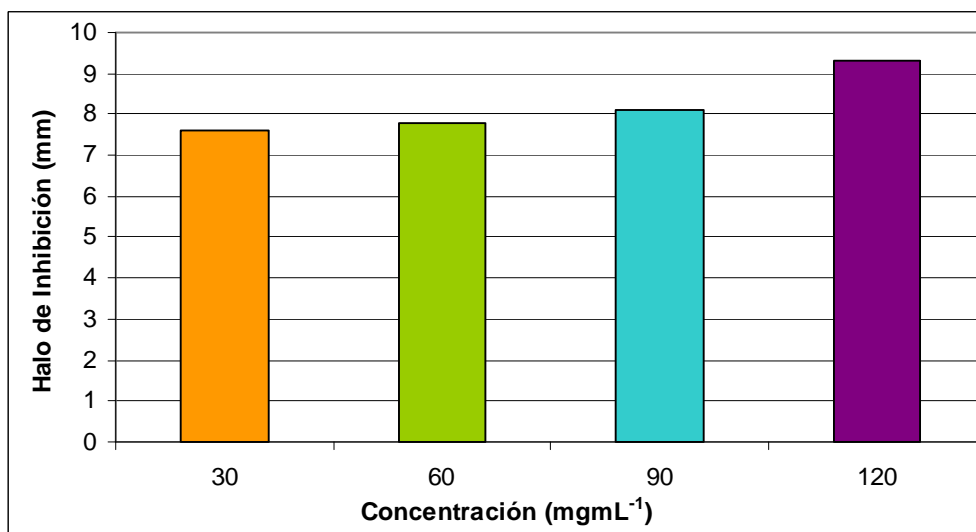
Las bacterias fitopatógenas representan un serio problema para la agricultura y los tratamientos que se han seguido para su control corresponden a antibióticos, compuestos de cobre, sin embargo, estos no han sido del todo satisfactorios, además el uso de los antibióticos y compuestos de cobre actualmente están prohibidos en muchos países debido a su toxicidad y efectos secundarios para el ambiente; ante este panorama, el control y prevención de enfermedades de origen bacteriano se está desarrollando a partir de estrategias alternativas como lo son, el uso de compuestos naturales extraídos a partir de plantas como es el caso de *T. lucida* (Vasinauskiene *et al.*, 2006). En forma particular se ha documentado que *Pseudomonas marginalis* es un patógeno que produce la pudrición blanda en hojas y tallos, principalmente en productos como la papa, frijol y girasol, que están considerados entre los cultivos más importantes para la alimentación humana a nivel mundial (Smith, 1992).

Entre los métodos de control tradicionales se recomienda la rotación de cultivos, el uso de Captan o Arasan-75, sin embargo esto resulta caro y perjudicial para el medio ambiente.

El extracto de *T. lucida* probado en este trabajo resultó efectivo en las concentraciones de 30, 60, 90 y 120 mgmL<sup>-1</sup> tal como se observa en la gráfica 5.

No obstante, se puede observar que no hay gran diferencia en los tamaños promedios de los halos de inhibición siendo estos de 7.6, 7.8, 8.1 y 9.3 mm respectivamente.

Gráfica 5. Tamaño promedio del halo de inhibición (mm) de las diferentes concentraciones del extracto de *T. lucida* sobre *Pseudomonas marginalis*



Lo anterior se corrobora con el análisis estadístico realizado mediante la prueba de Tukey (cuadro 12), donde se determina que los tamaños promedio de los halos de inhibición no presentan diferencia estadística significativa entre las concentraciones de 30, 60 y 90 mgmL<sup>-1</sup>, así como entre las concentraciones de 90 y 120 mgmL<sup>-1</sup>. Sólo existe diferencia entre la concentración de 120 mgmL<sup>-1</sup> con respecto a las de 30 y 60 mgmL<sup>-1</sup>.

Cuadro 12. Prueba de comparación múltiple de Tukey por concentración para *Pseudomonas marginalis*

Pruebas de rango múltiple para halos de inhibición por concentración Método: 95.0 % LSD			
Concentración	Conteo	Significado	Grupos homogéneos
30	6	7.6	X
60	7	7.8	X
90	7	8.1	XX
120	7	9.3	X
Contraste	Diferencia		+/- Límites
30-60	-0.2		1.31979
30-90	-0.557143		1.31979
30-120	*-1.78571		1.31979
60-90	-0.357143		1.26801
60-120	*-1.58571		1.26801
90-120	-1.22857		1.26801

\* denota una diferencia estadística significativa

Este comportamiento significa que aún cuando en las cuatro concentraciones probadas existió inhibición del patógeno, el tratamiento a una concentración de 30 mgmL<sup>-1</sup> sería suficiente para inhibir el crecimiento *in vitro* del microorganismo.

En la figura 9 se puede observar la inhibición de las colonias por parte del extracto de *Tagetes lucida*.

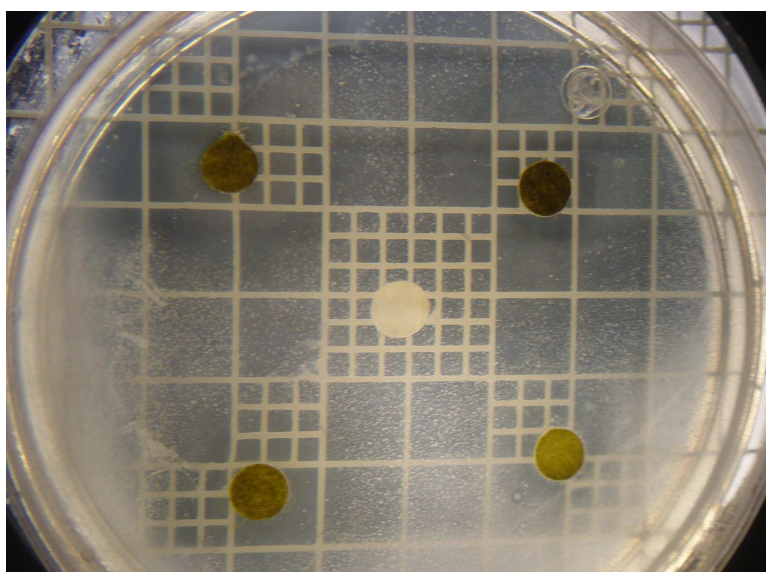
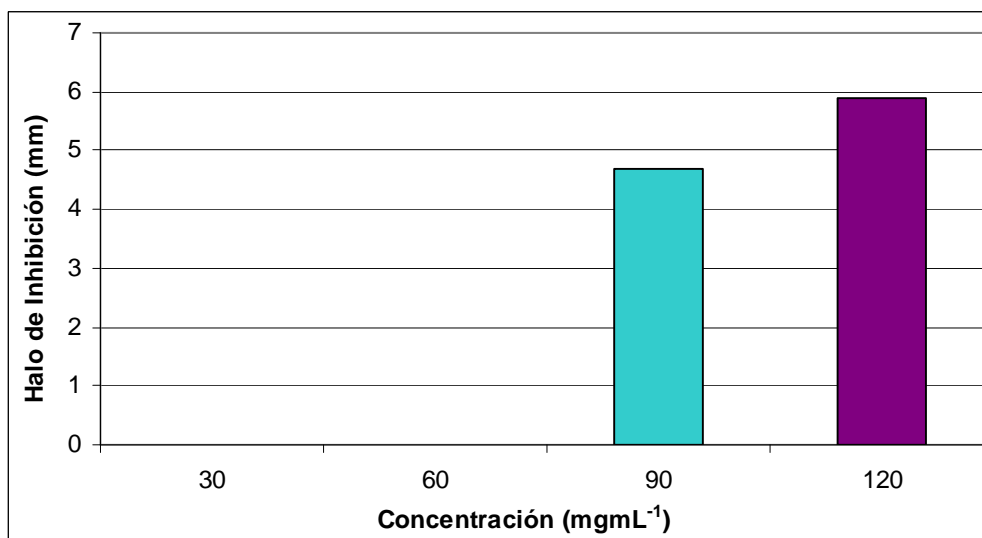


Figura 9. Efecto del extracto de *T. lucida* sobre el cultivo de *Pseudomonas marginalis*

### *Pseudomonas marginalis* (Ls-1)

Para el caso de la cepa de *Pseudomonas marginalis* (Ls-1) se probaron cuatro concentraciones de las cuales sólo dos presentaron efecto positivo al inhibir el crecimiento de las colonias. Se analizaron las concentraciones de 30, 60, 90 y 120 mgmL<sup>-1</sup> de las cuales sólo las de 90 y 120 mgmL<sup>-1</sup> fueron las que resultaron efectivas. Se presentó un halo de inhibición de 4.7 y 5.9 mm respectivamente como se observa en la gráfica 6.

Gráfica 6. Tamaño promedio del halo de inhibición (mm) de las diferentes concentraciones del extracto de *T. lucida* sobre *Pseudomonas marginalis*



Aún y cuando sólo se encontró efecto positivo en estas dos concentraciones, el análisis estadístico demostró que si existe una diferencia significativa entre ambas (cuadro 13).

Cuadro 13. Prueba de comparación múltiple de Tukey por concentración para *Pseudomonas marginalis*

Pruebas de rango múltiple para halos de inhibición por concentración Método: 95.0 % LSD			
Concentración	Conteo	Significado	Grupos homogéneos
30	8	0	X
60	8	0	X
90	6	4.7	X
120	8	5.9	X
Contraste	Diferencia		+/- Límites
30-60	0.0		0.709438
30-90	*-4.73333		0.76628
30-120	*-5.925		0.709438
60-90	*-4.73333		0.76628
60-120	*-5.925		0.709438
90-120	*-1.19167		0.76628

\* denota una diferencia estadística significativa

Para esta cepa no se probó la concentración de 180 mgmL<sup>-1</sup> debido a que la poca actividad que el extracto presentó ante el patógeno demuestra que aún cuando se aumente la concentración del tratamiento la actividad inhibitoria será mínima. Lo cual se puede observar más claramente en la figura 10.

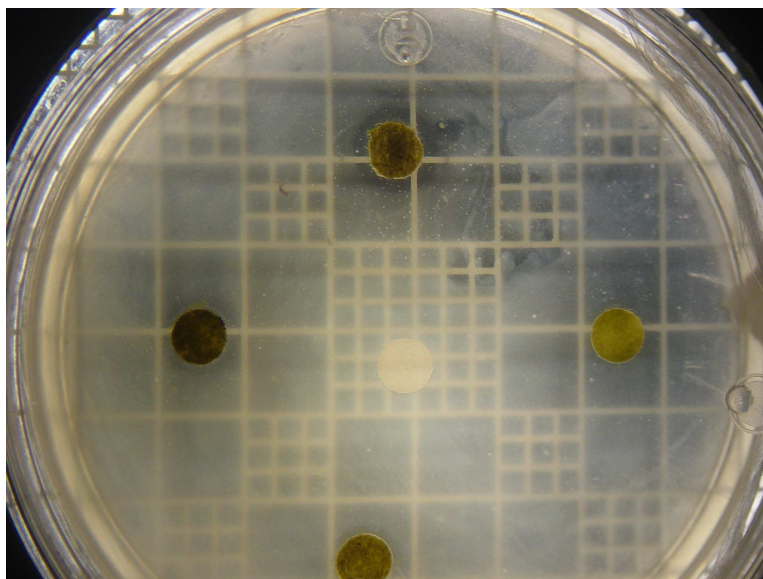


Figura 10. Efecto del extracto de *T. lucida* sobre el cultivo de *Pseudomonas marginalis*

#### *Pseudomonas marginalis* (Ls-MM4)

En la cepa *Pseudomonas marginalis* (Ls-MM4) se probaron las concentraciones de 30, 60, 90 y 120 mgmL<sup>-1</sup>, mismas que resultaron negativas en la inhibición del crecimiento.

Cabe señalar que la diferencia en el efecto que presentaron las dos cepas de *Pseudomonas marginalis* en las que se reportó inhibición del crecimiento de las colonias, así como en la cepa de *Pseudomonas marginalis* (Ls-MM4) en la cual no se observó efecto positivo, puede deberse a que entre una especie bacteriana existen subespecies con grados diferentes de patogenicidad y resistencia lo cual explicaría dicho comportamiento ante el extracto de pericón.

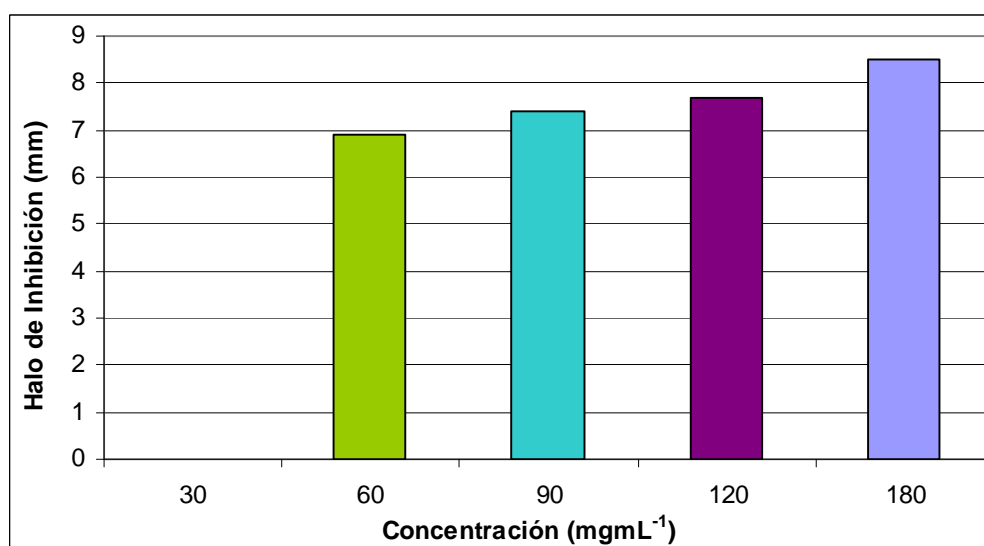
#### *Erwinia carotovora* (4P)

*Erwinia carotovora* es considerada como uno de los patógenos más dañinos pues ataca en forma importante a la papa (*Solanum tuberosum* L.) especie que ocupa el cuarto lugar entre los principales cultivos alimenticios en el mundo (Mayea, 1995). Se

localiza en el suelo en particular en la rizosfera de las malezas y puede infectar cuando la humedad alcanza un 90%, porcentaje que se alcanza en los campos de cultivo de las regiones frías y templadas principalmente en Europa y los Estados Unidos. Los métodos de control que se usan contra este patógeno han sido el uso de bactericidas sistémicos al suelo, lo que tiene como consecuencia el daño a la microbiota edáfica en general, por esta razón, es importante proponer tratamientos alternativos que inhiban el crecimiento de la bacteria sin dañar a otros microorganismos (García, 2000).

El extracto de pericón aplicado sobre la cepa bacteriana *Erwinia carotovora* (4P) fue positivo, observándose la inhibición del patógeno en cuatro de las cinco concentraciones probadas, 60, 90, 120 y 180 mgmL<sup>-1</sup>. La concentración de 30 mgmL<sup>-1</sup> fue la única en la cual no se observó inhibición del crecimiento. El tamaño promedio de los halos de inhibición que se observaron en las concentraciones con respuesta positivas fueron de 6.9, 7.4, 7.7 y 8.5 mm respectivamente tal como se observa en la gráfica 7.

Gráfica 7. Tamaño promedio del halo de inhibición (mm) de las diferentes concentraciones del extracto de *T. lucida* sobre *Erwinia carotovora*



Para esta cepa fue necesario realizar el análisis de la concentración de 180 mgmL<sup>-1</sup> para determinar si existía una verdadera diferencia entre cada tratamiento. Por lo que al observar el análisis estadístico se encontró que las concentraciones de

60 y 90 mgmL<sup>-1</sup> son iguales estadísticamente, mientras que entre la concentración 90, 120 y 180 mgmL<sup>-1</sup> si existe diferencia estadística significativa, así como entre las de 60, 120 y 180 mgmL<sup>-1</sup> (cuadro 14, figura 11).

Cuadro 14. Prueba de comparación múltiple de Tukey por concentración para *Erwinia carotovora*

Pruebas de rango múltiple para halos de inhibición por concentración Método: 95.0 % LSD			
Concentración	Conteo	Significado	Grupos homogéneos
30	8	0	X
60	3	6.9	X
90	5	7.4	XX
120	5	7.7	X
180	5	8.5	X
Contraste	Diferencia		+/- Límites
30-60	*-6.9		0.574776
30-90	*-7.46		0.484005
30-120	*-7.78		0.484005
30-180	*-8.5		0.484005
60-90	-0.56		0.620022
60-120	*-0.88		0.620022
60-180	*-1.6		0.620022
90-120	-0.32		0.536955
90-180	*-1.04		0.536955
120-180	*-0.72		0.536955

\* denota una diferencia estadística significativa

Finalmente se encontró una relación directamente proporcional entre el efecto inhibitorio del extracto de pericón sobre el patógeno y la concentración utilizada.

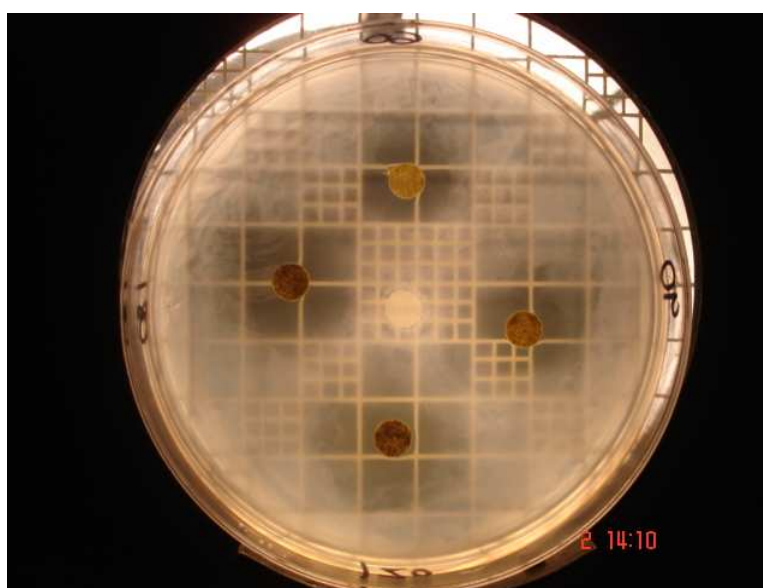


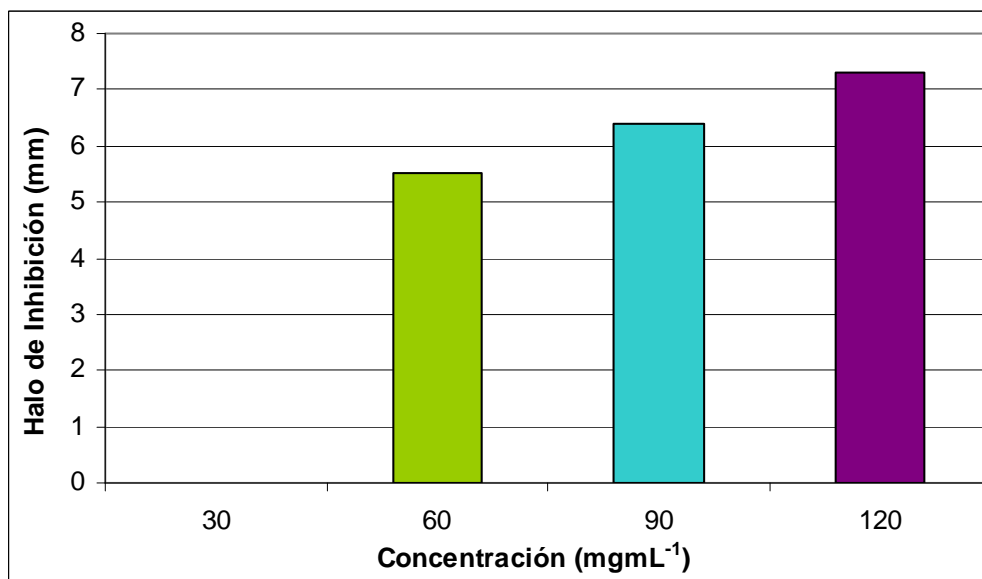
Figura 11. Efecto del extracto de *T. lucida* sobre el cultivo de *Erwinia carotovora*

*Erwinia carotovora* (Ls-N6SS5)

En cuanto a la inhibición de la cepa de *Erwinia carotovora* (Ls-N6SS5) se encontró que de las cuatro concentraciones probadas sólo tres detuvieron el crecimiento de las colonias. La concentración de 30 mgmL<sup>-1</sup> fue la única ante la cual no se observó inhibición.

La gráfica 8 muestra el comportamiento del patógeno ante el extracto de pericón, donde se observa que los valores promedios de los halos de inhibición para las concentraciones de 60, 90 y 120 mgmL<sup>-1</sup> fueron de 5.5, 6.4 y 7.3 mm respectivamente. Observándose que a medida que se aumenta la concentración aumenta el tamaño de los halos de inhibición.

Gráfica 8. Tamaño promedio del halo de inhibición (mm) de las diferentes concentraciones del extracto de *T. lucida* sobre *Erwinia carotovora*



El análisis estadístico demuestra que no existe diferencia significativa entre las concentraciones de 60 y 90 mgmL<sup>-1</sup>, mientras que entre las de 60 y 120 mgmL<sup>-1</sup> y 90 y 120 mgmL<sup>-1</sup> si existe diferencia (cuadro 15).



Cuadro 15. Prueba de comparación múltiple de Tukey por concentración para *Erwinia carotovora*

Pruebas de rango múltiple para halos de inhibición por concentración			
Método: 95.0 % LSD			
Concentración	Conteo	Significado	Grupos homogéneos
30	8	0	X
60	4	5.5	X
90	6	6.4	X
120	6	7.3	X
Contraste		Diferencia	+/- Límites
30-60		*-5.55	0.886996
30-90		*-6.43333	0.782257
30-120		*-7.3	0.782257
60-90		-0.883333	0.934976
60-120		*-1.75	0.934976
90-120		*-0.866667	0.836268

\* denota una diferencia estadística significativa

Guevara *et al.*, en 2000 reportaron que al probar diversos extractos de plantas como *Mahonia aquifolium* Nutt, *Berberis vulgaris* L., *Rhus typhina* L. y *Allium sativum* L. no encontraron efecto en cuanto a la inhibición de la proliferación de *Erwinia carotovora*, así como tampoco en diversas especies del género *Pseudomonas* (Guevara *et al.*, 2000). Por lo que la inhibición encontrada al emplear *Tagetes lucida* la coloca como una opción para el control y tratamiento de enfermedades producidas por *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas marginalis*.

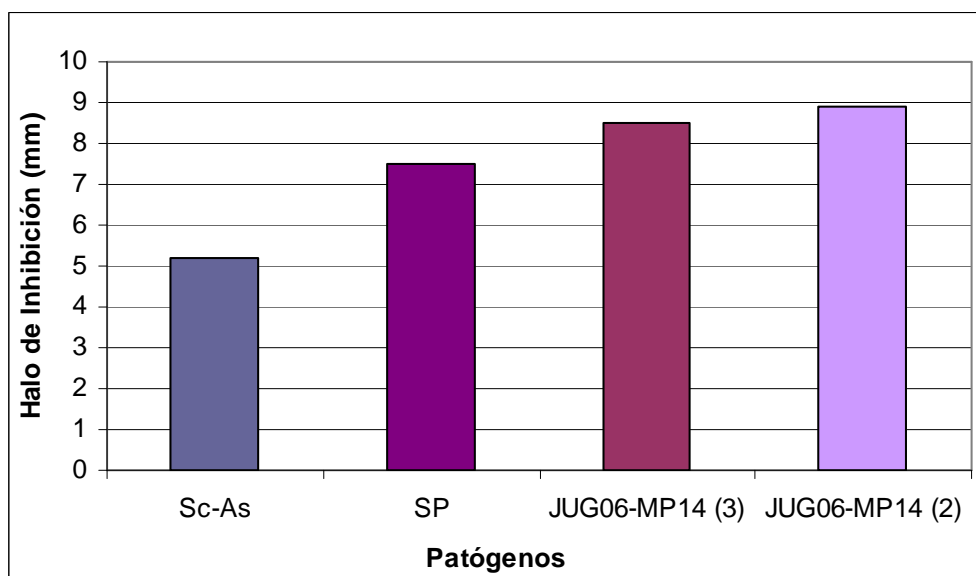
### 4.3. Determinación del patógeno más sensible al extracto de *T. lucida*

Para la determinación del patógeno más sensible ante el extracto de pericón se realizó un análisis estadístico mediante la prueba de comparación múltiple de Tukey con base en el tamaño de los halos de inhibición para cada patógeno, tanto hongos como bacterias.

#### HONGOS

A partir del análisis estadístico se determinó que de los hongos la cepa de *Penicillium* sp. (JUG06-MP14 (2)) fue la más sensible al presentar los halos de inhibición más grandes (gráfica 9) además de presentar inhibición de las colonias a partir de la menor concentración la cual fue de 30 mgmL<sup>-1</sup>.

Gráfica 9. Comparación del tamaño promedio de los halos de inhibición entre las diferentes cepas de hongos



Sc-As: *Sclerotium cepivorum* SP: *Sclerotinia sclerotiorum* JUG06-MP14 (2): *Penicillium* sp.  
JUG06-MP14 (3): *Penicillium* sp.

En contra parte, el patógeno más resistente fue la cepa de *Sclerotium cepivorum* (Sc-As) al presentar los halos de inhibición más pequeños además de que

presentó inhibición a partir de la concentración de 60 mgmL<sup>-1</sup>; no obstante a la resistencia mostrada por el patógeno se puede comentar que los resultados obtenidos en este trabajo son importantes debido a las características de patogenicidad de *Sclerotium cepivorum*, así como a la poca eficacia de los actuales métodos de control que se utilizan en los campos de cultivo en México.

De manera general, y con base en el análisis estadístico se determinó que entre las dos cepas de *Penicillium* (JUG06-MP14 (2) y JUG06-MP14 (3)) y la de *Sclerotinia sclerotiorum* (SP) no existe diferencia estadística significativa en cuanto a la sensibilidad ante el extracto de pericón, mientras que en la cepa de *Sclerotium cepivorum* (Sc-As) y las dos cepas de *Penicillium* (JUG06-MP14 (2) y JUG06-MP14 (3)) y la cepa de *Sclerotinia sclerotiorum* (SP) si existe una diferencia con relación al tamaño promedio de los halos de inhibición (cuadro 16).

Cuadro 16. Pruebas de comparación múltiple de Tukey entre hongos

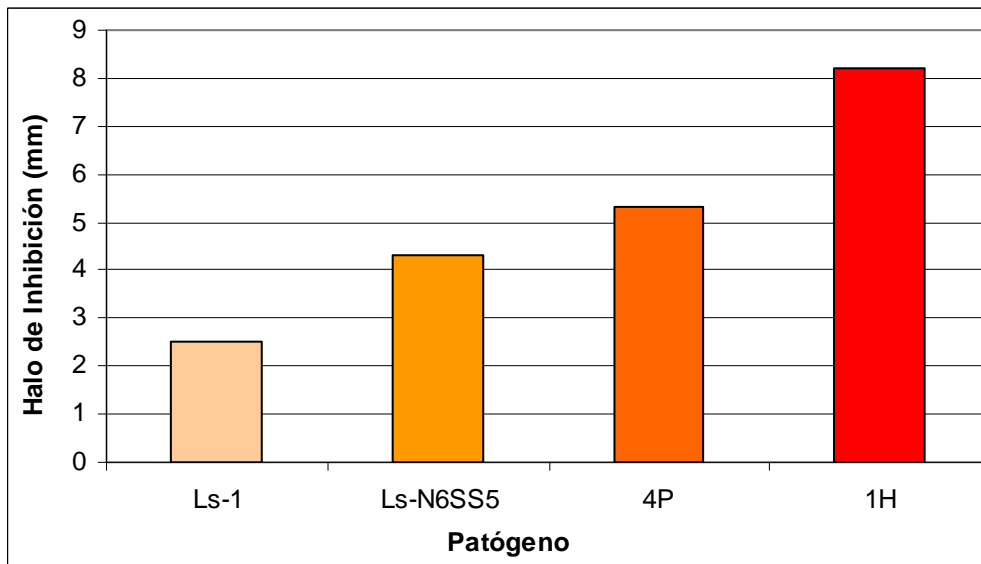
Pruebas de rango múltiple Método: 95.0 % LSD			
Cepa fúngica	Conteo	Significado	Grupos homogéneos
<i>Sclerotium cepivorum</i> (Sc-As)	30	5.24667	X
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (SP)	28	7.56071	X
<i>Penicillium</i> sp. (JUG06-MP14(3))	40	8.5525	X
<i>Penicillium</i> sp. (JUG06-MP14(2))	37	8.97568	X
Contraste	Diferencia	+/- Límites	
JUG06-MP14(2) - JUG06-MP14(3)	0.423176	1.93957	
JUG06-MP14(2) - Sc-As	*3.72901	2.08914	
JUG06-MP14(2) - SP	1.41496	2.12995	
JUG06-MP14(3) - Sc-As	*3.30583	2.05376	
JUG06-MP14(3) - SP	0.991786	2.09526	
Sc-As - SP	*-2.31405	2.23443	
* denota una diferencia estadística significativa			

## BACTERIAS

Para el caso de las bacterias se determinó que la cepa 1H de *Pseudomonas marginalis* fue la más sensible ante el extracto de pericón; presentó efecto inhibitorio a partir de la mínima concentración la cual fue de 30 mgmL<sup>-1</sup> y además presentó los valores promedio de halos de inhibición mayores, por el contrario se encontró que la cepa Ls-1 también de *Pseudomonas marginalis* fue la cepa más resistente ante el

extracto debido a que fue la única cepa que presentó actividad a partir de la concentración de  $90 \text{ mg mL}^{-1}$  así como los halos de inhibición más pequeños, tal como se observa en la gráfica 10.

Gráfica 10. Comparación del tamaño promedio de los halos de inhibición entre las diferentes cepas de bacterias



Ls-1: *Pseudomonas marginalis*    Ls-N6SS5: *Erwinia carotovora*    4P: *Erwinia carotovora*    1H: *Pseudomonas marginalis*

Dicho comportamiento refleja que aun y cuando se tiene determinadas a ambas cepas como pertenecientes a la bacteria *Pseudomonas marginalis*, deben ser patovares diferentes, fenómeno que existe dentro de muchas especies de bacterias fitopatógenas, y por otro lado se puede deber a que son cepas aisladas de regiones diferentes del estado de Guanajuato así como de hospederos diferentes ya que la cepa 1H fue aislada de ajo y la cepa Ls-1 fue aislada de lechuga.

Por otra parte, el análisis estadístico demostró que entre las cepas Ls-N6SS5 y 4P ambas pertenecientes a la especie *Erwinia carotovora* no existen diferencias significativas en cuanto a la inhibición del patógeno por el extracto de pericón, con lo cual se puede decir que al haber presentado comportamientos similares, la patogenicidad de ambas cepas es muy similar, aun y cuando se aislaron de regiones y hospederos diferentes, ya que la cepa Ls-N6SS5 fue aislada de ajo y la cepa 4P fue

aislada de lechuga. Por otro lado, el análisis estadístico también determinó que entre las cepas 1H y Ls-1 de *Pseudomonas marginalis* si existe diferencia estadística significativa, así como entre éstas y las cepas Ls-N6SS5 y 4P de *Erwinia carotovora* (cuadro 17).

Cuadro 17. Pruebas de comparación múltiple de Tukey entre bacterias

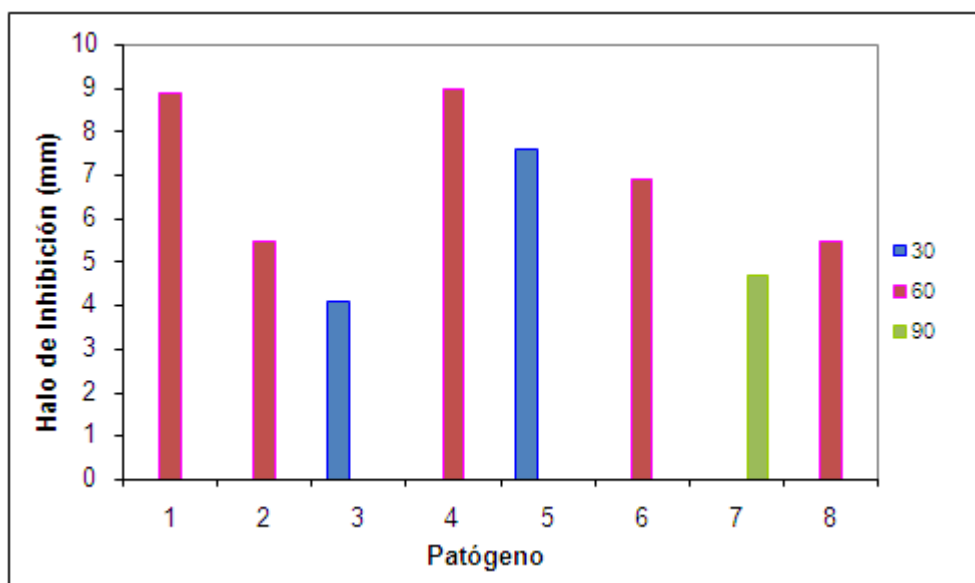
Pruebas de rango múltiple			
Método: 95.0 % LSD			
Cepa bacteriana	Conteo	Significado	Grupos homogéneos
<i>Pseudomonas marginalis</i> (Ls-1)	30	2.52667	X
<i>Erwinia carotovora</i> (Ls-N6SS5)	24	4.35833	X
<i>Erwinia carotovora</i> (4P)	26	5.36154	X
<i>Pseudomonas marginalis</i> (1H)	27	8.25926	X
Contraste	Diferencia	+/- Límites	
4P - Ls-N6SS5	1.00321	1.62742	
4P - 1H	*-2.89772	1.57971	
4P - Ls-1	*2.83487	1.54047	
Ls-N6SS5 - 1H	*-3.90093	1.61289	
Ls-N6SS5 - Ls-1	*1.83167	1.57448	
1H - Ls-1	*5.73259	1.52511	
* denota una diferencia estadística significativa			

#### 4.4 Concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es aquella concentración a la cual se observa inhibición del crecimiento de los patógenos y será la concentración a la cual la actividad de inhibición es suficiente para poder combatir algún patógeno y con esto combatir algún padecimiento o enfermedad en cualquier ser vivo (Koneman 1999).

Por esto, determinar la concentración mínima inhibitoria a la cual se encontró efecto para cada patógeno utilizado, fue importante, y esto se muestra en la gráfica 11 donde se puede observar que para la mayoría de los patógenos la CMI fue de 60 mgmL<sup>-1</sup>.

Gráfica 11. Tamaño promedio de los halos de inhibición encontrados para la CMI de cada patógeno



1.-*Sclerotinia sclerotiorum* (SP) 2.-*Sclerotium cepivorum* (Sc-As) 3.-*Penicillium* sp. (JUG06-MP14 (2))  
4.-*Penicillium* sp. (JUG06-MP14 (3)) 5.-*Pseudomonas marginalis* (1H) 6.- *Erwinia carotovora* (4P)  
7.-*Pseudomonas marginalis* (Ls-1) 8.-*Erwinia carotovora* (Ls-N6SS5).

En el caso de los hongos se encontró que la CMI para la cepa de *Penicillium* sp. (JUG06-MP14(2)) fue de 30 mgmL<sup>-1</sup> con un halo de inhibición de 4.1 mm de diámetro, mientras que para las cepas de *Sclerotinia sclerotiorum* (SP), *Sclerotium*

*cepivorum* (Sc-As) y *Penicillium* sp. (JUG06-MP14(3)) la CMI se encontró a los 60 mgmL<sup>-1</sup> encontrándose halos de inhibición de 8.9, 5.5 y 9.0 mm respectivamente.

Por su parte, para las bacterias se encontró que, en el caso de *Pseudomonas marginalis* (1H) la CMI fue de 30 mgmL<sup>-1</sup> con un halo de inhibición de 7.6 mm de diámetro, mientras que para las cepas de *Erwinia carotovora* (4P y Ls-N6SS5) la CMI encontrada fue de 60 mgmL<sup>-1</sup> con halos de inhibición de 6.9 y 5.5 mm de diámetro respectivamente. Y finalmente, la segunda cepa de *Pseudomonas marginalis* (Ls-1) reportó la CMI a los 90 mgmL<sup>-1</sup> con un halo de inhibición de 4.7 mm de diámetro, siendo así la CMI más alta encontrada en el estudio.

Finalmente, puede decirse que la actividad encontrada del extracto de pericón sobre cada uno de los patógenos estudiados, tanto hongos como bacterias, no sólo se debe a la presencia de compuestos con efecto antimicrobiano sino también a la concentración de estos en la planta. La inhibición del crecimiento *in vitro* de las colonias de fitopatógenos tanto bacterias y hongos exhibida por el extracto de *Tagetes lucida* se puede deber a la presencia de algunos de los compuestos que se han reportado en estudios anteriores tales como los encontrados por De la Cruz en 2005 y Hernández *et al.* en 2006, autores que indican que la 5,7,4'-trimethoxyflavona y  $\alpha$ -tertienilo presentan efecto antimicrobiano mientras que la 7-metoxicumarina es específica contra la actividad bacteriana. Así mismo se ha documentado que la concentración de las sustancias en las plantas depende de múltiples factores como la edad, tipo de suelo, entre otros y por lo tanto es muy variada (Bicchi *et al.*, 1997; Ciccío, 2005).

El empleo de plantas adaptadas a condiciones de disturbio como las que se encuentran en regiones con impacto antropogénico ya sea arvenses o ruderales, tales como *Tagetes lucida*, resultan una fuente interesante para la obtención de extractos vegetales con actividad antimicrobiana. El empleo de extractos vegetales para el control de enfermedades vegetales en el marco de una agricultura sostenible constituye una alternativa promisoriosa, debido a su elevada efectividad, bajo costo y no ser contaminantes del ambiente.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de *Tagetes lucida* presentó efecto inhibitorio tanto en los hongos como en las bacterias fitopatógenas, por lo cual la hipótesis planteada se aceptó.
- Se presentó una relación directamente proporcional entre las concentraciones usadas del extracto de *Tagetes lucida* y el halo de inhibición en *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum* y *Penicillium* sp. (JUG06-MP14 (3)).
- El hongo *Penicillium* sp. (JUG06-MP14 (2)) fue el único patógeno que presentó una relación inversamente proporcional entre las concentraciones usadas del extracto y el halo de inhibición, específicamente en las concentraciones de 60 y 90 mgmL<sup>-1</sup>.
- El hongo más sensible al extracto de *Tagetes lucida* fue *Penicillium* sp. (JUG06-MP14(2)). Mientras que el más resistente fue *Sclerotium cepivorum*.
- La CMI para *Penicillium* sp. (JUG06-MP14(2)) fue de 30 mgmL<sup>-1</sup>. mientras que *Sclerotium cepivorum* presentó su CMI a los 60 mgmL<sup>-1</sup>.
- Las cepas de *Pseudomonas marginalis* (1H y Ls-1) así como las de *Erwinia carotovora* (4P y Ls-N6SS5) presentaron una relación directamente proporcional entre las concentraciones usadas del extracto de *Tagetes lucida* y el halo de inhibición.
- Entre las bacterias, la cepa de *Pseudomonas marginalis* (1H) fue la más sensible frente al extracto de *Tagetes lucida*, y la que resultó más resistente fue *Pseudomonas marginalis* (Ls-1).



- La bacteria *Pseudomonas marginalis* (1H) presentó su CMI a los 30 mgmL<sup>-1</sup> y por su parte *Pseudomonas marginalis* (Ls-1) la presentó a los 90 mgmL<sup>-1</sup>.

## CAPITULO VI

### RECOMENDACIONES

- *In vivo*, el efecto fungicida de los extractos vegetales varia en función de la metodología de preparación, especie botánica, órgano de la planta o fecha de cosecha (Hernández *et al.*, 2007), por lo cual se recomienda la continuación del estudio al realizar la prueba *in vivo* y determinar así el comportamiento del extracto así como la interacción de éste no sólo con el patógeno sino también con la planta huésped.
- Realizar pruebas de toxicidad y así determinar si el extracto afecta la microbiota edáfica benéfica con la cual interacciona la especie huésped.

LITERATURA CITADA

- Abdala, L. R. (1999). Flavonoids of the Aerial Parts from *Tagetes lucida* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 27(7): 753-754
- Agrios, G. N. (1996). *Fitopatología*. 2da ed. UTEHA Noriega Editores. D. F., México.
- Alfaro, T; M. Chalala; C. Rodríguez; R. Ramos; C. Carballo y C. Cabeza. (2000). Lavado y desinfección de drogas vegetales. Normas Técnicas. Procesos Tecnológicos (Proyecto). Departamento de Control Microbiológico del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamento.
- Anónimo. (1988). *Desarrollo y Control de las Enfermedades de las Plantas. Control de Plagas de Plantas y Animales*. Vol. 1. Editorial Limusa. National Academy of Sciences. D. F., México.
- Bicchi C.; M. Fresia; P. Rubiolo; D. Monti; C. Franz e I. Goehler. (1997). Constituents of *Tagetes lucida* Cav. ssp. *lucida* essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*. 12(1): 47-52
- Celeste, L. M.; Marcelo G. (2008). Manual de Procedimientos Sensibilidad a los antimicrobianos en *Campylobacter* spp. Dto. Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán" Centro Regional de Referencia WHO-Global Salm Surv para América del Sur.
- Cervantes, S. A., Marquez, S. M. J. y Rivera, G. P. (2006). *Análisis Estadístico. Un enfoque práctico con Statgraphics*. FES-Z. UNAM. México.
- Céspedes, C.; G. Ávila; A. Martínez; B. Serrato; J. Calderón-Mugica; R. Salgado-Garciglia. (2006). Antifungal and Antibacterial Activities of Mexican Tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(10): 3521-3527.
- Ciccío, J. F. (2005). A source of almost pure methyl chavicol: volatile oil from the aerial parts of *Tagetes lucida* (Asteraceae) cultivated in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 52(4): 853-857.

Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 10: 564-582.

Croteau, R.; T. M. Kutchan; N. G. Lewis. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, USA.

De la Cruz, B. C. (2005). Caracterización de cinco extractos de plantas medicinales nativas de Guatemala, validadas científicamente. Informe de Tesis, Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

De la Isla, L. (1994). *Fitopatología*. Colegio de Postgraduados. UTEHA Noriega Editores. Edo. Méx., México.

Delgadillo, S. F.; E. Z. Mejía; S. O. Kawasoe; A. A. Velenzuela; V. G. Hernández; D. N. Angel e I. T. Pacheco. (2002). Densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* Berk. y su control mediante tebuconazole en ajo (*Allium sativum* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana*. 25(4): 349-354.

Dickinson, C. H.; J. A. Lucas. (1987). *Patología vegetal y patógenos de plantas*. Editorial Limusa. México.

Donoso, A. y B. Latorre. (2006). Caracterización del moho azul causado por *Penicillium* spp. en uva de mesa almacenada en frío. *Ciencia e Investigación Agraria*. 33(2): 143-155.

Evan, E. (1973). *Enfermedades de las plantas y su control químico*. Editorial Labor, S. A. Barcelona, España.

Evans, W. C.; G. E. Trease. (1991). *Farmacognosia*. 13ra ed. Editorial Interamericana McGraw-Hill.

García, A. M. (1994). *Patología Vegetal Práctica*. 2da edición. Editorial Limusa. D.F. México.

García, R. (2000). Especies y Sub-especies de *Erwinia*, causantes de pudrición blanda y pierna negra en la papa cultivada, en el estado Mérida-Venezuela. *Revista Forestal Venezolana*. 44: 107-114.

Garduño, Y. (2007). Efecto de *Tagetes lucida* Cav. como antimicrobiano sobre diversos patógenos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. D. F., México.

Gaspari, J. F.; S. Virtuoso; A. Davet; M. Cunico; M. Marilis; M. Obdúlio; C. Auer; A. Grigoletti-Junior; A. Oliveira; M. Ferronato (2006). Actividade antibacteriana e antifúngica de extratos etanolicos de *Aster lanceolatus* Hill., Asteraceas. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 16: 83-87

González, M. L. (1985). Introducción a la Fitopatología. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Costa Rica.

Granados, M. (2005). Pudrición blanda de la cebolla: Una enfermedad difícil de combatir. Agronomía Costarricense. 92(2):143-156.

Granados, M. y A. Wang. (2005). Aislamiento e identificación de hongos asociados a esclerocios de *Sclerotium cepivorum*, causante de la pudrición blanda de la cebolla, en la zona alta de Cartago, Costa Rica. Agronomía Costarricense 29(1): 57-66.

Harvey, A. (2000). Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. Drug Discovery Today. 5(7): 294-300.

Hernández, Y. y G. Trujillo. (2004). Relaciones serológicas entre aislamientos bacterianos de los géneros *Erwinia*, *Pectobacterium* y *Pantoea*. Interciencia. 29(8): 1-7

Hernández, T.; M. Canales; C. Flores; A. M. García; A. Durán y J. G. Avila. (2006). Antimicrobial Activity of *Tagetes lucida*. Internacional Journal of Pharmacognosy. 44(1): 19-22

Hernández, L. A., S. Bautista, G. Velázquez del Valle. (2007). Prospectiva de Extractos Vegetales para Controlar Enfermedades Postcosecha Hortofrutícolas. Revista Fitotecnia Mexicana. 30(2): 119-123.

Jauch, C. (1985). Patología Vegetal. 3ra ed. Editorial El Ateneo. Argentina.

Jiménez, C. (1999). Los medios de cultivo en laboratorio. *Revista Biomédica*. 10: 103-106

Judd, W. S.; C. S. Campbell; E. A. Kellogg; P.F. Stevens; M. J Donoghue. (2002). *Plant Systematics: a Phylogenetic Approach*. 2nd edition. Sinauer Associates, USA.

Koneman, M. y W. Elmer. (1999). *Diagnostico microbiológico*. 5ta ed, Editorial Médica Panamericana. Argentina.

Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia*. Editorial Omega. Barcelona, España.

Kunstmann, J. P.; L. Ciampi; L. Böhm; S. Barrera y L. Collado. (2006). Determinación de especies de *Erwinia* (grupo *carotovora*) como agentes causales de "Putridión blanda" en *Cala* (*Zantedeschia* spp.). *Agricultura Técnica*. 66(3): 247-255.

Levin, D. A. (1976). "The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores". *Ann Rev. Ecol. Syst.* 7: 121-159.

Linares, M. E. (1996). *Selección de Plantas Medicinales de México*. 5ta reimpresión. Editorial Limusa Noriega, Editores México S. A. México.

Lock, O. (1994). *Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales*. PUCP. Lima, Perú.

Luna, M. F.; A. F. Martínez; P. P. Noyola. (2003). Caracterización molecular de aislados de *Sclerotium cepivorum* mediante análisis del polimorfismo de los fragmentos amplificados al azar. *Elementos* 49: 53-59.

Maldonado, A. B.; A. Ortiz; O. Dorado. (2004). *Preparados Galénicos e Imágenes de Plantas Medicinales*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Centro de Educación Ambiental e Investigación Sierra de Huautla, Morelos. CONABIO. México.

Mansilla, V. J. y A. V. Argibay. (1999). Presencia de *Pseudomona marginalis* y *P. viridiflava* sobre Kiwi en Galicia. *Boletín Sanidad Vegetal*. 25: 175-180

Martínez, M. (1967). *Las Plantas Medicinales de México*. 6ta ed. Editorial Botas, S.A. México.

Martínez, M. (1994). Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. 3ra ed. Fondo de Cultura Económica. México.

Mayea, S. y H. Sánchez. 1995. Resistencia de 10 cultivares de papa. Cuaderno de Fitopatología. 45: 45-49

Meier, G. (2005). Sales de Sodio como Alternativas a los Fungicidas Tradicionales para el Control del Moho Verde y Moho Azul. Actas del II Seminario Internacional de Post-Cosecha de Cítricos. ISBN: 13: 978-987

Meier, G. y M. Cocco. (2006). Medidas de control para podredumbres provocadas por *Penicillium* spp. Combinación de distintas alternativas. Seminario Internacional de Postcosecha de Cítricos. Concordia, Entre Ríos, Argentina.

Mendoza, C. B.; M. N. Moreno; M. Weil; F. Elango. (2007). Evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento *in Vitro* de *Phytophthora palmivora* Butl. y *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. Revista Tierra tropical. 3: 81-89

Miranda, R. (2000). Técnicas Básicas para la Experimentación en Química Orgánica. UNAM, México.

Moreno, B. y R. Acebedo. (2002). Caracterización patogénica y estudio de los grupos de compatibilidad micelial en *Sclerotium cepivorum* Berk. Revista Iberoamericana de Micología. 19: 115-119

Müller-Riebau F., Berger B., Yegen O. (1995). Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 43: 2262-2266.

Olivas, S. M. (1999). Plantas medicinales del Estado de Chihuahua. Vol. 1. Universidad Autónoma de Chihuahua. Editorial UACJ. México.

Orellana, P. A. (2002). Propagación del Pericón. Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas. Villa Nueva, Guatemala.

Purdy, L. H. (1979). *Sclerotinia sclerotiorum*, la historia, las enfermedades y sintomatología, gama de huéspedes, distribución geográfica, y el impacto. *Phytopathology* 69: 875-880.

Ramírez, G. M., A. Neira y L. Correa. (2007). Actividad antimicrobiana, conservante y obtención de un colorante natural a partir de plantas de la región de Boyacá. *Scientia Et Técnica*, Año XIII, 33: 415-417. Pereira, Colombia.

Roberts, A., C. Boothroyd. (1978). *Fundamentos de Patología Vegetal*. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

Rodríguez, A. T., D. Morales y M. A. Ramírez. (2000). Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento *In vitro* de hongos fitopatógenos. *Cultivos tropicales*. 21(2) :79-82. La Habana, Cuba.

Rzedowski, G. C. de, J. Rzedowski. (2001). *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2da ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.

Serrato, C. M., B. Reyes, L. Ortega, A. Domingo, N. Gómez, F. López, M. Sánchez, L. Carvajal. (2003). Anisillo (*Tagetes filifolia* Lag.): Recurso Genético Mexicano para controlar la Mosquita Blanca (*Bemisia* sp. y *Trialurodes* sp.). *Revista del Jardín Botánico Nacional*. 24(1-2): 65-70.

Smith, I. M. (1992). *Manual de las enfermedades de las plantas*. Mundi-Prensa Libros.

Steadman, J. R. (1979). Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69: 904-907

Swain, T. (1973). "Chemistry in evolution and systematics". Butterworth, Londres.

Taiz, L. y Eduardo Z. (2006). *Plant Physiology*. 4th edition. Sinauer Associates, Inc.

Trease, G. (1987). *Tratado de Farmacognosia*. Editorial Interamericana. D. F., México.



Tu, J. C. (1997). An integrated control of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) of beans, with emphasis on recent advances in biological control. Botanical Bulletin of Academia Sinica. 38: 73-76

Tyler, V. E. (1979). Farmacognosia. 2da ed. El Ateneo Editorial. Buenos Aires, Argentina.

Usall, J., Plaza, P., Palou, L., Torres, R., Teixidó, N., Abadías, M., Smilanick, J. y Viñas, I. (2005). Control de las principales enfermedades de postcosecha de cítricos mediante métodos físicos, químicos y biológicos. Actas del II Seminario Internacional de post-Cosecha de Cítricos. ISBN. 13: 978-987

Vasinauskiene, M., Radusiene, J., Zitikaite, I. y Surviliene, E. (2006). Antibacterial activities of essential oils from aromatic and medicinal plants against growth of phytopathogenic bacteria. Agronomy Research 4: 437-440.

Yarden, O., Y. Ben-Yephet, J. Katan, and N. Aharonson. (1986). Fungicidal control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil with a combination of benomyl and thiram. Plant Disease. 70: 738-742

## **LITERATURA ELECTRONICA**

CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). Vibrans, H. (2005). Malezas de México, Ficha-*Tagetes lucida* Cav. (en línea). Consultado el 18 de agosto de 2008.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). (2004). El futuro de la agricultura depende de la biodiversidad (en línea). Consultado el 07 de abril 2008. Disponible en <http://www.fao.org/newsroom/es/focus/2004/51102/index.html>

Guevara, Y.; A. Maselli y C. Sánchez. (2000). Efecto de extractos vegetales sobre bacterias fitopatógenas. (en línea) Revista Manejo Integrado de Plagas. 56. Consultado el 07 de septiembre 2008. Disponible en [web.catie.ac.cr/informacion/rmip/rmip56/art4-a.htm](http://web.catie.ac.cr/informacion/rmip/rmip56/art4-a.htm)

Hermosillo-Gómez, A. E., Muñoz-Sánchez, C. I., Guevara-González, R.G. y L. Guevara-Olvera. Análisis molecular del gen ornitina descarboxilasa (Sc ODC) en la patogénesis de *Sclerotium cepivorum* en ajo (*Allium sativum*). (en línea). Consultado el 08 de agosto de 2008. Disponible en <http://www.itc.mx/educacion/maestrias/bioquimica/Cartel/GuevaraOlveraLorenzo/HermosilloGomezAElisa.htm>

Serrato, C. M. A. (2003). Efectos del ambiente de domesticación en dos especies silvestres del género *Tagetes* en México (en línea). Consultado el 27 de mayo de 2008. Disponible en [http://www.biodiversityinternational.org/publications/pgrnewsletter/article.asp?id\\_article=3&id\\_issue=142](http://www.biodiversityinternational.org/publications/pgrnewsletter/article.asp?id_article=3&id_issue=142)