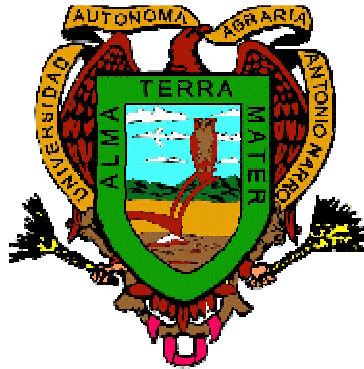


UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISION DE AGRONOMIA



**EFFECTO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Larrea tridentata* (Sesse & Moc ex DC, Coville) CONTRA LAS BACTERIAS *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora***

POR:

**OLIVIA OLIVAR VILLALDAMA**

TESIS DE LICENCIATURA

Presentada como Requisito Parcial Para Obtener el Título De:

**INGENIERO EN AGROBIOLOGIA**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Marzo de 2009.

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISION DE AGRONOMIA

**EFFECTO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Larrea tridentata* (Sesse & Moc. ex DC, Coville) CONTRA LAS BACTERIAS *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora***

TESIS

Presentada por:

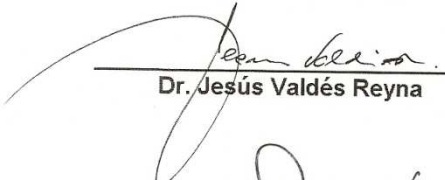
**OLIVIA OLIVAR VILLALDAMA**

Que somete a consideración del H. Jurado examinador como requisito para obtener el título de:

**INGENIERO EN AGROBIOLOGIA**

**APROBADO**


Presidente del jurado

  
Dr. Jesús Valdés Reyna

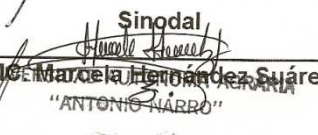
Asesor Principal Externo  
(CIDA)

  
Dr. Ricardo Hugo Lira Saldivar

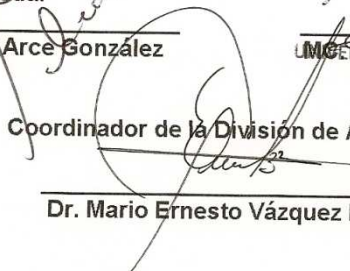
Sinodal

  
MC. Leopoldo Arce González

Sinodal

  
MC. Marcela Hernández Suárez  
"ANTONIO NARRO"

Coordinador de la División de Agronomía

  
Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, Marzo de 2009  
División de Agronomía  
Coordinación.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	
<b>DEDICATORIA.....</b>	
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>3</b>
Hipótesis.....	6
Objetivo General.....	6
Objetivos Específicos.....	6
<b>REVISION DE LITERATURA</b>	
Generalidades de la gobernadora ( <i>Larrea tridentata</i> ) .....	7
Distribución geográfica.....	8
Clasificación taxonómica.....	9
Descripción Botánica.....	10
Constituyentes Fitoquímicos de la resina.....	11
Propiedades Antibacteriales y antifúngicas de <i>Larrea tridentata</i> .....	14
Usos y aplicaciones.....	17
<b>GENERALIDADES DE LAS BACTERIAS FITOPATOGENAS</b>	
Importancia.....	18
Morfología General.....	19
Mantenimiento y diseminación.....	19
Clasificación.....	20
Sintomatología.....	21
<b><i>Xanthomona axonopodis. pv. phaseoli (Xap)</i></b>	
Importancia económica.....	22
Morfología.....	23

Medio de dispersión .....	23
Sintomatología.....	23
Distribución geográfica.....	24

### ***Clavibacter michiganensis Subsp michiganensis (Cmm)***

Importancia económica.....	24
Morfología.....	25
Medio de dispersión.....	25
Sintomatología y sobrevivencia.....	25
Distribución geográfica.....	26

### ***Erwinia carotovora Subsp carotovora (Ecc)***

Importancia económica.....	27
Morfología y distribución geográfica.....	27
Dispersión y factores favorables.....	27
Sintomatología y sobrevivencia.....	28
Manejo integrado y tratamiento químico.....	29

## **MATERIALES Y METODOS**

Localización del área de experimento.....	30
Colecta del follaje de gobernadora .....	30
Secado del material vegetativo .....	30
Obtención del material biológico (patógeno).....	31
Preparación de los tratamientos de <i>Larrea tridentata</i> .....	31
Preparación de los medios de cultivo.....	32
Técnica de Medio Envenenado .....	32
Técnica de Difusión en Discos.....	32
Técnica de Diluciones Dobles Seriadas .....	33

Siembra de las bacterias Fitopatógenas.....	26
---------------------------------------------	----

## **RESULTADOS Y DISCUSIONES**

Actividad Antibacterial del extracto de <i>Larrea tridentata</i> en las tres técnicas evaluadas para <i>Xanthomona axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> ( <i>Xap</i> ).....	35
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Efecto del extracto metanólico en la inhibición de la bacteria <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ( <i>Cmm</i> ).....	38
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Efecto del extracto metanólico en la inhibición de la bacteria <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> ( <i>Ecc</i> ).....	42
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>CONCLUSIONES</b> .....	47
---------------------------	----

<b>LITERATURA CITADA</b> .....	48
--------------------------------	----

Nota: El formato para las citas bibliográficas se tomó en base al formato utilizado en Oxford Journals.

## RESUMEN

En la agricultura moderna, se ha soslayado la sustentabilidad de la producción agrícola, ya que el uso de agroquímicos sintéticos ha permitido obtener incrementos sustanciales en la producción; no obstante, sus efectos adversos están impactando de manera significativa la sustentabilidad de la agricultura. La contaminación ambiental por el uso indiscriminado de pesticidas ha reducido la biodiversidad de los agroecosistemas causando una mayor incidencia de plagas y enfermedades en los cultivos, así como en humanos y animales.

Debido a lo antes señalado en este trabajo de investigación se utilizó el extracto resinoso obtenido del follaje del arbusto de gobernadora (*Larrea tridentata*); el cual se encuentra cubriendo extensivamente los desiertos Chihuahuense, Sonorense y Mojave de las zonas áridas del norte de México y suroeste de Estados Unidos. Las hojas de este arbusto contienen numerosos metabolitos secundarios o fitomoléculas como lignanos, flavonoides, cateoles, terpenos, etc., con importante actividad contra numerosos microorganismos causantes de enfermedades en humanos y plantas cultivadas; por lo tanto, esta especie vegetal resulta ser muy promisoría para el desarrollo de biocompuestos con gran potencial para la agricultura sustentable y orgánica.

Pocos trabajos existen en la literatura que pongan de manifiesto el potencial antibacterial de extractos vegetales en general y de *L. tridentata* en particular, por esa razón se realizó una serie de bioensayos con la finalidad de determinar *in vitro* la acción antibacterial de un extracto metanólico de gobernadora contra tres bacterias (*Xanthomona axonopodis* pv. *phaseoli*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, y *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) causantes de graves enfermedades de gran importancia económica en numerosos cultivos hortícolas y básicos que se siembran en México y en todo el mundo.

Además, con la finalidad de corroborar la efectividad antibacterial del extracto antes mencionado, se evaluaron tres técnicas microbiológicas (medio envenenado, diluciones dobles seriadas y difusión en discos) específicas para bacterias. Habiendo determinado la concentración mínima inhibitoria (CMI) con la técnica de diluciones dobles seriadas, considerándola, por tanto, como la técnica adecuada para la obtención de este parámetro. Los tratamientos aplicados estuvieron en el rango de 0 ppm (testigo absoluto) hasta 16,000 ppm teniendo dosis intermedias que siguieron una progresión exponencial; además se utilizó un testigo químico que fue el bactericida comercial llamado Farmicina Plus, a la concentración de 80,000 ppm que es la dosis recomendada por el fabricante.

Los resultados de los bioensayos generados con las tres técnicas microbiológicas claramente demostraron el efecto inhibitorio en el crecimiento *in vitro* de las tres bacterias fitopatógenas. Por ejemplo, en la bacteria *C. michiganensis* Subsp. *michiganensis* la

relativamente baja dosis de 2,000 ppm en la técnica de medio envenenado se apreció visiblemente el efecto bacteriostático contra esta cepa; sin embargo, con la técnica de diluciones dobles seriadas al aplicar la dosis de 11,610 ppm, se detectó un efecto bactericida en esta misma bacteria. Esto pone de manifiesto la actividad antibacterial del extracto de *L. tridentata*. Se debe señalar que de las tres bacterias estudiadas la antes mencionada resultó ser la más susceptible al efecto del extracto fitoquímico; mientras que la más tolerante fue *X. axnopoulos pv phaseoli*, ya que se requirió la concentración de 16,000 ppm para lograr inhibirla y encontrar la CMB, con la técnica de dilución doble seriada. Esto nos indica que existen marcadas diferencias entre las técnicas microbiológicas utilizadas, así como entre las bacterias fitopatógenas estudiadas; pero se señala claramente la actividad antibacterial del extracto resinoso de gobernadora.

Estos resultados preliminares muestran también que los extractos de *L. tridentata* pueden tener un buen potencial para emplearse en programas de manejo sustentable de cultivos agrícolas, o bien para incorporarlos en paquetes tecnológicos de agricultura orgánica y de bajo impacto ambiental. Es importante que estos resultados sean corroborados bajo condiciones de invernadero y en cultivos sembrados a campo abierto antes de que puedan hacerse recomendaciones para el uso de los extractos de esta especie endémica de las zonas áridas.

**PALABRAS CLAVE:** Bacterias fitopatógenas, control biológico, extractos botánicos, Agricultura sustentable.

## INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, las bacterias fitopatógenas ocupan un segundo lugar después de los hongos de importancia económica, ya que son los agentes causales bióticos de enfermedades en plantas. Desde el punto de vista agronómico los problemas que pueden ocasionar estos organismos implican desde pérdidas en el rendimiento hasta pérdidas en la comercialización. La enfermedades bacterianas que se presentan en las plantas pueden ser; vasculares, parénquimáticas e hiperplásticas, provocando pudriciones, tumores, agallas y tizones foliares. Estas bacterias pueden afectar los canales que conducen el agua en las plantas, los cuales por medio de toxinas, presentan síntomas de marchitamiento, a consecuencia de esto la planta se enferma y puede llegar a provocar la muerte (Pérez y Gepp, 2005).

Existen más de 200 especies de bacterias patógenas que pertenecen a los siete géneros: *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Agrobacterium* y *Corynebacterium*, los cuales se diseminan por la acción combinada de insectos, lluvia, viento y el hombre. Estas bacterias invaden cualquier parte de la planta, por medio de la secreción de sustancias reguladoras de crecimiento como auxinas y por la presencia de toxinas; provocando excesivamente proliferación de tejidos (tumores) y marchitamiento. (<http://146.83.41.79/pforestal/files/BACTERIAS.doc>).

El uso de bactericidas tradicionales empleados para el control de estas y otras enfermedades ha tenido graves consecuencias en la salud humana y en el medio ambiente, así como el desarrollo de resistencia por los fitopatógenos a estos productos sintéticos; lo que ha ocasionado un inevitable incremento en las dosis empleadas para su control y en la contaminación ambiental (Baker *et al.*, 2002).

Una alternativa lo constituyen los pesticidas orgánicos, ya que estos son biodegradables y desaparecen rápidamente del medio ambiente al ser aplicados en el campo, el problema fundamental no será la falta de demanda sino una oferta insuficiente de bioproductos de bajo impacto ambiental (Hernández, 2005).



Los extractos de plantas con propiedades antimicrobianas han venido recibiendo una renovada atención en los últimos años, debido a presiones sociales de gobiernos de países y de agencias no gubernamentales que demandan el uso de productos que promuevan una agricultura sustentable. México ha probado y validado *in vitro* e *in vivo* en diferentes cultivos agrícolas, mediante el uso de productos de origen vegetal para contribuir a la sustitución de agroquímicos sintéticos, haciendo una producción de alimentos con bajos residuos de pesticidas (Wedge, *et al.*, 2003).

Una alternativa lo constituyen los pesticidas orgánicos, ya que estos son biodegradables y desaparecen rápidamente del medio ambiente al ser aplicados en el campo, el problema fundamental no será la falta de demanda sino una oferta insuficiente de bioproductos de bajo impacto ambiental (Hernández, 2005).

Por otra parte, la mayoría de los pesticidas orgánicos e inorgánicos son importados a nuestro país, siendo la fuga de divisas y dependencia extranjera bastante significativa, a pesar de que es factible desarrollar y producir agroquímicos orgánicos de bajo impacto ambiental con productos derivados de plantas, los cuales tienen un enorme potencial y que hasta la fecha son poco aprovechados (Rodríguez, 2000).

*Larrea tridentata*, mejor conocida como gobernadora, es un arbusto perenne del desierto Chihuahuense, Sonorense y Mojave, tiene en sus hojas una capa gruesa de resina que puede llegar a formar parte del 20% del peso seco de las hojas o más. Esta resina metabolitos secundarios como fenoles y el ácido nordihidroguaiaretico que es considerado como el ingrediente activo; estos compuestos resultan ser defensas bioquímicas para repeler el ataque de animales herbívoros, hongos y bacterias fitopatógenas.

Numerosos estudios han demostrado que los extractos de esta planta tienen acción antifúngica y antibacterial bajo condiciones *in vitro* en al menos 17 hongos fitopatógenos y bacterias de importancia económica. Algunos bioensayos con microorganismos que atacan a humanos han indicado que más de 45 bacterias son susceptibles a la resina de *L. tridentata* conocida como gobernadora (Lira, 2003).

Por lo antes mencionado, el uso de extractos de *L. tridentata* representan una alternativa viable para ser evaluados y así reducir la utilización de productos químicos en el control de fitopatógenos de algunos cultivos de suma importancia. Debido a lo anterior en esta investigación se planteó la siguiente hipótesis:

## HIPOTESIS

Los extractos de *Larrea tridentata* tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de las bacterias *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Clavibacter michiganensis* Subsp. *michiganensis* y *Erwinia carotovora* Subsp *carotovora*.

## OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto bactericida *in vitro* de *L. tridentata* contra tres bacterias fitopatógenas

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la Concentración Mínima Bactericida (CMB) y la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), del extracto de *L. tridentata* contra las bacterias Fitopatógenas
- Determinar mediante tres diferentes técnicas: medio envenenado, difusión en discos y diluciones dobles seriadas, se ajusta mas para la determinación del efecto bactericida *in vitro* del extracto de *L. tridentata* contra las bacterias *Xanthomona axonopodis* pv. *phaseoli*, *Clavibacter michiganensis* Subsp. *Michiganensis* y *Erwinia carotovora* Subsp *carotovora*..

## REVISION DE LITERATURA

### Generalidades de la gobernadora (*Larrea tridentata*)

Las zonas áridas son hábitat de condiciones extremas, en la cual la flora y la fauna poseen características fisiológicas de adaptación para su sobrevivencia; un caso típico de estas condiciones lo representa la gobernadora (*Larrea. Tridentata* ) de la familia de Zygophyllaceae, la cual es considerada una planta dominante en el desierto (Barbour, 1969)

La gobernadora es la especie más ampliamente distribuida en las zonas áridas de los desiertos de Mojave, Sonorense y Chihuahuense (Barbour, 1969). Comúnmente se le conoce en México como sonora, tasajo, hediondilla por el peculiar olor que tiene, sobre todo después de una lluvia (Brinker, 1993). Las hojas de este arbusto xerófilo están envueltas en una gruesa capa de resina que es producida por tricomas glandulares durante el desarrollo de las hojas y puede llegar a formar parte del 20% del peso seco de las hojas (Rhoades, 1977) o más (Lira, *et al.*, 2003). La resina tiene la propiedad de hacer menos digestivo el follaje, de manera similar al efecto que producen los taninos (Rhoades, 1977), también se comporta como un antitranspirante debido a que forma una barrera en la superficie de las hojas lo cual provoca una disminución de transpiración que la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> (Meinze *et al.*, 1990; González *et al.*, 1994).

Se considera que la resina funciona como un filtro contra la radiación solar UV, y protege a la planta contra herbivorismo de insectos y animales (Barbour *et al.*, 1977; Downum *et al.*, 1988). Los arbustos de *L. tridentata* enfrentan fuertes presiones de los animales herbívoros, debido a que las hojas están siempre verdes durante los meses del año sin lluvia, época en que son pocos los recursos vegetales que pueden encontrar insectos y animales,

probablemente debido a los metabolitos secundarios, como los biopolímeros fenólicos y ácido nordihidroguaiaretico (NDGA), que se encuentran presentes en la resina producida en hojas y tallos, los cuales resultan ser defensas bioquímicas para repeler el ataque de animales herbívoros, hongos, bacterias y otros microorganismo (Vales *et al.*,1972; Wisdow *et al.*, 1987; Rundel *et al.*, 1994)

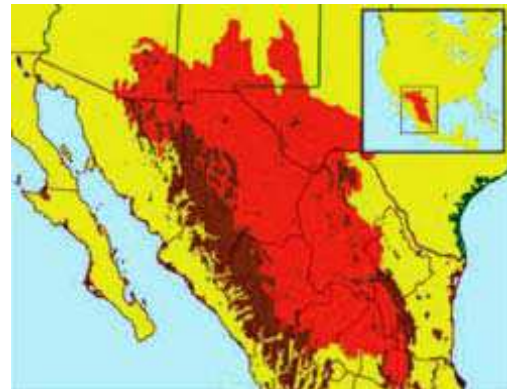
El ganado no consume normalmente el follaje de esta planta (Kearney y Pebbles, 1951; Zamora, 1988), pero puede hacerlo si se remueve la resina, ya que es una fuente excelente de proteína, comparable a la alfalfa (Duisberg, 1952)

### **Distribución geográfica**

*Larrea. tridentata* se distribuye como planta dominante en aproximadamente 17.5 millones de hectáreas, desde el oeste de Texas hasta el Sur de California en Estados Unidos (Duisberg, 1952). Su distribución en el desierto de Mojave va desde la parte Sur de California y Nevada a la parte central de Arizona y Nuevo México, limitado por heladas invernales o lluvia excesiva en invierno. En la República Mexicana la gobernadora se encuentra en parte del desierto Sonorense, incluyendo los estados de Baja California Norte, Baja California Sur hasta Sonora; y en el desierto Chihuahuense incluyendo los estados de Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Zacatecas, San Luís Potosí y Durango. Se estima que el 25% del territorio Nacional esta cubierto con este arbusto de las zonas áridas (Lira-Saldivar, 2003)



(a)



(b)

**Figura 1.** Representación esquemática de las áreas de los desiertos Sonorense (a) y Chihuahuense (b), donde se encuentran poblaciones naturales de *Larrea tridentata* en el norte de México y sur de Estados Unidos.

Este arbusto xerófilo está presente en planicies secas y mesas, habitando colinas y declives y en varios tipos de suelos, excepto arcillosos, salinos o graníticos (Shreve y Wiggins, 1964). Sus poblaciones están ampliamente distribuidas en áreas generalmente consideradas como improductivas, han contribuido hacer estudios de su potencial valor como alimento para ganado.

**Clasificación Taxonómica de *Larrea tridentata* (Cronquist, 1981).**

Reino: ---Plantae  
 División: ----Magnoliophyta  
 Clase: -----Magnoliopsida  
 Subclase: -----Dilleniidae  
 Orden: -----Sapindeles  
 Familia: -----Zygophyllaceae  
 Género: -----*Larrea*  
 Especie: -----*tridentata* (Sesse & Moc. ex D.C. Coville)

## Descripción Botánica

*Larrea tridentata* es un arbusto perenne, xerófilo, siempre verde ecológicamente. Su edad puede exceder a los 100 años, aunque algunas plantas pueden sobrevivir cientos o miles de años a través de reproducción vegetativa asexual, ya que las raíces producen brotes o retoños que después se convierten en nuevas plantas (Barbour, *et al.*,1977). La edad se determina por el tamaño de la corona radicular, la raíz crece solo cerca de 170 cm hacia abajo, pero se ramifica hasta más de 4 metros lateralmente (Brinker, 1993). El tamaño de la planta varía de 0.5 a 4 m de altura dependiendo de la lluvia de invierno o verano, no hay un tallo principal, pero las ramas gruesas crecen vertical u oblicuamente desde la corona radicular y se hace dicotómica lateralmente (Coyle y Roberts, 1975).

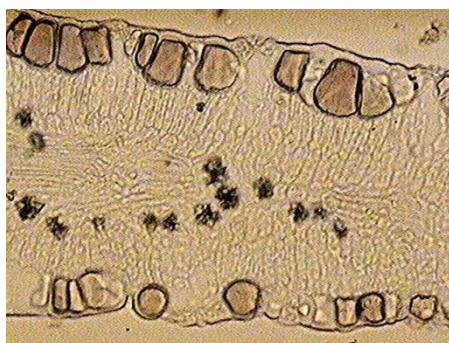
Las hojas son pequeñas y bifoliadas, de un color verde oscuro a verde amarillento, con cutículas gruesas y una capa resinosa; tiene pecíolos cortos y crecen opuestas en las ramas. Las flores son de color amarillo, con cinco pétalos, usualmente aparecen al final del invierno o a principios de primavera, pero pueden florecer en cualquier momento después de una lluvia; crecen cerca de las terminaciones de los retoños jóvenes. Los frutos son pequeños (4 a 7 mm de diámetro), tienen una cubierta vellosa (Figura 2) y contienen cinco semillas, las cuales son transportadas por el viento y la lluvia (Shreve y Wiggins, 1964; Coyle y Roberts, 1975).



**Figura 2.** Follaje de un arbusto de *L. tridentata* donde se aprecian algunas características distintivas de las hojas bifoliadas, flores y los frutos con su cubierta vellosa.

## Constituyentes fitoquímicos de la resina

Los principales compuestos de la resina de *L. tridentata* que han sido reportados hasta ahora son muy numerosos, sin embargo, un resumen de los más importantes se presentan en el cuadro 1. En la resina de la gobernadora destacan los lignanos fenólicos por su mayor contenido en base al peso seco del follaje, seguidos por flavonoides, saponinas, aminoácidos y minerales que se encuentran en la resina producida en las células cercanas a la epidermis superior e inferior de las hojas.



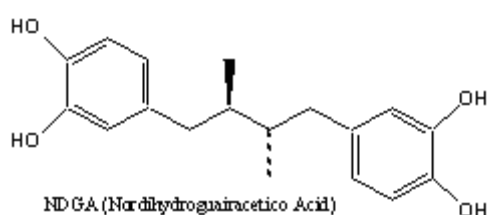
**Figura 3.** Corte transversal de un foliolo de *L. tridentata* que muestra la resina contenida en las células epidermales del haz y envés (Tomado de Lira-Saldivar, 2003).



**Cuadro1.** Principales constituyentes fitoquímicos de *L. tridentata* (Brinker, 1993)

<b>Peso seco (%)</b>	<b>Tipo</b>	<b>Compuesto</b>
16-21	Lignanos fenólicos	Ácido Dihidroguaiarético Hemi-nosisoguaiarético Acido norhidroguairético Nordihidroguaiacin
5-7.5	Flavonoides	Apigenin Kaempferol
10-15	Saponinas Triterpenos	Larreagenin A Acido Larreico
0.1-0.2	Monoterpenos Volátiles Hidrocarbonos 35 Aromáticos	Alpha penene Delta-3-carene Limoneno Benzaldheido
	Esteroides	Benzilacetato Belzilbutano Metilo naftaleno Beta-sitosterol Colesterol Campesterol
	Taninos Carbohidratos	Glucosa Sucrosa
70.1 (de tallos)	Lípidos Aminoácidos	Alfil esteres Fenilalanina Isoleucina Ácido glutámico, Acido aspartico Glicina
	Vitaminas	
15.6 mg/lb 19.8 mg/100 g		Caroteno Vitamina C
13.7	Minerales	Sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro Azufre y fósforo

El compuesto más importante que se encuentra en la resina de la células cercanas a las capas epidermales superior e inferior de las hojas y tallos es el ácido nordihidroguaiarético (NDGA) uno de los antioxidantes orgánicos mejor conocido (Seigler *et al.*, 1974). Se ha determinado que el NDGA (Figura 4) tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorio, citotóxico, antimicrobial e inhibidor de enzimas (Fernández, *et al.*, 1979; Brinker, 1993). Este antioxidante se presenta en todas las especies de *Larrea*. El ácido también se considera que es un repelente de herbívoros (Rundel *et al.*, 1994).



**Figura 4.** Estructura química del ácido nordihidroguaiarético (NDGA).

La concentración de NDGA es de alrededor del 50% de la resina que forma parte de un 10 a 15% del peso seco de las hojas (Sakakibara *et al.*, 1976). También hay más de 20 flavonoides metil aglyconas que constituyen la otra mitad de la resina. Los posibles efectos de todos los diferentes flavonoides y otros constituyentes son numerosos y variados. Los efectos combinados de *L. tridentata* de estos constituyentes apunta a un sinergismo que amplía el efecto del compuesto activo primario (NDGA), esto sugiere usar un extracto de la estructura entera hojas/ramas en comparación con usar una preparación de NDGA purificado sintetizado (Lira, 2003)

Las hojas son muy importantes como una fuente potencial de fitomoléculas bioactivas que pueden ser empleadas en programas de agricultura sustentable u orgánica y además por el contenido de proteínas, semejante a la alfalfa (Zamora, 1988), lo que permite utilizarlas para consumo animal, pero se requiere que la resina sea removida para incrementar su

digestibilidad y palatabilidad; sin embargo, este procedimiento resulta ser muy costoso, lo cual lo hace inviable desde el punto de vista económico.

### **Propiedades antibacteriales y antifúngicas de *Larrea tridentata***

Numerosos estudios han demostrado que los extractos de gobernadora tienen acción contra bacterias causantes de infecciones severas en humanos como son; *Esterichia. coli*, *Candida albicans* (Barajas *et al* 2007 y Morales, 2008). Los compuestos fitoquímicos presentes en la resina de la gobernadora tiene una potente acción antifúngica *in vitro* e *in vivo* contra diversos hongos fitopatógenos de gran importancia económica, incluyendo algunos que han sido señalados en la literatura por tener una gran capacidad metabólica, como son los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*. (Montes *et al.*, 2000)

Posteriormente, otros autores han venido corroborando *in Vitro* las propiedades antifúngicas de la gobernadora, ya sea con productos obtenidos con diferentes extractantes, o bien con material vegetativo seco y molido. Los resultado obtenidos por (Velásquez, 1981) indican que el extracto que mejor efecto manifestó en estudios *in Vitro* fue la fracción etanólica a dosis de 2000 ppm, observando un crecimiento nulo a los 15 días después de la inoculación del hongo *Cytosporina* sp. (Sacc), estado asexual de *Eutypa armeniacae* Hansf. y M.V. Carter agente causal del brazo muerto de la vid; además inhibió la germinación de ascosporas de *E. armeniacae* a la misma dosis, pero con extractos en base a etanol y cloroformo.

Uno de los primeros trabajos sobre el efecto fungicida y/o fungistático de la resina de la gobernadora reporta que al utilizar extractos crudos de cloroformo y etanol los hongos *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp, *Rhizopus nigricans*, fueron controlados *in Vitro*, tanto con el extracto metanólico como con el cloroformo; no fue el caso de *Fusarium oxysporum*, ya que con 1,000 ppm de cada extracto, este hongo solamente se logro controlar en un 76 y 93 %, respectivamente (Fernández *et al.* 1979).

La resina de gobernadora ha probado tener efectos bactericidas y bacteriostáticos a bajas dosis, como lo demuestra el trabajo de Velásquez (1983) al evaluar *in vitro* diversas dosis del extracto etanólico contra las bacterias fitopatógenas *Erwinia amylovora* (Burril), *Erwinia atroseptica* y *Pseudomonas solanacearum* (Smith), sus resultados revelaron que la resina presentó un efecto selectivo contra las tres bacterias evaluadas, al no inhibir aún a dosis de 2,000 ppm el desarrollo de *E. atroseptica* fue relativamente mínimo, no así a dosis relativamente bajas (200, 500 y 1000 ppm), demostrando también excelente acción contra *P. solanacearum* aún a la dosis mínima. También Hernández, 2004) ha demostrado su efecto antifúngico en algunos hongos fitopatógenos de importancia como *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp., *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus* sp., y *Penicillium* sp. entre otros; los cuales fueron inhibidos por este extracto.

Algunos trabajos también han consignado el efecto nematocida o nematostático de *L. tridentata* contra nueve géneros de nematodos y repelencia en insectos, como el gorgojo pardo del frijol *Acanthoscelides obtectus* y el barrenador mayor de los granos (*Prostephanus truncatus*). También se ha demostrado que el extracto de gobernadora tienen un efecto antiviral, indicando que los flavonoides de la resina son activos contra virus que ocasionan varias enfermedades como sida y herpes, puesto que los fitoquímicos de la resina y especialmente el NDGA, afectan en la replicación del RNA (Gnabre, 1995).

Al comparar el efecto de extractos etanólicos de resina de gobernadora obtenida del follaje colectado en los desiertos Chihuahuense (D.Ch.) y Sonorense (D.S.) Balvanti (2001) encontró que el hongo *Pythium pringsh*, fue significativamente inhibido en su desarrollo micelial aun con las dosis mas bajas evaluadas, ya que con 500 ppm se logro una inhibición del 100% con el extracto de D.S., mientras que con esa misma dosis del extracto D.Ch. se redujo el crecimiento en un 70% en comparación con el testigo. En cuanto a los

extractos provenientes del D Ch. se observó un leve crecimiento del micelio con 1000 y 2000 ppm, pero a partir de 4000 ppm fue totalmente inhibido (Angeles, 2004).

En cuanto a los principios activos encontrados en la resina de extracto de gobernadora, diversos autores (Brinker, 1993; Gnabre *et al.*, 1995; Clark, 1999) señalan a los lignanos fenólicos y especialmente al NDGA que solamente es producido por esta planta, como el metabolito secundario que confiere las propiedades biocidas de la gobernadora.

Estudios interpoblacionales de *L. tridentata* realizados en el desierto Sonorense revelaron que las concentraciones de NDGA encontradas en la resina de sus hojas variaron en función de la latitud y de la época del año (Downum *et al.*, 1988) así como con factores ecológicos, ya que la concentración de NDGA puede verse reducida por la contaminación ambiental provocada por concentraciones elevadas del ozono (González *et al.*, 1988)

Actualmente la concentración de NDGA es de alrededor del 50% de la resina que forma parte de un 10 a 15% del peso seco de las hojas (Sakakibara *et al.*, 1976). También hay más de 20 flavonoides metil aglyconas que constituyen la otra mitad de la resina. Los posibles efectos de todos los diferentes flavonoides y otros constituyentes son numerosos y variados. Los efectos combinados *L. tridentata* de estos constituyentes apunta a un sinergismo que amplía el efecto del compuesto activo primario (NDGA), esto sugiere usar un extracto de la estructura entera hojas/ramas en comparación con usar una preparación de NDGA purificado sintetizado (Lira, 2003)

En los resultados antes documentados se advierte que independientemente de los solventes usados (etanol, metanol, cloroformo, diclorometano, acetona, agua, etc.) para la extracción de la resina encontrados

en hojas de este arbusto, la efectividad para inhibir el crecimiento de hongos, bacterias, nematodos es consistente, lo cual no deja dudas sobre la seguridad de sus propiedades antifúngicas.

### **Usos y aplicaciones de *Larrea tridentata***

La tradición cultural de los nativos de cada región o país incluye el uso de plantas para usos medicinales y para el control de plagas y enfermedades. Entre todas las plantas del desierto que reportan con uso medicinal, *Larrea tridentata* o gobernadora es una de las más sobresalientes por que se considera ser útil para todo (Train *et al.*, 1982). El uso de la gobernadora en aspectos medicinales es tan variado que se encuentran reportes de la literatura en los que se documenta utilizarse como: expectorante (Hutchens, 1973 y Train *et al.*, 1982); emético o vomitivo (Zamora, 1984); tónico (Hutchens, 1973); antiparasítico, y para purificar la sangre.

Otros de sus usos era para fines industriales, insecticida y medicinales; este último en afecciones de las vías urinarias como los cálculos renales, dolor de riñón e inflamación de la vejiga, problemas ginecológicos como esterilidad femenina en donde se emplean raíces, corteza y ramas para regularizar la menstruación. Esta infusión es usada también en baños para hemorroides, fiebre, paludismo, golpes y buena cicatrización (CONABIO, 2006).

## GENERALIDADES DE LAS BACTERIAS FITOPATOGÉNAS

### Importancia

Las bacterias son agentes bióticos causales de enfermedades en fitopatógenas, alterando fisiológicamente o morfológicamente a las plantas por organismos microscópicos sumamente pequeños. Se han conocido desde 1882, siendo el grupo más grande de procariontes fitopatógenas, causan pérdidas en rendimiento causadas por enfermedades bacteriales, son a veces difíciles de valorar, debido a condiciones ambientales adecuadas que favorecen el desarrollo de la enfermedad y cuando su manejo es inadecuado la enfermedad destruye completamente al cultivo a consecuencia de esto en ocasiones un cultivo no produce en varia épocas debido al ataque de un patógeno bacteriano que se ha establecido en el campo.

En la naturaleza el número de bacterias formalmente descritas es alrededor de 1600 especies, y se considera que menos de 200 especies son responsables de causar enfermedades en las plantas. (Oku, 1994). Se considera que se han encontrado cerca de 80 especies Fitopatógenas, muchas de la cuales constan de numerosos patovares, que solo difieren a las especies vegetales que ellas infectan.

Las bacterias fitopatógenas están ampliamente distribuidas en la regiones agrícola del mundo, y cuando existen condiciones favorables para su desarrollo provocan pérdidas tan graves que llega a ser catastróficas. Esto se debe a la capacidad de las bacterias en producir sustancias dañinas como enzimas tóxicas u otras que afectan a las plantas cuando son invadidas. (Anaya *et al.*, 1999).por otro lado señala que todos los organismos patógenos adquieren importancia económica cuando sus poblaciones alcanzan niveles epifíticos, en condiciones óptimas las bacterias exhiben un potencial de multiplicación mayor a cualquier otro organismo fitopatógeno ya que se conoce

que una célula bacteriana puede producir en 24 h aproximadamente 17 millones de células. (Sosa *et al.*, 1997)

## **Morfología General**

Las bacterias son organismos unicelulares cuyo tamaño oscila entre 0.3 y 1.0  $\mu\text{m}$  de ancho y 0.6 a 4.5  $\mu\text{m}$  de largo, se reproducen rápidamente, por fisión binaria, no tienen núcleo definido, sino que el material genético está distribuido en el citoplasma, no tiene nucleolo ni experimentan la mitosis típica, pero el material genético se distribuye por partes iguales en las dos células hijas que se forman en cada división, las células carecen de vacuolas. Las bacterias tienen una pared celular, formada por proteínas y carbohidratos, dándole forma definida a la célula. Muchas especies tienen flagelo que les permiten moverse en agua; la posición y el número de los flagelos se utiliza en la caracterización de los diferentes géneros. La mayoría de las bacterias fitopatógenas están radiadas de una cápsula mucilaginosa, más o menos densa y de espesor variable, formado por polisacáridos; este material externo tiene importancia en patogénesis y en la sobrevivencia de las bacterias. (González, 1981)

## **Mantenimiento y diseminación**

Muchas bacterias foliares, permanecen por un tiempo en hojas caídas y otros residuos de cosechas, protegidas de la desecación por capas de mucílago seco y células muertas. Otras son llevadas a las semillas u otros órganos de propagación (tubérculo y estolones), algunas sobreviven en raíces de los hospedantes silvestres.

Las bacterias fitopatógenas no sobreviven si son acarreadas por el viento como células individuales; pero pueden ser diseminadas por el salpique de lluvia, el movimiento del agua del suelo, las labores de cultivos, los insectos o los nemátodos. En general el medio de diseminación depende del tipo de hospedante y el órgano del mismo donde ocurre la infección. La severidad



bacteriana es muy variable; una misma bacteriosis en determinada localidad puede ser muy severa o muy leve; en un mismo plantío, puede desarrollarse rápidamente, detenerse en forma súbita y luego volver avanzar. Estos altibajos en severidad reflejan el marcado efecto de las variaciones climáticas, en especial de la humedad, sobre la diseminación de las bacterias. (González, 1981)

## **Clasificación**

Las subdivisiones en órdenes, familias, géneros y especies se basan en la reacción a determinados colorantes, la posición de los flagelos, tipos de colonias, caracteres. Solamente seis géneros contienen especies fitopatógenas, las cuales son:

*Pseudomona*. Contiene cerca de 90 especies fitopatógenas. Son bacilos gram-negativos, con uno o varios flagelos polares o sin flagelos, capaces de crecer en medios sintéticos simples; la mayoría oxida la glucosa, a menudo con formación de gas, frecuentemente producen en el medio de cultivo pigmentos fluorescentes solubles en agua.

*Xanthomonas*. Incluye poco más de la cuarta parte de las especies fitopatógenas las especies de este género son bacilos gram-negativos con un solo flagelo polar; crecen bien en medio de cultivo simple; todas producen un pigmento amarillo mucoso insoluble en agua

*Erwinia*: las características de este género no son muy precisas, excepto las de gram-negativos con flagelos peritricos. Todas las 17 especies descritas son fitopatógenas.

*Corybacterium* son bacilos ligeramente curvados, gram-positivos, sin flagelo. Incluye 11 especies

*Agrobacterium* son bacilos cortos curvados, gram-negativos, son flagelos peritricos. Producen hipertrofia e hiperplasia en raíces y tallos, incluye solo unas especies fitopatógenas.

*Streptomyces* este género pertenece a los actinomicetales que algunos autores no consideran verdaderas bacterias. Presentan células alargadas, en cadena, que forman una especie de micelio ramificado; en algunas especies se producen conidios en hifas modificadas, lo que las hace parecer hongos imperfectos. (González, 1981)

## **Sintomatología**

Entre las enfermedades bacterianas se pueden encontrar tipos tan variados en sintomatología. Hay casos de podredumbres suaves, debido a la disolución de lámina media de las paredes celulares. (*Erwinia* en órganos carnosos); lesiones localizadas en hojas y frutos, en que no se encuentran bacterias en el tejido normal acreedor de la lesión (*Xanthomonas*), marchites debida a acumulación de sustancias, tanto de origen bacteriano como del tejido de hospedante, en los conductos del xilema (*Pseudomonas solanacearum*) agallas debido a estímulos celulares que resultan en hiperplasias e hipertrofias (*Agrobacterium tumefaciens*). Cualquiera de estos tipos de síntomas puede ser producido por las bacterias patógenas de varios géneros y cada género contiene algunos patógenos capaces de producir diferentes tipos de enfermedades (Agris, 1996)

Muchas bacterias penetran en la planta por los estomas, o aperturas similares; para esto necesitan desplazarse a través de una gota o películas de agua para llegar a la cavidad subestomática. Todas la bacteria que causan necrosis foliares penetran en esta forma. Las bacterias que causan marchites, podredumbre suave o agallas necesitan heridas para penetrar. Ninguna bacteria es capaz de penetrar directamente en el hospedante, porque no son capaces de atravesar la cutícula y las capas de corcho.

A pesar de la fragilidad, las bacterias son tan numerosas, y penetran con tanta rapidez en la planta, que a menudo escapan a la acción de bactericidas superficiales y causan ataques destructivos, cuando las condiciones ambientales, especialmente la humedad, son favorables. Una vez dentro de los tejidos del hospedante las bacterias se multiplican rápidamente hasta alcanzar

millones, especialmente en órganos jóvenes y suculentos. A medida que maduran los tejidos disminuye en contenido de humedad y de nutrientes disponibles, el tiempo que aumenta el grosor de las paredes celulares y aparecen otras barreras, mecánicas y químicas. Todo esto limita el avance de las bacterias y en muchos casos lo detiene. (González, 1981)

### ***Xanthomona axonopodis* pv. *Phaseoli***

#### **Importancia económica**

El marchitamiento puede causar significantes pérdidas en frijol (*Phaseoli vulgaris*) en el trópico, subtropical y en climas templados reduciendo el rendimiento y dificultad de control, además que utiliza semillas como medida de supervivencia y dispersión un ejemplo de ello es la bacteria *Xanthomona axonopodis* pv. *phaseoli* uno de los patógenos más importante que afecta al cultivo del frijol en el mundo (Irigoyen y Garbagnoli, 1997).

#### **Morfología**

Son bacilos rectos y cortos, Gram-negativos, con flagelación monotricos, en medio de cultivo agar nutritivo presentan un pigmento amarillo no difusible en el medio, hidrolizan el Tween 80, no reducen nitratos, ni producen (H<sub>2</sub>S), tolerancia al 0.1% de cloro de tetrazolio y oxidación de la glucosa; afectan a semillas de fríjol, éstas se adhieren en la superficie de la semilla.

#### **Medio de dispersión**

Se disemina por salpicado y escurrimiento producido por las lluvias, el viento, por algunos además algunos insectos pueden diseminar pasivamente esta bacteria. La semilla también es otro tipo de diseminación, ya que en ellas puede haber bacterias, las cuales son ubicadas en la testa o internamente. De

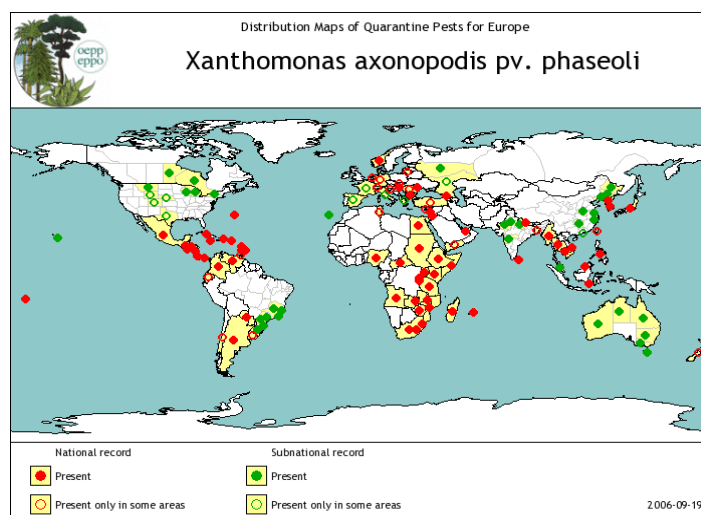
esta forma pueden sobrevivir en la semilla o en residuos infectados que permanecen en el suelo (Ramírez, 2005).

## Sintomatología

En el caso del tizón común en frijol y mancha bacteriana, los síntomas se presentan como manchas foliares, inicialmente acuosas y luego necróticas, pardas con un pequeño halo clorótico. El tizón común prevalece en zona cálidas entre 28 y 30 grados centígrados.

## Distribución geográfica

*X. axonopodis* pv. *phaseoli* se encuentra distribuida en todo el mundo (Figura 5) principalmente en lugares tropicales, subtropicales y en climas templados como Asia, África, América del Norte, del Sur y centro, Oceanía y Estados Unidos. (Irigoyen y Garbagnoli, 1997).



**Figura 5.** Distribución geográfica de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (www.cabi.org)

## ***Clavibacter michiganensi Subsp. michiganensis* (Smith) Jensen**

### **Importancia económica**

Desde los primeros reportes de la enfermedad en USA en 1910, el cancro bacteriano se ha dispersado alrededor del mundo y ha causado serias pérdidas al mundo tanto para el tomate de invernadero como para el tomate cultivado en los campos, en uno u otro causa la muerte en plantas jóvenes reduciendo el valor comercial de la producción. La reducción en el rendimiento puede estar asociada con la pérdida directa de las plantas, reduciendo el número o tamaño de los frutos los campos experimentales han reportado pérdidas del 20% o más en Ontario, Canada y 20-30% en Francia (Stapp, 1961)

### **Morfología**

Son bacilos cortos, ligeramente curvos, Gram positivo, algunos móviles, presentan de uno a dos flagelos, las colonias en agar nutriente son de color amarillo-rojizo con un crecimiento lento, hidrolizan débilmente el almidón, no producen nitratos, pero producen ácido a partir de glucosa. Esta bacteria es un agente causal de cancro bacteriano mejor conocido como ojo de pájaro, afecta principalmente al cultivo de tomate, en hojas, tallos y frutos.

### **Medio de dispersión**

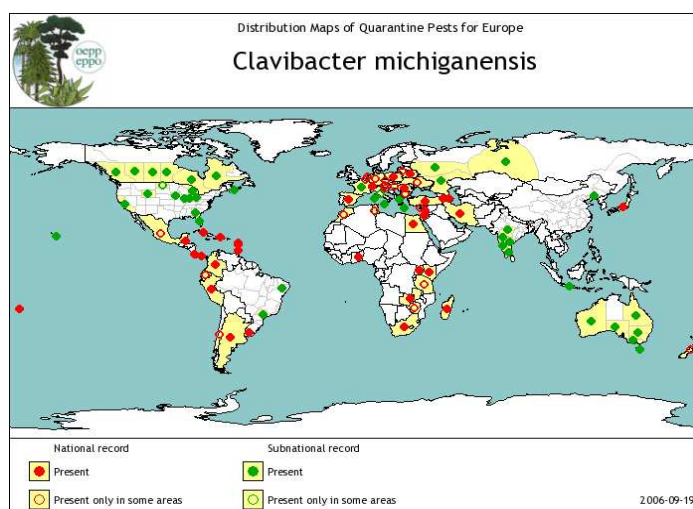
Se disemina por semillas externa o internamente infectadas, durante las labores de cultivo, en la almaciguera o en la plantación definitiva (limpias y desbrotaduras o podas) al trasladar almácigos infectados y también por efecto del salpicado provocado por las lluvias o por el riego por aspersión. Los factores favorables son temperaturas relativamente altas del aire y del suelo entre 25 y 28 °C, las cuales resultan ser predisponentes, así como algunas labores que favorecen la diseminación, por ejemplo, las podas, desbrotos o la práctica de semillero o almácigo, seguido de trasplante. (Primavesi, 1988)

## Sintomatología y sobrevivencia

Primero ocurre una marchites o clorosis unilateral de los folíolos, hasta comprometer completamente la lámina foliar. En los tallos aparecen estrías longitudinales inicialmente blanquecinas y luego marrón, que pronto se transforman en canchales abiertos, internamente se produce una necrosis del tejido vascular (xilema), visible en cortes longitudinales o transversales de los tallos o de la base de los pecíolos. En los frutos, aparecen lesiones esféricas, necrosadas, blanquecinas y rodeadas por un margen marrón este síntoma comúnmente se denomina ojo de pájaro. Sobrevive asociado a restos enfermos que permanecen en el suelo, hasta el establecimiento del cultivo siguiente; es un invasor del suelo además, puede sobrevivir en semillas infectadas. (Latorre, 1990)

## Distribución geográfica

*Clavibacter michiganensis* Subsp. *michiganensis* se distribuye en zonas productoras de tomate y ocasiona cuantiosas pérdidas a nivel mundial (Figura, 6). Afecta a regiones de Estados Unidos, Canadá, Australia, Nueva Zelanda, Europa, China, África, Costa mediterránea de Turquía, Sudamérica.



**Figura 6.** Distribución geográfica de *Clavibacter michiganensis* Subsp. *michiganensis*. (<http://www.appo.org>.)

## ***Erwinia carotovora* Subsp. *Carotovora***

### **Importancia económica**

La podredumbre blanda en la planta en tubérculos en el campo y en el almacén es causada por *Erwinia carotovora* Subs. *carotovora* (Stefanova, 2007). Esta bacteria es la causante de la pudrición acuosa y ataca a cultivos de papa, apio, zanahoria, cebolla, pimiento, repollo y tomate. (Sherp y Macnsb, 1986). Estas pudriciones blandas son causadas por las bacterias pectolíticas son responsables de considerables pérdidas económicas en diversos cultivos. A nivel mundial se estiman 50 y 100 millones de dólares por año en el cultivo de la papa.

### **Morfología y distribución geográfica**

Su morfología, son bacilos con forma de bastón móviles por flagelos peritricos y anaeróbicos facultativos y se encuentran en la superficie vegetal. Esta bacteria ataca a plántulas de papa (Hernández 2004), podrición blanda en tubérculos almacenados o en tubérculos-semilla después de la siembra y pierna negra en los tallos, dependiendo de su temperatura (García, 2000). La especie del genero *Erwinia*, tiene una distribución mundial, pero principalmente en zonas tropicales y templadas. Por lo general se presentas donde quiera que se cultive papa.

### **Dispersión y factores favorables**

Se disemina por medio del riego, por el drenaje superficial del agua de lluvia o durante las labores de cultivo, en la medida que se disemina suelo infestado, algunos insectos pueden transportar esta bacteria. Por ejemplo,

especies del género *Hylemya* la adquieren al alimentarse de tejidos enfermos y la transportan en el intestino, para depositarla posteriormente con las heces fecales. Se favorece su diseminación con altas temperaturas y alta humedad ambiental. Del mismo modo, los daños mecánicos o la excesiva contaminación con suelo infestados en factores altamente favorables al desarrollo de esta pudrición en postcosecha. (Latorre, 1990)

### **Sintomatología y Sobrevivencia**

En condiciones templado-frescas las plantas a veces pueden morir antes o poco después de que emerjan, con lo que hay fallas en la plantación; sin embargo, los primeros síntomas de la enfermedad se observan en las plantas emergidas que con frecuencia aparecen achaparradas o duras, con un follaje verde pálido o amarillo. Las hojas sobre todo las superiores, son rígidas y erectas y sus márgenes se enrollan hacia adentro; el cuello, hasta unos 10 cm por encima y por debajo del nivel del suelo, está ennegrecido o pardo oscuro y podrido, pero aun firme; durante los periodos secos esta podredumbre basal es parda mas clara, seca y a menudo escamosa.

En una planta pueden o no estar afectados todos los tallos, pero con frecuencia solo se muestra en uno o dos, y posteriormente se observan lesiones hundidas de color negro. Si los tallos afectados se cortan transversalmente unos 5cm sobre la raíz, normalmente se puede observar un cambio de coloración a pardo de los haces principales de tejido lignificado. El tubérculo usado para siembra casi siempre está podrido. Al avanzar la estación las hojas de las plantas afectadas empardacen y la planta muere. En las plantas en que aparece la enfermedad tardíamente, cuando el cultivo ya ha cerrado, o durante rachas de tiempo húmedo, la podredumbre basal es más oscura, húmeda y blanda, y a veces pueden observarse externamente, más arriba en los tallos estrías negruzcas estas plantas a menudo se marchitan y colapsan con rapidez Esta bacteria se limita a vivir sobre superficies vegetales y persiste saprofiticamente en el suelo asociada a restos de materia orgánica. (Smith *et al.*, 1992).



## **Manejo integrado y tratamiento químico**

Para el saneamiento se recomienda evitar los daños durante la cosecha, establecer una rotación de cultivos con cereales, alfalfa y otras leguminosas u otros hospederos no susceptibles. Control química del posible insecto vector. Almacenar la cosecha en ambientes refrigerados (1 a 0°C) con una humedad relativa inferior al 90%. Se sugiere sumergir el apio o la zanahoria en hipoclorito de sodio, 50-100 ppm, durante uno a cinco minutos (Primavesi, 1988)

## **Descripción del antibiótico Farmicina\* 5% Plus**

Farmicina\* 5% Plus utilizado como testigo químico es un antibiótico para el control de enfermedades bacteriales, cuya composición contiene nutrientes, salicilato de potasio y ácidos fúlvicos; los cuales actúan a nivel del patógeno como a nivel fisiológico de las plantas, ya que logra inhibir la síntesis de proteínas a nivel de ribosomas por acción de la oxitetraciclina e induce los mecanismos naturales de defensa bioquímica de las plantas. Su apariencia es amarillo claro, tiene un pH 3.5 y es soluble. La dosis aplicada es de 4 gramos por 50 mililitros de agua (<http://www.fagro.com.mx/prod.asp?prod='Farmicina'>)

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Localización del área de experimento**

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología del departamento de Materiales Avanzados en las instalaciones del Centro de Investigación en Química aplicada (CIQA) ubicado en Saltillo Coahuila.

### **Colecta del Follaje de Gobernadora**

Para evaluar la efectividad de los extractos de gobernadora las muestras de hojas y ramas pequeñas de gobernadora fueron colectadas en su hábitat natural en el Ejido de Hipólito, Municipio de Arteaga, tratando de obtener sólo ramas y hojas jóvenes del tercio final de las ramas de los arbustos de *L. tridentata* el material colectado se secó al aire libre.

### **Secado del Material Vegetativo**

Para la obtención de material de trabajo en volumen suficiente y poder realizar los bioensayos en el laboratorio, se utilizó la técnica de extracción de la resina por inmersión del follaje seco y cribado utilizando como solvente metanol.

Primero se introdujo el follaje de gobernadora seco en contenedores de 20 L en las que se agregó metanol hasta cubrir todo el materia, dejándolo reposar dentro del solvente durante 24 horas a temperatura ambiente; posteriormente se separó el follaje de *Larrea* del solvente con una tela de manta para separar las hojas y ramas pequeñas de la resina en solución. Posteriormente se realizó la evaporación del solvente en un reactor Brighthon

modelo X 1000, esto de acuerdo a la metodología reportada por (Lira., *et al.*, 2002).

Se determinó del porcentaje de sólidos totales en una balanza de determinación de humedad, se agregaron 10 g de la resina, que al evaporarse el solvente nos daba la cantidad de sólidos totales contenidos en la resina la cual fue de 25% de sólidos totales.

### **Obtención de los patógenos**

Cada una de las cepas bacterianas fueron aisladas de material vegetativo e identificadas en el laboratorio de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), Estas cepas fueron identificadas como *X. axonopodis phaseoli*, *C. michiganensis* y *E. carotovora*.

### **Preparación de los tratamiento de *Larrea tridentata***

Se utilizó extracto metanólico de gobernadora al 25%, para la preparación de las diferentes concentraciones de resina, se diluyó tomando en cuenta que 1 mg equivale a 1 ppm en un volumen conocido de 1000 ml de agua destilada para obtener las concentraciones de 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000, hasta 13,000 ppm, un testigo absoluto (agar nutritivo) y un testigo químico (Farmicina Plus al 5%). Cada tratamiento se realizó con cuatro repeticiones con cada una de las bacterias, esto se realizó para las diferentes técnicas que son: medio envenenado, difusión en discos y diluciones dobles seriadas.

## **Preparación de los medios de cultivo**

Para los bioensayos se utilizó agar nutritivo de la marca Bioxon, la preparación se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, en las que se pesó 23 g de agar y se disolvió en un litro de agua destilada a punto de ebullición durante un minuto para su disolución completa. Se ajustó el pH óptimo para cada uno de los microorganismos y se midieron los volúmenes requeridos para cada una de las concentraciones a evaluar.

## **Técnica de medio envenenado**

Se colocó la cantidad exacta de extracto de acuerdo a las concentraciones a evaluar y se mezcló con el agar nutritivo, se agitó vigorosamente para su disolución completa y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos y se vació en cajas petri. Primero se sembraron cada una de las bacterias en 50 mL de caldo nutritivo y se colocaron en incubadora con agitación a 37°C/ 150 rpm por 24h, se colocaron 10 µL del cultivo en cajas con agar nutritivo y se sembraron por extensión en superficie con varilla en forma de L, todo se realizó en condiciones de esterilidad. Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 horas, se realizó el conteo de colonias. Todo esto se realizó con cada una de las cepas y a las diferentes concentraciones.

## **Técnica de Difusión en Discos**

Este método fue realizado de acuerdo con el NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) descrito por Kirby-Bauer en 1966, como el método de referencia la cual deben seguirse minuciosamente para obtener resultados precisos.

Se seleccionaron las colonias y se preparó una suspensión del inóculo, posteriormente se estandarizó la suspensión (turbidez de 0.5 de la escala de Mac Farland con una solución de NaCl a 85% para obtener un valor estimado de  $1 \times 10^8$  UFC/ml) enseguida se inoculó en cajas con agar nutritivo, se extendió con una varilla y después se colocaron 5 discos de papel filtro previamente esterilizados por cada caja con las diferentes concentraciones a evaluar, separados entre sí por 20 mm; se incubaron durante 24 h, transcurrido este tiempo, se midieron los halos de inhibición con un vernier. Los resultados obtenidos de las dosis del extracto se interpretaron midiendo el halo de inhibición y comparándolo con el testigo absoluto discos sin extracto y el químico con farmicina, para cada una de las bacterias.

## **Técnica de Diluciones Dobles Seriadas**

Para esta técnica se utilizaron tubos con caldo nutritivo (CN) de la marca Bioxon, preparado según las indicaciones del fabricante. Se prepararon las suspensiones bacterianas tubos con CN se incubaron a 37°C, luego se observó la turbidez del crecimiento microbiano hasta obtener por comparación visual con la escala de Mc Farland una concentración de aproximada  $10^8$  UFC/mL. Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) se realizó en medio líquido de acuerdo a la técnica descrita por (Vanden y Vlietinck, 1991).

En seguida se determino la concentración o dosis de extracto para cada tubo con CN los cuales contenían 5 mL, se le agregó un inóculo de 10  $\mu$ L ya estandarizado; esto se hizo por triplicado, después de tener los tubos que contenían las diluciones de los extractos, al ser inoculados con las bacterias, se incubaron a 37°C durante 24 h; posteriormente se determino la CMI de cada extracto para cada microorganismo a través de la inhibición del crecimiento bacteriano. La ausencia de crecimiento o sin turbidez del tubo de ensayo fueron los parámetros visuales que se consideraron para la siembra en agar nutritivo ya que estos serían los indicadores de la (CMB) y la (CMI); considerando como la CMI, aquella en la cual había crecimiento mínimo de 50 UFC (Unidades Formadoras de Colonias) y la CMB aquella concentración capaz de inhibir totalmente el crecimiento bacteriano. Siendo estas las que serían sembradas en cajas petri (con agar nutritivo) e introducida a la incubadora durante 24 hr. para su crecimiento, al transcurrir este tiempo se contaron las UFC para su determinación de CMI y CMB.

Para la preparación del antibiótico (Farmicina Plus), se realizo con la técnica de medio envenenado y Difusión en discos, utilizando el mismo procedimiento.

Las concentraciones o dosis probadas contra cada una de las tres bacterias y técnicas, se muestran en el Cuadro 1. Es importante señalar que después de la concentración de 2000 ppm, se analizaron otras dosis intermedias, para poder determinar con precisión las CMB y CMI, para cada bacteria. Se realizaron cuatro repeticiones por cada tratamiento.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Actividad Antibacterial del extracto de *Larrea tridentata* en cada patógeno con las tres técnicas evaluadas

#### *Xanthomona axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap)

Los resultados de los bioensayos con las tres cepas fitopatógenas obtenidos con las técnicas analizadas indicaron claramente que el extracto metanólico de *L. tridentata* tuvo un efecto inhibitorio contra la bacteria *Xanthomona axonopodis* pv. *phaseoli*, tal y como se puede observar en el Cuadro 1, ya que *Xap* fue significativamente afectada o inhibida con la concentración de 3,000 ppm en la técnica de difusión en discos, ya que se detectó un halo de inhibición de 22.19 mm en el medio de cultivo (agar nutritivo); esto en comparación con el testigo absoluto, en donde no se observó inhibición alguna; mientras que el testigo químico a una concentración de 4 g / 50 mL (80,000 ppm) presentó un halo de inhibición de 22.44 mm, lo que resulta ser prácticamente igual; sin embargo, es importante señalar que la dosis del testigo químico empleada fue 26.6 veces más cantidad de este bactericida sintético en comparación con la cantidad aplicada del extracto orgánico vegetal, lo que pone de manifiesto el buen potencial bactericida del extracto resinoso de gobernadora.

Un estudio reciente de Stefanova *et. al.*, (2005) quienes trabajaron con extractos metanólicos de hojas y tallos de *Bixa orellana*, *Gliricidia sepium*, *Ocimum basilicum* y *Petiveria alliacea* los cuales resultaron ser efectivos para inhibir el crecimiento *in vitro* de 14 aislamientos de *Xanthomonas axonopodis*. Estos autores utilizaron los métodos de doble capa de agar y discos impregnados con los extractos colocados en la superficie del medio de cultivo que también había sido previamente inoculada con las cepas bacterianas. En este trabajo se concluye que estas cuatro especies vegetales poseen un efecto bactericida y presentan posibilidades promisorias para el control de enfermedades en plantas.

Los halos de inhibición máximos reportados por estos autores fueron de 17 y 21 mm de diámetro con los cuatro extractos empleados, mientras que en este trabajo los halos de inhibición producidos por el extracto de gobernadora fueron de 22.19 mm. Martínez de Carrillo y Colmenares (1999) también estudiaron el efecto de varios extractos, entre ellos de la *B. orellana* y comprobaron que el desarrollo de las colonias del agente causal de la bacteriosis de cebolla (*Xanthomonas* sp.) fue inhibido entre 90 y 100%.

**Cuadro 1. Técnicas microbiológicas evaluadas para determinar el efecto inhibitorio del extracto metanólico de gobernadora contra la bacteria *Xanthomona axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap)**

Difusión en discos		Medio envenenado		Diluciones dobles seriadas	
Dosis (ppm)	<sup>1</sup> H.I. (mm)	Dosis.(ppm)	UFC/mL	Dosis.(ppm)	UFC/mL
*0	NI	0	NI	0	NI
500	NI	31.5	NI	1937	NI
1600	NI	3000	NI	3638.7	NI
2500	NI	4000	NI	3815	225
2850	16.71	4500	40	5000	24
3000	22.19	5200	24	7267.5	12
4000	22.20	6000	1	10000	8
8000	22.21	8000	SC	11160	6
32000	22.24	10000	SC	15000	1
TQ	22.44	TQ	SC	16000	SC
				TQ	SC

\*TA = Testigo absoluto (0 ppm); <sup>1</sup>Halo de inhibición observado; UFC= Unidades Formadoras de Colonias; TQ = Testigo químico (4 gr / 50 mL de agua destilada); NI = No inhibió; SC = Sin crecimiento.

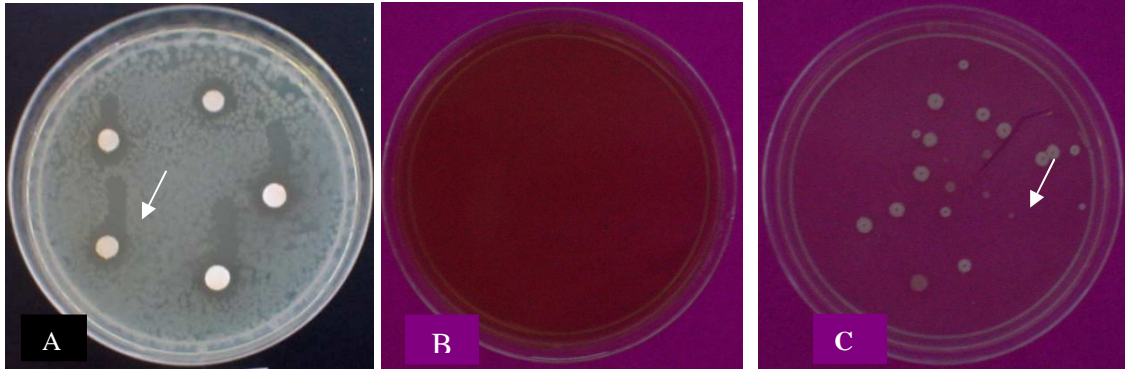
De manera similar los resultados obtenidos por Stauffer *et al.* (2000) quienes evaluaron extractos de 98 especies vegetales pertenecientes a 46 familias botánicas (7 monocotiledóneas; 46 dicotiledóneas 1 conífera y 2 pteridofitas). Ellos reportan que de los 98 extractos probados, solo 9 de ellos demostraron inhibición del crecimiento *in Vitro* de la bacteria *X. campestris* pv. *campestris*. Además señalan que obtuvieron un halo de inhibición de 12.4 mm con el extracto de Eucalipto, al igual que el extracto de palo santo logro una inhibición de 11.3 mm, Chirca con 10.4 y Agrial con 10.3; esto indica que se



tuvieron menores halos de inhibición en este estudio que los obtenidos con extracto de *Larrea*.

Investigaciones de Rawat (2006) sobre la actividad antibacterial de extractos de distintas especie *Conyza bonariensis*, *Conyza canadensis* y *Conyza Jalapa*, contra la bacteria fitopatógena *Monilia cinerea*, mostró que al aumentar la concentración había un efecto inhibitorio mayor, los mejores resultados se presentaron a una concentración de 0.2g/mL (200,000 ppm) con la especie *Conyza canadensis*, al presentar una inhibición de 58.95 %. Queda claro que en el presente estudio a bajas concentraciones se logró inhibir a las bacterias fitopatógenas al utilizar extracto metanólico de *L. tridentata*.

En cuanto a la eficacia antibacterial del extracto de gobernadora en las tres técnicas microbiológicas evaluados de este trabajo indican que al utilizar la técnica de difusión en disco se pudo observar mas claramente la inhibición del crecimiento bacterial, ya que con 2,850 ppm se detecto un efecto adverso contra *Xap*; mientras que con la técnica de diluciones dobles seriadas a 3,815 ppm se observo la inhibición de este patógeno, siendo una concentración mayor y por último con el medio envenenado a 4,500 ppm del extracto de *Larrea* se aprecio una inhibición, con 40 UFC; por lo tanto, esto sugiere que la técnica de difusión en discos nos permite apreciar notoriamente el efecto antimicrobiano de los extractos vegetales de este arbusto del semidesierto (Figura 5).



**Figura 5.** Cajas petri en las que se aprecia la inhibición del extracto de gobernadora con la bacteria *Xanthomona axonopodis* pv *phaseoli*, (A) mediante difusión en discos a 3,000 ppm; (B) a 7,267 ppm mediante la técnica de diluciones dobles seriadas y (C) a 15,000 ppm, con 1 UFC al usar la técnica de medio envenenado.

## **Efecto del extracto metanólico en la inhibición de la bacteria *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Cmm)**

Considerando los resultados obtenidos en estos bioensayos a diversas concentraciones de extracto de gobernadora contra la bacteria *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Cmm) se mostró un claro efecto inhibitorio en las tres técnicas evaluadas, como se muestra en el Cuadro 2, en la técnica de medio envenenado, se observó un efecto inhibitorio a una concentración de 4,000 ppm, en donde no presento crecimiento bacteriano, en comparación con el testigo absoluto en el cual no se presento inhibición; en tanto que con el testigo químico (Farmicina Plus) a una concentración de 4 g/50 mL (80,000 ppm) presentó un halo de inhibición de 22.43 mm, siendo similar a la concentración de 4,000 ppm de extracto de gobernadora, en la técnica de difusión en discos con un halo de inhibición de 22.24 mm, en una concentración menor que la del químico, siendo 20 veces mayor que el extracto orgánico resinoso, lo que confirma que el extracto de gobernadora tiene un gran potencial biocida contra las bacterias fitopatógenas.

Zignago (2004) reporta que al evaluar tres concentraciones de dos extractos de propóleo (Canelones y Rocha) de distinto origen en la inhibición del crecimiento de *Cmm*, a concentraciones de 40 mg/ mL (40,000 ppm) presentando un halo de inhibición de 23.8 mm, mientras que para concentraciones de 120 mg/ mL (120,000 ppm) y 80 mg/ mL (80,000 ppm) se obtuvieron halos de inhibición de 25.6 mm y 25.2 mm con respecto al propóleo del sitio Canelones, representando halos de inhibición superiores a los de este estudio, pero a concentraciones mucho mayores; mientras que con el propóleo Rocha se obtuvieron resultados similares encontrando halos de inhibición de 22.5, 22.6 y 22.1 mm respectivamente a concentraciones de 120 , 80 y 40 mg/ mL, resultados superiores a los encontrados en este estudio siendo 40, 20 y 10 veces mayores que el extracto de gobernadora.

Estudios por González *et al.*, (2005) al evaluar *in vitro* el efecto antimicrobiano del péptido melitina compuesto de 26 aminoácidos al cual se le

considera el principal componente del veneno de la abeja (*Apis mellifera*) este autor evaluó mediante bioensayos en placa ELISA con un volumen de 50  $\mu\text{L}$ , en donde la melitina se diluyo en ácido acético a 0.01 % y en agua desionizada estéril, la concentración de melitina que utilizaron para la bacteria *Cmm* fue de 65  $\mu\text{M}$  equivalente a (7,280 ppm,) este autor reporta una inhibición del 100% contra todas la cepas probadas. De acuerdo con los resultados se ve claramente que en el presente estudio encontramos concentraciones mas bajas contra esta bacteria al lograr inhibir a concentraciones inferiores que con el veneno de abeja.

Otros productos naturales extraídos de la abeja han tenido resultados importantes en la inhibición de bacterias en humanos, Sforcin (2000) y Pinto (2001) demuestran la actividad antibacterial con propolio Brasileño contra bacterias Gram-positivas, de extractos de propolio procedentes de zonas templada. Estos estudios refuerzan la importancia de los principios activos de productos naturales, así como extractos vegetales, obteniendo resultados satisfactorias contra bacterias que afectan a cultivos agrícolas y patógenos en humanos.

**Cuadro 2. Técnicas microbiológicas evaluadas para determinar el efecto inhibitorio del extracto metanólico de gobernadora contra la bacteria *Clavibacter michiganensis*, Subsp. *michiganensis*.**

Difusión en discos		Medio envenenado		Diluciones dobles seriadas	
Dosis (ppm)	<sup>1</sup> H.I. (mm)	Dosis (ppm)	UFC/mL	Dosis.(ppm)	UFC/mL
*0	NI	TA 0	NI	TA 0	NI
500	NI	31.25	NI	687.5	NI
3500	NI	1000	NI	2500	NI
3895	22.15	2000	386	2790	188
4000	22.24	2500	58	3125	136
6000	22.32	3850	3	5750	18
8000	22.33	4000	SC	11160	5
20000	22.33	8000	SC	11530	3
24000	22.34	TQ	SC	11610	SC
28000	22.40			12000	SC
32000	22.40			TQ	SC
TQ	22.43				

\*TA = Testigo absoluto (0 ppm); <sup>1</sup>Halo de inhibición observado; UFC= Unidades Formadoras de Colonias); TQ = Testigo químico (4 gr / 50 mL de agua destilada); NI = No inhibió; SC = Sin crecimiento.

En cuanto a la actividad antibacterial del extracto de *L. tridentata* contra la bacteria *Cmm* en los bioensayos realizados se observó que las tres técnicas evaluadas demostraron ser útiles para detectar el efecto antibacterial de este extracto metanólico natural. En cuanto a la efectividad de las técnicas para mostrar la inhibición del extracto se apreció que utilizando la técnica de medio envenenado a la concentración de 2,000 ppm presentó inhibición con 386 UFC mientras que a 4,000 ppm no hubo crecimiento bacteriano, (Figura 6) seguida de la técnica de diluciones dobles seriadas a 2,790 ppm, encontrando 188 UFC, pero hasta 11,610 ppm fue cuando no presentó crecimiento alguno, considerándola como la CMB. En cuanto a la técnica de difusión en discos a concentraciones de 3,895 y 4,000 presentaron halos de inhibición de 22.15 y 22.24 mm. Con respecto a las diferentes técnicas se sugiere que las tres podrían determinar el efecto biocida del extracto de gobernadora. Obteniendo

mejores resultados con la técnica de medio envenenado.

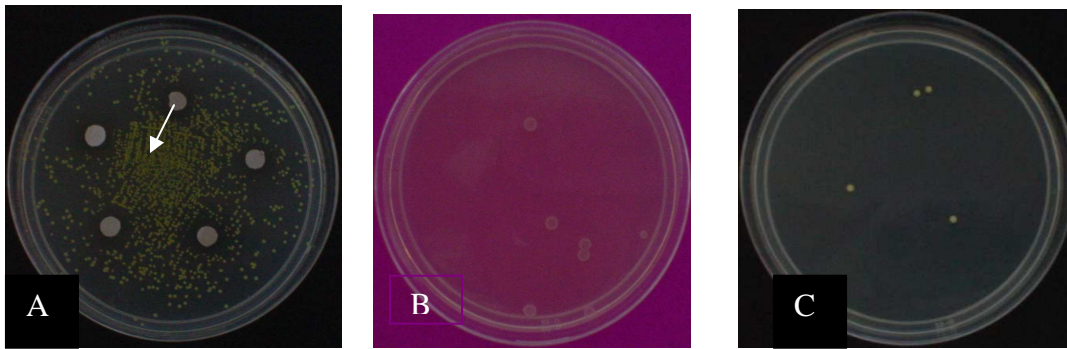


Figura 6 Cajas petri en las que se detecto la inhibición *in Vitro* del extracto de gobernadora a 3,895 ppm (A) *Clavibacter michiganensis, michiganensis*) mediante la técnica de difusión en discos y (B y C) con la técnica de diluciones seriadas a 11,160 ppm con el extracto de la planta del semidesierto.

### **Efecto del extracto metanólico en la inhibición de la bacteria *Erwinia carotovora subsp. carotovora* (Ecc)**

Los resultados obtenidos con la bacteria *Ecc* arrojaron que a concentraciones del extracto metanólico de gobernadora a 6,230 ppm, hubo una inhibición evidente de este patógeno, mediante la técnica de diluciones dobles seriadas, se observaron 11 UFC. Para el testigo químico se presentó un halo de inhibición de 22.43 mm a una concentración de 80,000 ppm; estos resultados son similares a la técnica de difusión en disco, ya que mostraron un halo de inhibición de 22.24 mm a una dosis de 8,900 ppm; lo cual indica que los extractos de gobernadora resultaron ser efectivos para inhibir el crecimiento *in vitro* de bacterias fitopatógenas. Es importante reiterar que el testigo químico utilizado en este trabajo fue 8.98 veces en mas alta concentración a la máxima dosis utilizada en este estudio (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Técnicas microbiológicas evaluadas para determinar el efecto inhibitorio del extracto metanólico de gobernadora contra la bacteria *Erwinia carotovora subsp. Carotovora*.**

<b>Difusión en discos</b>		<b>Medio envenenado</b>		<b>Diluciones dobles seriadas</b>	
Dosis (ppm)	<sup>1</sup> H.I. (mm)	Dosis (ppm)	UFC	Dosis (ppm)	UFC
*TA 0	NI	TA 0	NI	TA 0	NI
1000	NI	31.25	NI	1250	NI
6000	NI	2000	NI	6230	11
8700	NI	7000	NI	10000	3
8900	22.24	7500	PC	11500	1
9000	SC	8500	PC	11750	SC
10000	SC	8750	SC	12500	SC
		9000	SC	TQ	SC
TQ	22.43	TQ	SC		

\*TA = Testigo absoluto (0 ppm); <sup>1</sup>Halo de inhibición observado; UFC= Unidades Formadoras de Colonias); TQ = Testigo químico (4 gr / 50 mL de agua destilada); NI = No inhibió; SC = Sin crecimiento.

Ensayos similares realizados por Guevara (2000) evaluaron el posible efecto de diferentes extractos vegetales sobre algunas bacterias patógenas

como *Erwinia* sp. *E. carotovora*, *E. mangiferae* y *Pseudomona* que afectan a los cultivos de mango, lechoso, banano y girasol. Las plantas utilizadas en ese trabajo fueron: *Ruellia tuberosa* L. (yuquilla), *R. tuberosa* L., *Lochnera rosea* L. (Buenas tardes), *Nerium oleander* L. (Rosa de berbería), *Momordica charantia* L. (Cundeamor), *Melicocca bijuga* L. (Mamón); *Chrysophyllum cainito* L. (caimito), *Eryngium foetidum* L. (Culantro) y *Melia azedarach* L. (alelí). Este autor utilizó las partes de toda la planta; hoja, flor, fruto y tallo; los bioensayos se realizaron mediante la técnica de difusión en discos, colocando discos húmedos y secos impregnados con 2mL de extracto; los cuales se prepararon licuando una parte del material vegetal fresco, con tres partes de agua destilada, otra por medio de infusiones con una parte de material fresco y seis partes de agua. Este concluyó que en todas las pruebas se observó crecimiento bacteriano con los extractos evaluados, excepto con *E. mangiferae*, bacteria patógena que afecta principalmente a los frutos y tronco del mango, en donde si se observó un buen efecto bactericida fue con material vegetativo de cundeamor y culantro, mientras que una menor inhibición del crecimiento bacteriano fue detectado con el extracto de alelí.

Otros estudios in Vitro realizados por Zignago (2004) con la bacteria *E. carotovora* indican que al evaluar tres concentraciones de dos extractos de propoleo (de los sitios geográficos Canelones y Rocha) a concentraciones de 40 mg/mL (40,000 ppm), se encontró que no hubo inhibición alguna con ese bioproducto.

Un reporte de Peralta-Bello (2006), consigna que mediante la aplicación de extractos hexánicos y etéreos de *Flouresia cernua* (hojasén), empleados contra la bacteria *E. carotovora*, pv, *atroséptica*, no presentaron inhibición alguna, mientras que con el extracto etanólico se detectó una inhibición del 21.73% a 4,000 ppm.

Abdelgaleil y Ahmen (2005) valoraron extractos de *Magnolia grandiflora* de hojas, tallo y corteza de la raíz, obtenidos con metanol y diclorometano, contra seis bacterias fitopatógenas: *Pseudomonas solanacearum*, *Sarcina lutea*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovolora*, *Erwinia cartovora* y



*orynebacterium fascinas*. Estos autores encontraron que los extractos de hojas y corteza de tallos con mayor efecto bactericida fueron los obtenidos con diclorometano a concentraciones de 100 y 200 ppm; estos autores señalan que al utilizar lactosas y terpenos se presentó una mayor inhibición en las seis bacterias. Sus resultados mostraron también un efecto en las bacteria mas resistentes, al encontrar que la CMI para *Erwinia amylovora* y *Corynebacterium fascinas* fue de 20 mg/mL (20,000 ppm). Se debe señalar que al comparar estos resultados con los generados con los extractos de gobernadora, los biocompuestos de esta especie del semidesierto han resultado ser los mejores, debido a que ha logrado inhibir estas mismas bacterias a menores concentraciones.

En relación con la elección de la mejor técnica para determinar la eficiencia de la resina de gobernadora, el Cuadro 3 nos indica que la mejor fue la de diluciones dobles seriadas a una concentración de 6,230 ppm, ya que solo se detectaron 11 UFC, seguida por la técnica de medio envenenado a dosis de 7,500 ppm, y por último, la técnica de difusión en discos a una concentración de 8,900 ppm, la que presentó un halo de inhibición de 22.24 mm; este efecto inhibitorio fue similar al obtenido por el testigo químico sintético (Farmicina Plus), pero este utilizando una mayor concentración (40,000 ppm). Esto claramente indica que el extracto metanólico filtrado (F) y sin filtrar (S/F) de *L. tridentata* aplicada mediante la técnica de diluciones dobles seriadas tiene un potente efecto antibacterial (Figura 7).

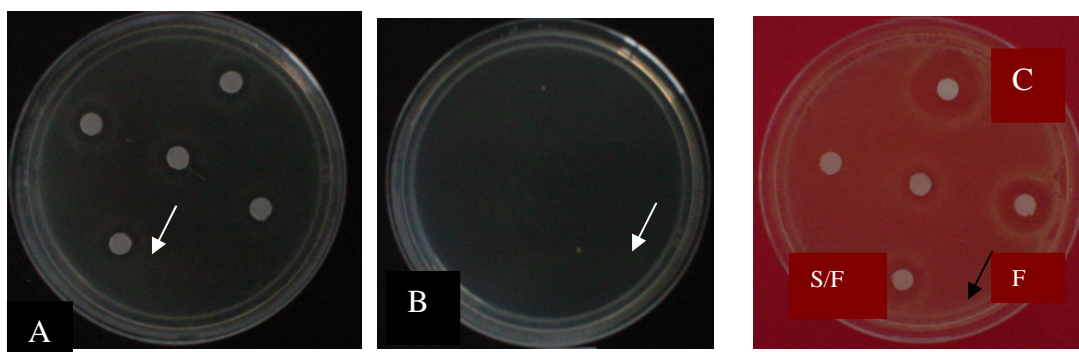


Figura 7. Cajas petri mostrando la inhibición in Vitro del extracto de gobernadora en *Erwinia carotovora* subsp *carotovora* a 8,900 ppm mediante la técnica de difusión en discos (A); con 10,000 ppm mediante la técnica de

diluciones dobles seriadas (B) y el testigo químico (Farmicina Plus) señalando la inhibición obtenida hasta la concentración de 80,000 ppm (C).

El trabajo realizado por Tian *et al* (2007) mostró que al evaluar extractos de *Helianthemum ordosicum* con seis disolventes diferentes contra *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae*, *Alternaria spp.* y *Penicillium expansum kikuchiana*, lograron una inhibición del 100% y 74%, para *Alternaria*; así mismo encontraron un claro efecto bactericida del ácido acético a diferentes concentraciones contra *Verticillium dahliae* determinando que la CMI fue de 5g/L (5,000 ppm).

El uso de extractos vegetales como productos orgánicos que pueden ser empleados en programas de agricultura sustentable u orgánica ha tomado auge debido a las propiedades antimicrobiales inducidas por las elevadas concentraciones de fitomoléculas como fenoles, catecoles, terpenoides, alcaloides, flavonoides y muchas otras sustancias bioactivas capaces de inhibir el crecimiento de bacterias y hongos. Un estudio reciente de Salomao *et al.*, (2008), relativo al uso del propoleo producido por las abejas, mostró que al utilizarlo como producto antibacterial en 10 especies patógenas de humanos, señaló el gran potencia biocida de este biocompuesto contra bacterias, mediante la técnica de diluciones dobles seriadas, al aplicar 30 g de este producto resinoso triturado con 100 mL de etanol (300,000 ppm). Lo anterior pone de manifiesto que tanto productos de origen vegetales como animal tienen un gran potencial para emplearse como compuestos antimicrobiales en plantas y humanos.

La resina de la gobernadora ha probado tener efectos bactericidas y bacteriostáticos a baja dosis, tal y como lo demostró el trabajo pionero de Velásquez (1983), quien al evaluar in Vitro diversas dosis del extracto etanólico contra las bacterianas fitopatógenas *Erwinia amylovora*, *E. atroseptica*, mostró que los extractos de la resina revelaron un efecto selectivo contra las tres bacterias evaluadas al no inhibir a una dosis de 2000 ppm el desarrollo de *E. amylovora*, mientras que el crecimiento de *E. atroseptica* fue relativamente mínimo a dosis de 250, 500 y 1000 ppm, la técnica utilizada fue medio

envenenado; estos resultados contrastan con el presente estudio; esto pudiese deberse a que la bacteria utilizada pertenece a la otra especie, comportándose de manera diferente.

Con base en lo anteriormente señalado se deduce que tanto los extractos etanólico como el metanólico de *L. tridentata* son buenas opciones para ser empleados como productos orgánicos vegetales contra bacterias fitopatógenas de gran importancia económica que afectan a numerosos cultivos hortofrutícolas, ya que con los resultados obtenidos en este estudio se logró apreciar claramente y mediante tres técnicas microbiológicas inhibición de la inhibición de tres cepas bacterianas. Por lo tanto, de este trabajo se pueden derivar las siguientes conclusiones.

## CONCLUSIONES

- El extracto metanólico de *L. tridentata* al 25 % de ingrediente activo, mostró resultados de gran eficacia inhibitoria contra las tres bacterias estudiadas al lograr inhabilitarlas en su crecimiento *in vitro* a la relativamente baja dosis de 2,000 ppm. Estos resultados fueron más evidentes para la bacteria *Clavibacter michiganensis* mediante la técnica de medio envenenado.
- Las tres técnicas microbiológicas utilizadas mostraron ser eficientes para la determinación del efecto antibacterial del extracto metanólico de gobernadora, ya que las tres nos permitieron apreciar claramente el efecto microbicida del extracto natural de este arbusto del Desierto Chihuahuense.
- El extracto de gobernadora tiene un amplio rango de acción y efectividad debido a que mostró la inhibición de las bacterias estudiadas; además se observó que cada bacteria responde de diferente manera, de acuerdo a características biológicas propias del patógeno.
- Es posible señalar que mediante el uso de extractos orgánicos se puede contribuir a un mejor aprovechamiento de los recursos de manera sustentable, volviéndose la biomasa de muchas especies de la abundante flora Mexicana, una materia prima para la elaboración de productos naturales con potencial antimicrobial que pudieran comercializarse y emplearse de manera amigable en los diferentes agroecosistemas.
- Por último, es importante señalar que estos resultados obtenidos bajo condiciones de laboratorio deben ser validados con estudios *in vivo* con plantas en invernadero, mallas sombras o en campo abierto, antes de poder hacer recomendaciones para hacer extensivo su uso en cultivos agrícolas.

## LITERATURA CITADA

- Abdelgaleil, S. A.M., Ahmed, S. M., 2005. *In vitro* activity of extracts and sesquiterpene lactones of *Magnolia grandiflora* L. against six plant pathogenic bacteria. *Alejandro Science Exchange Journal*. 26 (2), 158-163 pp.
- Agrios, N. G. 1996. *Fitopatología*. 1a Edición. Limusa. México D.F. pp 532-533.
- Anaya, R. S., Romero N. J. 1999. *Hortalizas plagas y enfermedades*. 1a Ed. Trillas. México D. F. Pp 11, 15.
- Ángeles, Lucio. 2004. *Actividad antifúngica sinérgica de quitosán, Larrea tridentata* (D.C.) y mezclas de ambos bioproductos sobre *Botrytis cinerea* Pers. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 58 Pág.
- Baker. P., Benbrook, Ch., Groth, E. y Lutz, K. 2002. Pesticide residues in conventional IPM- grown and organic food: Insights from there U.S. data sheets. In: *Food Additives and contaminants*, 19, 427-466.
- Balvantín, G.G.F. 2001. *Extractos hidrosolubles de Larrea tridentata* y su efecto inhibitorio en el crecimiento *in vitro* del hongo *Pythium sp.* Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila, México. 59 p.
- Barajas, A., N.C. 2008. *Actividad antimicrobial de extractos de agave y formulados con biocompuestos contra microorganismos patogenos de humanos y contaminantes de alimentos*. Tesis de Licenciatura. U.A. de C, Unidad, Saltillo, México. 77 pp.

- Barajas, N. León E., Villarreal, S., Iliina, A., Lira-Saldivar R.H. 2007 Efecto Antibacterial de los Extractos Etanólico y Metanólico de *Agave lechuguilla* Contra Siete Bacterias Patógenas de Alimentos y Humanos. Simposium Internacional de Agricultura Sustentable.
- Barbour, M.G. 1969. Age and space distribution of the desert shrub *Larrea divaricata* Ecology 50: 679-685 pp
- Barbour, M.G., Cunnigham, G., Ochel, W.O. and S.A., Bamberg. 1977. Growth and development, form and function, In: T.J. Mabry, J.H. Hunziker, D.R.Jr. DiFeo (eds.). Creosote Bush bush-biology and chemistry of *Larrea* in New World Deserts, US/IBP Synthesis Series 6.. Dowden, Hutchinson & Ross Inc., Stroudsburg, PA, USA. 48-91 pp.
- Brinker, F. 1993. *Larrea tridentata* (D.C) Coville (Chaparral or Cresote Bush). British Journal of Phytotherapy 3:10-30.
- Brinker, F. 1993. *Larrea tridentate* (D.C) Coville (Chaparral or Cresote Bush). British Journal of Phytotherapy 3:10-30.
- Carrillo, M., y J. Colmenares. 1999. Efecto de extractos naturales sobre *Xanthomonas campestris* agente causal de bacteriosis de la cebolla, en condiciones de laboratorio. Memorias XVII. Congreso Venezolano de Fitopatología, 14-16 de noviembre, Macaray, Venezuela.
- Clark, D. 1999. Treating herpes naturally with *Larrea tridentata*. Published by U.S. Botanicals Tempe. Arizona. 42 p.
- Comisión Nacional Parara el Conocimiento y Uso de Biodiversidad (CONABIO). 2006. *Larrea Tridentata*.

[http://www.conabio.gob.mx/conocimiento\\_especies/arboles/doctos/70-70\\_zygop2m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento_especies/arboles/doctos/70-70_zygop2m.pdf)

- Coyle, J. and Roberts, N.C. 1975. A field guide to the common and interesting plants of Baja California. Natural History Publisher Company. La Joya, California, USA. 43 pp.
- Cronquist, A. 1981. An interated system of classification of flowering plants. Columfic University. Press., New York. 1262 pp.
- Darrasse, Armelle, Bureau, Christine., Samson. Morris E. Cindy, Jacques, Marie-Agnes. 2007. Contamination of bean seeds by *Xanthomona axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. 119 :203-215
- Díaz, C. Zurivey. 2007. Control de hongos fitopatógenos con extractos de gobernadora (*Larrea tridentata*), en semillas de maíz y trigo almacenadas. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 99 pp.
- Downum, K.R., Dole, J. and Rodriguez, E. 1988. Nordihydroguaiaretic acid: inter-and intrapopulational variation in the Sonoran Desert cresosote bush (*Larrea tridentata*, Zygophyllaceae). Biochemical Systematics and Ecology 16:551-555.
- Downum, K.R., Dole, J., and Rodriguez E., 1988. Nordihydroguaiaretic acid: inter-and intrapopulational variation in the Sonoran Desert creosote bush (*Larrea tridentata*, Zygophyllaceae). Biochemical Systematics and Ecology 16:551-555.
- Duisberg, P.C.1952. Development of a feed from the creosote bush and the determination of its nutritive value. Journal of Animal Science 11:174-180 pp.

- El Ghaouth, A., Smilanick, J., Brown, E., Wisniewski, M., Wilson, C.L. 2000. Application of *Candida saitoana* and glycolchitosan for the control of postharvest diseases of apple and citrus fruit under semi-commercial conditions. *Plant Disease* 84:243-248.
- Fernández, S., Hurtado, L.M., and Hernández, F. 1979. Fungicidal components of creosote bush resin. In: *Advances in Pesticida Science* (ed. H. Geissbühler) pp. 351-355. Pergamon Press Oxford and New Yorw.
- Gamboa, A. R, Hernández, C. D., Guerrero, R. E., Sanchez A. A., Lira, S. R. H. 2003. Inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Phytophthora mont.* (De Bary) con extractos vegetales metanolicos de Hojasén (*Flourensia cernua* D.C), mejorana (*Origenum mejorana* L.) y trompetilla [*Bauvardia ternifolia* (Ca) Schlecht]. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21 (1) P 13.
- García M. E. 2002. Aplicación de Ácido Benzoico en forma foliar de *Lilium* cv. Dreamland. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Gepp, V. 2005. Estrategias de manejo, Control biológico, Control legal. Curso de Fitopatología. Universidad de la República de Uruguay.
- Gnabre, J.N., Brady, J.L. and Clanton D.J. 1995. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1. transcription and replication by NDA sequence-selective plant lignan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 11239-11246.
- González, A., Wisdom, C.S., Sharifi, M.R., and Rundell, P.W. 1994. Water and nitrogen manipulations of the desert shrub *Larrea divaricata* subsp. *tridentata* (Zygophyllaceae). *Journal of Arid Environment*. 28: 139-146.



González, A., Wisdow, Ch. S., and Rundel, P.W. 1988. Ozone impact on the antioxidant nordihydroguaiaretic acid content in the external leaf resin of *Larrea tridentata*. *Biochemical Systematics and Ecology* 16:59-64.

González, L.C. 1981. *Introducción a la Fitopatología*. San José Costa Rica 1 ed. Editorial IICA. 145 pp.

González, M. Ángel., R. Silva, H., Mascorro., O. J. 2005. Ensayo in vitro del péptido antimicrobiano melitina contra diferentes bacterias Fitopatógenas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23, No. 2. 176 Pág.

Guevara, Y., Maseelí A., Sánchez, MA. Del Carmen. 2000. Los extractos acuosos vegetales en el control de bacterias fitopatógenas. FONAIAP DIVULGA No. 66. 1-5 pp.

Hernández, F., V. M. 2004. Efectividad Biológica “*in Vitro*” de Extractos Vegetales para el Control de Hongos Fitopatógenos. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 96 Pág.

Hernández., M. 2005. Efectividad antibacterial y antifúngica de quitosan y *Larrea tridentata* contra microorganismos que afectan a humanos y productos agrícolas. Tesis licenciatura. Universidad de Guadalajara 98 pp.

<http://146.83.41.79/pforestal/files/BACTERIAS.doc>).

<http://www.cabi.org>.

<http://www.eppo.org>

<http://www.fagro.com.mx/prod.asp?prod='Farmicina'#>

- Hutchens, A. R. 1973. Indian Herbology of North America. Merco, Windsor, Ontario.
- Irigoyen, D.E y Garbagnoli,C. 1998. Diagnostico y transmisión de bacterias llevadas por semilla de potato (*Phaseolus vulgaris* L.) en Argentina. Revista de Fitopatología. 33, No.3, 146-152 pp.
- Kearneys, T.H., and. Pobbles, R.H. 1951. Arizona Flora, 2nd. Ed. University of California Press, Berkeley, California, USA. 61p.
- Latorre, A. Bernardo. 1990. Plagas de las hortalizas. Manual de Manejo Integrado. Publicación de las Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 315 pp
- Lira S. R.H. 2003. Estado actual del conocimiento sobre las propiedades biocidas gobernadora (*Larrea tridentata* (D.C.) Ca). Revista Mexicana de Fitopatología. 21. 214-222 pp.
- Lira S. R.H., Gamboa., Villarreal, R., López L.A., R.G. and Jiménez-Díaz, F. 2002. hidrosoluble extracts of *Larrea tridentata* from two desertic zones in the north of Mexico and their inhibitory effect on *Fusarium oxysporum*. ΦYTON-international Journal of Experimental Science 2002:167-172.
- Lira, R. H., M.R., Sánchez, R., Gamboa, D.Jasso, and R. Rodríguez, 2003. Fungitoxic effect of *Larrea tridentata* resin extracts from the Chihuahuan and Sonoran Mexican deserts on *Alternaria solani*. Agrochimica 47:55-60.
- Lira, R.H., Cruz, J., Hernández, F.D., Jiménez, F., Flores, A., Gallegos G. 2003. Soil solarization and *Larrea tridentata* extract as a biocontrol agent on root damage and epidemiology of pepper plants. ΦYTON: 59-64.

- Meinze, F.C., Wisdom C.S., González A., P.W., Rundel and Shultz L.M., 1990. Effects of leaf resin on stomatal behavior and gas exchange of *Larrea tridentata* (D.C.). *Functional Ecology* 4:579-584 pp.
- Montes, B. R., Cruz V., Cruz, G., Martínez M. G., Sandoval G G., García Licona, R., Zilch D, S., Bravo Luna, L. Bermúdez Torres, K., Flores Moctezuma, H.E., y Carvajal Moreno, H., Moreno. 2000. Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de Investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 18:125-131.
- Morales, S.L. 2008. Actividad antimicrobial de Hojasén (*Flouresia cernua*) contra microorganismos patógenos en humanos. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila. Facultad de Ciencia Químicas. Saltillo, Coahuila, México. 67 pp.
- Moreno M., Hugo. 2005. Cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Smith) en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), en el Municipio de Venado, San Luis Potosí. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 54 pp.
- Oku, H. 1994. Plant pathogenesis and disease control. Lewis Publishers. 193 p.
- Peralta, B., J.E. 2006. Evaluación de la actividad de extractos de Hojasén *Flourensia cernua* d.c. in vitro en el control de las bacterias fitopatógenas; *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (smith) dye, *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica* (van hall) dye y *Pseudomonas cichorii* (swingle) stapp. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 74 pp..
- Pinto, MS., Faria, JE., Message, D, Cassini, STA., Pereira, CS., Gioso, MM. 2001 Efeito de extratos de propolis verde sobre bacterias patogénicas insoladas do leite de vacas com mastite. *Braz J. Ver Res Anim Sci*. 38:278-83 pp

- Primavesi, Ana. 1988. Manejo Ecológico de Pragas e Doencas: Técnicas Alternativas Para la producción agropecuaria en defensa del medio ambiente. Sao Paulo. Nobel. ISB. 85-213-0546-X.12. Sourcebook of laboratory exercises in plant pathology. W.H. Freeman and company. United States of America. 1962. American Phytopathological Society. 387 pp
- R. Díaz, Gamazo, C., López-Goñi, I. 1995. Manual práctico de Microbiología. Ed. Masson, S.A. Barcelona, España.
- Rawat, M., Jakher, G.R. 2006. Antibacterial activity of plant extracts on different human pathogens. Indian Journal of Environment and Ecoplannig. Sociencesiety of Environmental Sc 12(3), 723-726. pp.
- Rhoades, D.F. 1977. The antiherbivore chemistry of *Larrea*. In: T.J. Mabry, J.H. Hunziker, D.R. Jr. DiFeo (eds.). Creosote Bush bush-biology and chemistry of *Larrea* in New World Deserts, US/IBP Synthesis Series 6 pp. 135-175. Dowden , Hutchinson & Ross Inc., Stroudsburg, PA, USA. 67-82 pp
- Rivera-Tapia, JA. 2003. Resistencia a antibióticos, problema de salud publica. Annals Medical Association Medical Hospital ABC 48 (1): 42-47pp.
- Rodríguez, C. 2000. Substancias Vegetales y Minerales en el Combate de Plagas. Memorias del VI. Simposio Nacional Sobre Sustancia Vegetales y Minerales en el Combate de Plagas. Pp. 145-149. Acapulco, Guerrero. México.
- Rundel, P.W., Sharafi, M.R. and González, A. 1994. Resource availability and herbivory in *Larrea tridentata* In: M. Arianoustsou and R.H. Groves .Plant-animal interactions in Mediterranean-type ecosystems. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 105-114 pp.

- Rundel, P.W., Sharafi, M.R. and González-Coloma, A. 1994. Resource availability and herbivory in *Larrea tridentata* In: M. Arianoutsou and R.H. Groves (eds). Plant-animal interactions in Mediterranean-type ecosystems. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 105-114 pp.
- Rzedowski, J., G., Calderón de Rzedowski, 1994 and Sonoran Mexican deserts on *Alternaria solani*. AGROCHIMICA 47:54-60.
- Sakakibara, M., DiFeo, D. Jr., Nakatani, N., Timmerman, B., and Mabry, T. J. 1976. Flavonoid methyl ethers on the external leaf surface of *Larrea tridentata* and *L. divaricata*. Phytochemistry. 15:727-731.
- Salomao, K., P. Roberto, S. Pereira, L.C., Campos, C.M. Borba, P.H. Cabello, M.C., Marcucci and de Castro SL. 2008. *Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity*. Departamento de Ultra-estrutura e Biología Celular, University de Bandeirante de Sao Paulo, Brazil. Oxford Journals. Vol 3. 317-324 pp.
- Seigler, D.S., Jakupcak, J., and Mabry, T.J. 1974. Wax esters from *Larrea divaricata*. Phytochemistry 13:983-986.
- Seigler, D.S., Jakupcak, J., and Mabry, T.J. 1974. Wax esters from *Larrea divaricata*. Phytochemistry 13:983-986.
- Sforcin, JM., Fernandes, Jr. Lopes, CAM., Bankova, V.S. Funari SRC. 2000 Seasonal effect on *Brazilian propolis* antibacterial activity. J. Ethnopharmacol. 73:243-9
- Sherf, A.F. y Macnsb, A.A., 1986. Vegetable diseases and their control. Second edicion. John Wiley and Sons, New York, USA. 120-122 pp
- Shreve, F., and Wiggins I.L. 1964. Vegetation and flora of the sonoran desert. Vol II. Stanford University Press. Stanford, California, USA. 75 p

- Smith, I. M., Dunes, J., Lelliot R. A., Phillips, D.H., Archer, S. A. 1992. Manual de enfermedades de las plantas. Ed. Mundiprensa. Madrid, España. 170–228. pp.
- Sosa, M. C., Perdome, R. F., Branthwaite, W. D. C., Salazar. C. J. J. 1997. Manual de Técnicas para el Diagnostico de las Enfermedades de las Plantas. Instituto Internacional de Cooperación para la Agricultura. 1era Ed. México. 68-71 pp.
- Stapp, C. 1961. Bacterial plant pathogens. Oxford University Press, Amen House, London E.C. 4, 292 pp.
- Stauffer. B. Alfredo., Orrego. F. Aida., Aquino J. Alicia. 2000. Selección de extractos vegetales con efecto fungicida y/o bactericida. Revista de Ciencia Tecnología. Vol.1, No. 2, 29 pp.
- Stefanova N., Rizo Peña M.,G y. Coronado., M.F. 2005. Efecto In vitro de extractos de plantas sobre especies bacterianas del género *Xanthomonas*. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Revista de Fitosanidad. Vol 9, no. 3. 49-51 pp
- Stefanova Nalimova. M.,G. Rizo Peña y Coronado, I., M.F. .2007. Efecto In vitro de extractos de plantas sobre especies bacterianas del género *Xanthomonas*. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Revista de Fitosanidad. Vol 9, no. 3. 49-51 pp
- Strider, D.L. 1969. bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*. North Carolina Agricultural Experimental Station. Tech. Bull. 193. 110 pp.
- Tian, L., Yang, J., Qiang. L., Wenfag , G. 2007. On fungistasis of the extracts from *Helianthemum ordosicum* for pathogenic germs of plants. College of Chemistry and Life Science. 27(1), 32-34 p

- Train, P., J. R. Henrichs and W. A. Archer. 1982. Medicinal Uses of Plants by Indian Tribes of Nevada. Quarter-man Publications Inc., Lawrence, Mass.
- Valesi, A.G., Rodríguez, E., Vander, G., Velde, G., and T.J. Mabry 1972. Methylated flavonols in *Larrea cuneifolia*. Phytochemistry. 11:2821-2826
- Vanden, B. y Vlietinck, A. 1995. *In vivo* wond healing activity of dragon's blood (Croton spp), a traditional south America drug, and its constituents. Phytomedicine. 2(1): 17-22 pp.
- Velásquez, M. J.L. 1983. Evaluación del poder bactericida o bacteriostático de la fracción etanólica de las resina de la gobernadora contra las bacterias fitopatógenas *Erwinia amylovora*, *E. atroséptica* y *Pseudomona solanacearum*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 57 p.
- Velásquez, M.J.L. 1983. Evaluación del poder bactericida o bacteriostático de la fracción etanólica de la resina de gobernadora contra *Erwinia amylovora*, *Erwinia antroséptica* y *Pseudomona*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 57 Pág.
- Velásquez, V.R. 1981. Evaluación de la actividad fungicida de la resina de gobernadora sobre *Eutypa armeniacae* Hans & Carter. Tesis de Licenciatura. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 48 p.
- Wedge, D., Curry, K.J., Abril, M., Smith, B. y DeLucca, A. 2003, CCAY-1, a potential natural fungicide for control of small fruit diseases. Abstracts of the Pan-American Plant Disease conference. Pp. 261-263. South Padre Island, Texas. Abril 5-10 pp.

Wisdom, C.S., González C.A., and Rundel, P.W. 1987. Ecological tannin assays: Evaluation of proanthocyanidins, protein binding assays and protein precipitating potential ecology. 72:395-401pp.

Zamora, J.M. 1988. Cytotoxic antimicrobial and phytochemical properties of *Larrea tridentata* Cav. Doctoral dissertation. Auburn University, Auburn, Alabama, USA. 82 p.

Zignago, A. 2004. Estudio *in vitro* de la actividad antimicrobiana de dos propóleos frente a bacterias fitopatógenas. Tesis de licenciatura. Facultad de Agronomía Universidad de la República de Uruguay. 72 pp.