

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
“ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA



*Actividad Antifúngica y Antibacteriana de Extractos Polifenólicos Contra  
Microorganismos Fitopatógenos*

Por:

EDUARDO OSORIO HERNÁNDEZ.

Tesis

Presentada como Requisito Parcial para  
Obtener el Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITOLOGO.

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Mayo de 2007

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
“ANTONIO NARRO”**

**DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA**

*Actividad Antifungica y Antibacteriana de Extractos Polifenolicos Contra  
Microorganismos Fitopatógenos*

Presentado por:

**EDUARDO OSORIO HERNÁNDEZ.**

**TESIS**

**Que Somete a Consideración del H. Jurado Examinador Como Requisito  
Parcial Para Obtener el Título de:**

**INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO**

**Aprobado**

**Presidente del jurado**

**Vocal**

\_\_\_\_\_  
**Dr. Fco. Daniel Hernández Castillo**

\_\_\_\_\_  
**Dr. Cristóbal N. Aguilar González**

**Vocal**

**Vocal**

\_\_\_\_\_  
**Dr. Raul Rodríguez Herrera**

\_\_\_\_\_  
**Dr. Mariano Flores Dávila**

**CORDINADOR DE LA DIVISION DE AGRONOMIA**

\_\_\_\_\_  
**M.C Arnoldo Oyervides García**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila México**

**Mayo de 2007**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
“ANTONIO NARRO”**

**DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA**

*Actividad Antifúngica y Antibacteriana de Extractos Polifenólicos Contra  
Microorganismos Fitopatógenos*

Presentado por:

**EDUARDO OSORIO HERNÁNDEZ.**

**TESIS**

Que Somete a Consideración del H. Jurado Examinador Como Requisito  
Parcial Para Obtener el Título de:

**INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO**

**COMITÉ DE ASESOR**

**Aprobado**

**DIRECTOR INTERNO**

**DIRECTOR EXTERNO**

\_\_\_\_\_  
**Dr. Fco. Daniel Hernández Castillo**

\_\_\_\_\_  
**Dr. Cristóbal N. Aguilar González**

**Vocal**

**Vocal**

\_\_\_\_\_  
**Dr. Raúl Rodríguez Herrera**

\_\_\_\_\_  
**Dr. Mariano Flores Dávila**

## **AGRADECIMIENTOS**

A **Dios**, por ser el guía de mi vida, porque siempre ha existido en los momentos de triunfo y fracasos, gracias a Él, he podido ser lo que siempre anhelé, gracias Dios por concederme este sueño.

Con cariño a mi “**ALMA MATER**”, por haberme cobijado y por haberme brindado los sabios conocimientos para culminar mi carrera profesional.

Al **Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo**, por su colaboración en el desarrollo del presente trabajo y por sus acertadas sugerencias y por darme su confianza para ser el asesor principal de este trabajo.

Expreso mi profundo agradecimiento al **Dr. Cristóbal Noe Aguilar González**, por confiar en mi y por la oportunidad brindada para realizar este trabajo, por su magnífica asesoría y por su gran apoyo para la culminación de la tesis.

Al **Dr. Raul Rodríguez Herrera**, por su gran apoyo, amistad, conocimiento y por sus sugerencias para llevar a cabo el presente trabajo.

A la **M.C. Janeth Margarita Ventura Sobrevilla**, por su valiosa aportación, en la culminación de esta investigación, por su magnífica y acertada asesoría y por su disposición en todo momento.

Al **M.C Faustino Lara**, por sus aportaciones, amistad y asesoramiento en el presente trabajo.

A la TLQ. **M. Cristina Sánchez Flores**, por su apoyo y colaboración y en el presente trabajo.

## **Dedicatorias**

**Con todo mi amor y respeto a mis padres**

**Agustín Osorio Martínez**

**Guadalupe Hernández Hernández**

A quienes dedico este humilde trabajo con profundo amor; a quienes me dieron lo más preciado en este mundo, "LA VIDA" pero en especial a mi madre quién siempre a estado conmigo en los buenos y en los malos momentos, a quien nunca tendré con que pagarle por todos los consejos, regaños y los malos momento que le he hecho pasar y a quien siempre esta al pendiente de mí por todo esto gracias.....

**A mis Hermanos (as)**

**German, Claudina, Rosaura, Isabel, Victorino, Patricia, Eulogia y Beatriz**

quienes me han acompañado en los momentos felices y difíciles en especial a mis hermanas quienes depositaron su confianza en mí.

**A mis Tíos (as) Marcos, Aída, Mario, Ermila, Octavio y Estela** que siempre me brindaron su confianza y por sus consejos tan acertadas para poder alcanzar mi meta.

**A mis cuñados Javier y Marcelo** que depositaron su confianza en mí y por compartir momentos inolvidables con ellos.

A mi novia **Regina** quien siempre estuvo conmigo en los momentos difíciles y por darme alegrías durante mi estancia en al Narro gracias.....

A los amigos de la Narro, **Ricardo, Alermo, Emilio, Jose Juan, Pablo, Gabriel, Doroteo, Ema.**

A los amigos y amigas de la U.A de C. **Tony, Mike, Diego, Ascacio, Saul. Jaque, Erika, Cristal, Bere, Regina,** por la confianza y el apoyo incondicional.

A los doctores **Abiel y Oswaldo** por su amistad y confianza.

Para el **DR. Eugenio Gurrero Rodríguez<sup>†</sup>**, por su amistad, confianza y por el ultimo consejo que me dio la cual fue: “Estudia tus apuntes, por que eso es lo que te van a preguntar el dia de tu presentación de tu tesis” **que Dios te bendiga.**

## INDICE DE CONTENIDO

INDICE GENERAL.....	I
INDICE DE CUADROS.....	VI
INDICE DE GRAFICA.....	IX
INDICE DE FIGURAS.....	IX
RESUMEN.....	X
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
II.- HIPOTESIS.....	2
III.- OBEJTIVOS.....	3
II.-JUSTIFICACION.....	4
IV.- REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Gobernadora ( <i>Larrea tridentata</i> Cov).....	5
Usos.....	5
Nuez ( <i>Carya illinoensis</i> ).....	7
Usos .....	8
Granada ( <i>Punica granatum</i> ).....	8
Usos.....	9
Polifenoles.....	9
Descripción General de los Taninos.....	10
Clasificación de los Taninos.....	11
Taninos Hidrolizables (HT ).....	11
Galotaninos.....	12
Elagitaninos.....	12
Taninos Condensados.....	12
Flavonoides .....	13
Antocianidinas.....	14
Leucoantocianidinas.....	14
Catequina.....	14
Importancia de los Taninos.....	15
Importancia Biológico de los Taninos.....	15
Importancia Industrial de los Taninos.....	16
Importancia Agropecuaria de los Taninos.....	16

Extracción y Cuantificación Química de los Taninos.....	17
Aplicación de los Taninos.....	19
Descripción de los Fitopatógenos.....	20
<i>Phyitium sp.</i> .....	20
Características generales.....	20
Hábitat.....	20
Síntomas.....	20
Importancia económica.....	21
<i>Fusarium solani.</i> .....	21
Características generales.....	21
Hábitat.....	21
Síntomas.....	21
Importancia económica.....	22
<i>Fusarium oxysporum.</i> .....	22
Característica generales.....	22
Hábitat.....	22
Síntomas... ..	23
Importancia económica.....	23
<i>Fusarium Verticillioides.</i> .....	23
Características generales.....	23
Habitat.....	24
Sintomas.....	24
Importancia económica.....	24
<i>Fusarium sambucinum</i> .....	24
Características generales.....	24
Habitat.....	25
Síntomas.....	25
Importancia económica.....	25
<i>Rhizoctonia salani</i> .....	25
Características Generales.....	25
Habitat .....	25
Síntomas.....	25
Importancia económica.....	26

<i>Colletotrichum coccodes</i> .....	26
Características generales.....	26
Habitat.....	26
Síntomas.....	26
Importancia conómico.....	27
<i>Colletotrichum truncatum</i> .....	27
Características generales.....	27
Hábitat.....	27
Importancia económica.....	28
<i>Alternaria alternata</i> .....	28
Características generales.....	28
Habitat.....	28
Síntomas.....	28
Importancia económica.....	29
Descripción de las Bacterias.....	29
<i>Xanthomonas axonopodis</i> Pv. <i>phaseoli</i> .....	29
Características generales.....	29
Hábitat.....	30
Síntomas.....	30
Importancia económica.....	30
<i>Xanthomonas axonopodis</i> Pv. <i>vesicatoria</i> .....	31
Características generales.....	31
Habitat.....	31
Síntomas.....	31
Importancia económica.....	31
<i>Pseudomonas cichorii</i> .....	32
Características generales.....	32
Hábitat.....	32
Síntomas.....	32
Importancia económica.....	32
<i>Erwinia carotovora</i> (Jones) Bergey et al Subsp. <i>carotovora</i> .....	33
Característica generales.....	33
Hábitat.....	34

Síntomas.....	34
Importancia económica.....	34
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
Ubicación del experimento.....	35
Extracción de los polifenoles.....	35
Obtención del material vegetal.....	35
Extracción de polifenoles de la gobernadora.....	35
Extracción de polifenoles de la cáscara de la nuez.....	36
Extracción de polifenoles de la granada. ....	36
Cuantificación de polifenoles.....	36
Cuantificación de Taninos Hidrolizables.....	36
Cuantificación de taninos condensados.....	37
Monofenoles comerciales.....	38
Ácido galico.....	38
Acido elagico. ....	38
Selección del método de la esterilización de placas de ELISA.....	39
Actividad biológica (antifúngica) de extractos polifenólicos sobre la inhibición del crecimiento de 8 especies de hongos fitopatógenos.....	39
Conservación de las especies fúngicas.....	40
Incremento de las cepas.....	40
Bioensayo de los diferentes especies de hongos ....	40
Actividad biológica (antifúngica) de extractos polifenoles sobre la inhibición del crecimiento de 10 aislamientos de <i>F. oxysporum</i> .....	41
Incremento de cepas de <i>F. oxysporum</i> .....	42
Diseño experimental.....	42
Actividad biológica (antibactericida) de extractos polifenoles sobre la inhibición del crecimiento de cuatro especies de bacterias fitopatógenos.....	42
Preparación de los inoculos y conservación.....	42
Preparación de las diluciones bacterianas.....	43
Preparación de medio para bacterias.....	43
Bioensayo de los extractos sobre las bacterias.....	43
Diseño experimental.....	44
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>45</b>

1).-Extracción de taninos de gobernadora y de dos cáscaras de granada y nuez.....	45
2).- Evaluación del método de esterilización de placas de poliestireno.....	46
3).- Evaluación de la actividad biológica de los extractos sobre la inhibición del crecimiento de 8 especies de hongos fitopatógenos.....	47
4).- Evaluación de la actividad biológica de los extractos sobre la inhibición del crecimiento de 10 aislamientos monospóricos de <i>F. oxysporum</i> .....	56
5).- Evaluación de la actividad biológica de los extractos, sobre cepas de bacterias fitopatógenas.....	63
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>66</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>67</b>

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química de la Gobernadora ( <i>L. tridentata</i> Cov.), porcentaje en materia seca.....	6
Cuadro 2.- Hongos fitopatógenos utilizados en este estudio.....	39
Cuadro 3.- Extractos polifenólicos evaluados a diferentes concentraciones sobre la inhibición del crecimiento de 8 especies de hongos fitopatógenos y 10 aislamientos de <i>Fusarium</i> . ....	41
Cuadro 4.- Cepas de <i>Fusarium oxysporum</i> utilizados en el experimento.....	41
Cuadro 5. Extractos polifenólicos evaluados a diferentes concentraciones sobre la inhibición de crecimiento de bacterias fitopatógenas.....	44
Cuadro 6.- Taninos totales cuantificados en los tres extractos con una curva patrón de ácido galico y Catequina.....	45
Cuadro 7.- Comparación de métodos de esterilización para la placa de Elisa..	47
Cuadro 8.- Porcentaje de Inhibición del crecimiento de 8 especies fúngicas por 4 concentraciones del extracto de gobernadora. ....	48
Cuadro 9.- Porcentaje de inhibición del crecimiento de 8 especies fúngicas por 4 concentraciones del extracto de la nuez.....	49
Cuadro 10.- Porcentaje de inhibición del crecimiento de 8 especies fúngicas por 4 concentraciones del extracto de la granada.....	50
Cuadro 11.- Porcentaje de inhibición del crecimiento de 8 especies fúngicas por 4 concentraciones del ácido galico.....	51
Cuadro 12.- Porcentaje de inhibición del crecimiento de 8 especies fúngicas por 4 concentraciones del ácido elágico.....	52
Cuadro 13.- Comparación estadística para crecimiento de los hongos por el estadístico de Cochran-Mantel-Haenszel (Basado en calificaciones de rangos).....	53
Cuadro 14.- Comparación estadística de los extractos sobre la inhibición del crecimiento por el estadístico de Cochran-Mantel-Haenszel (Basado en calificaciones de rango). ....	53
Cuadro 15.- Comparación estadística de las concentraciones utilizadas por el extracto por el crecimiento con el estadístico Cochran-Mantel-Haenszel (Basada en calificaciones de rango). ....	54

Cuadro 16.-Calificaciones Wilcoxon (Suma de rangos) para la variable inhibición del crecimiento por especie fúngica.....	54
Cuadro 17.- Calificaciones de Wilcoxon (suma de rangos) por la inhibición del crecimiento clasificado para el tipo de extracto.....	55
Cuadro 18.- Calificaciones de Wilcoxon (suma de rangos) por la inhibición del crecimiento clasificado para la concentración del extracto.....	56
Cuadro 19.- Porcentaje de Inhibición del crecimiento de 10 aislamientos monosporicos de <i>Fusarium oxysporum</i> por 4 concentraciones del extracto de gobernadora. ....	57
Cuadro 20.- Porcentaje de Inhibición del crecimiento de 10 aislamientos monosporicos de <i>Fusarium oxysporum</i> por 4 concentraciones del extracto de nuez.....	58
Cuadro 21.- Porcentaje de Inhibición del crecimiento de 10 aislamientos monosporicos de <i>Fusarium oxysporum</i> por 4 concentraciones del extracto de granada. ....	58
Cuadro 22.- Porcentaje de Inhibición del crecimiento de 10 aislamientos monosporicos de <i>Fusarium oxysporum</i> por 4 concentraciones del acido galico. ....	59
Cuadro 23.- Porcentaje de Inhibición del crecimiento de 10 aislamientos monosporicos de <i>Fusarium oxysporum</i> por 4 concentraciones del acido elagico.....	59
Cuadro 24.-Comparación estadístico para <i>Fusarium</i> por crecimiento con el estadístico Cochran-Mantel-Haenszel ( basado en calificaciones de rangos).....	60
Cuadro 25.-Comparación estadístico para el extracto por crecimiento con el estadístico de Cochran-Mantel-Haenszel (Basado en calificaciones de rango).....	60
Cuadro 26.-Comparación estadístico para concentración por el crecimiento con el estadístico Cochran-Mantel-Haenszel (basado en calificaciones rango).....	61
Cuadro 27.- Calificaciones de Wilcoxon (Suma de rangos) para la variable crecimiento clasificado como variable hongo.....	62

Cuadro 28.- Calificaciones Wilcoxon (Suma de rangos) para la variable crecimiento clasificado por la variable extracto.....	62
Cuadro 29.- Calificaciones Wilcoxon (Suma de rangos) para la variable crecimiento clasificado por la variable concentración.....	63
Cuadro 30.- Cuadro 30.-Comparacion estadistica para el efecto del extracto sobre el crecimiento bacteriano con el estadístico Cochran-Mantel-Haenszel (Basado en calificaciones de rango).....	66
Cuadro 31.-Porciento de crecimiento de diferentes bacterias fitopatogenas expuestas a tres extractos vegetales y cuatro concentraciones .....	66
Cuadro 32.-Estadístico de extracto menos inhibición de las bacterias fitopatógenos.....	67

## ÍNDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1. Curva patrón de ácido galico.....	37
Gráfica 2. Curva patrón de Catequina.....	38
Gráfica 3. Gramos de taninos totales por gramo de planta en los tres extractos.....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras básicas de Taninos Hidrolizables.....	11
Figura 2. Estructura de Proantocianidina.....	13
Figura 3. Estructura básica del anillo de un flavonoide (Haslam, 1977).....	14
Figura 4. Estructura Básica de la Catequina.....	16

## RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la efectividad antifúngica y antibacteriana de los extractos fraccionados de gobernadora, granada y nuez ricos en compuestos polifenólicos, se probaron 4 concentraciones de cada uno de los extractos y dos monofenoles (ac.gálico y ac.elágico), esto para todos los hongos y para las bacterias solo los tres extractos.

Antes de realizar la prueba se buscaron métodos de esterilización para la placa de Elisa, en la cual se realizó el bioensayo y se encontró que la autoclave fue la mejor, mientras que para las extracciones que se realizaron la gobernadora es la que se obtuvo mayor contenido de polifenoles en comparación de la nuez y granada que no mostraron diferencia significativa.

De acuerdo a los resultados obtenidos la gobernadora fue la que tuvo mayor inhibición sobre los ocho hongos y el hongo más inhibido fue el *Rhizoctonia solani*. En la evaluación de los diez aislamientos de *Fusarium oxysporum* el mayor efecto lo tuvo la nuez; para el caso de las bacterias el extracto que más inhibió fue la gobernadora, y las bacterias que más fueron inhibidas son la *Pseudomonas cichorii* y *Xanthomonas campestris pv. Vesicatoria*.

## INTRODUCCIÓN

El control de organismos fitopatógenos habitantes del suelo es de los más difíciles de lograr, siendo necesario en algunos casos desarrollar nuevos pesticidas para su control por el alto costo que implica. La búsqueda de estrategias, técnicas y métodos que incrementen la productividad agrícola y mantenga el equilibrio ecológico sin agredir los ecosistemas sin arriesgar la salud humana, constituye hoy en día un gran reto para la agricultura y su desarrollo (Gallegos *et al.*, 2004).

Existen antecedentes que indican el potencial antimicrobiano de componentes de especies vegetales distribuidas en la zona semidesértica de México (Carbo 2005, Ventura-Sobrevilla *et al.*, 2006,). Entre estas especies vegetales destacan la gobernadora (*Larrea tridentata* Cov.), la nuez (*Carya illinoensis*) y la granada (*Punica granatum*).

*Larrea tridentata* Cov. es una planta abundante en la región desértica del estado de Coahuila conocida como “gobernadora” o “hediondilla”. La gobernadora, es empleada como adhesivo de cartón y triplay; condimento; aditivo para teñir cuero; también se emplea en la extracción de fenoles que sirven de base para fabricar pinturas y plásticos. La resina que se extrae de las hojas muestran actividad fungicida contra *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium* spp. y otros hongos fitopatógenos (Ventura-Sobrevilla *et al.*, 2006) . La infusión de las hojas se usa como remedio para reuma, cálculos de vesícula y renales, dermatitis, hepatitis, infertilidad femenina y como antiséptico. Se le atribuyen propiedades y acciones contra malestares gástricos, enfermedades venéreas y tuberculosis. Se utiliza como tratamiento para micosis ([http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/ indice\\_especies.html](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/indice_especies.html)).

El nogal pecanero (*C. illinoensis*) es un árbol que puede superar los 30 metros de altura, muy vigoroso y longevo, que inicia su producción entre los 6 y

10 años de edad y continúa produciendo comercialmente durante más de 50 años.

La fruta del nogal se considera una drupa, la cual consta de pericarpio, mesocarpio y semilla (almendra). La nuez tiene un alto contenido de aceite insaturado, lo cual le ha generado una importante demanda de la industria de alimentos saludables. Las nueces son usadas en pastelería, bisquetería, confitería y nevería. Es por el alto valor nutritivo, cuya almendra es rica en proteínas, carbohidratos, grasas (con 94% de aceites insaturados, que reducen el nivel de colesterol en la sangre), minerales, vitaminas y fibras (Puente-González, 2002) no existen antecedentes que tenga efecto inhibitorio.

*Punica granatum* L. Es una planta medicinal cuyo fruto posee propiedades terapéuticas. Algunos fitocomponentes del fruto de la granada muestran una actividad antioxidante potente y existen resultados experimentales que demuestran su capacidad como agentes antimutagénicos naturales (Sánchez-Lamar, 2005). Los taninos y los alcaloides son los principales constituyentes de la granada. La evaluación del contenido de polifenoles arrojó un porcentaje de 12 g de polifenoles/100 g de pericarpio de granada (Vit *et al.*, 2004).

Los polifenoles representan uno de los componentes abundantes en las tres especies vegetales mencionadas; la hidrólisis de estos compuestos genera monofenoles de alto interés médico-farmacéutico, alimentario, agronomico e industrial. En el presente trabajo se evaluó la efectividad antifúngica y antibacteriana de los extractos fraccionados de gobernadora, granada y nuez ricos en compuestos polifenólicos.

## **Hipótesis**

Las plantas del semidesierto mexicano como gobernadora, granada y nuez, poseen compuestos ricos en polifenoles los cuales tienen efectos inhibitorios sobre diferentes especies de hongos y bacterias fitopatógenos.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar la actividad biológica de extractos ricos en polifenoles sobre cepas de hongos y bacterias fitopatógenas.

### **Objetivos específicos.**

- 1.- Extraer los taninos de la gobernadora y de las cáscaras de la nuez y de la granada.
- 2.- Estandarización de el proceso de esterilización de placas de poliestileno para cultivos fungicos y bacterianos
- 3.- Evaluación de la actividad biológica de los extractos sobre cepas de hongos fitopatógenos.
- 4.- Evaluación de la actividad biológica de los extractos sobre cepas de bacterias fitopatógenas.

## Justificación

Tres de las especies más abundantes del semidesierto mexicano son la gobernadora (*Larrea tridentata* Cov.), la nuez (*Carya illinoensis*) y la granada (*Punica granatum*), estas especies presentan un contenido alto de compuestos polifenólicos, algunos de éstos, son los taninos hidrolizables y condensados, los cuales tienen funciones de protección contra mamíferos y microorganismos. Se sabe que los taninos en concentraciones altas son antinutricionales, pues contienen muchos grupos funcionales, los cuales reaccionan fácilmente con proteínas y polisacáridos, volviendo estos productos insolubles, y de ésta manera, impiden su absorción.

La distribución de los compuestos fenolicos en los tejidos y células vegetales varía considerablemente de acuerdo al tipo de compuesto químico que se trate, situándose en el interior de las células o en la pared celular. Debido a que no se le da un uso a la cáscara de la nuez y de la granada, en el presente trabajo se plantea aprovechar estos recursos, así como también aprovechar el recurso de la gobernadora y probar estos extractos como inhibidores del crecimiento de hongos y bacterias fitopatógenos.

La forma de inhibición de los extractos de gobernadora, nuez y granada sobre los microorganismos se lleva a cabo por diferentes mecanismos de acción, por ejemplo, afectando la permeabilidad de la membrana celular. Esta inhibición se lleva a cabo por compuestos fenolicos dentro de los que se encuentran los taninos hidrolizables , específicamente los galotaninos y el ácido tánico.

## LITERATURA REVISADA

### Gobernadora (*Larrea tridentata* Cov.)

La gobernadora es un arbusto muy común y ampliamente distribuido en el desierto de Norteamérica (Benson and Darrow, 1981). En México, la gobernadora se encuentra localizada en los Estados del Norte y se estima que cubre alrededor de 50 millones de hectáreas (González, 1968). Se ha observado que la altura de la gobernadora varía de 30 a 160 cm, con una cobertura un poco mayor que su altura. Una planta típica, en condiciones normales mide 45 cm, con una cobertura de 60 cm. Esta planta contiene aproximadamente 50 g de hojas y tallos que representa alrededor de 3/10 de su peso total (Botkin, 1949). El nombre científico de la gobernadora es *Larrea tridentata* Cov. y pertenece a la familia de las *Zigophyllaceae*, arbusto xerófito de olor fuerte. A medida que avanza la edad, el tronco se engruesa y el número de ramas aumenta. En plantas adultas el tronco es de 15 a 20 cm. El follaje está en su mayor parte al final de las ramas y su color varía dependiendo de las condiciones climatológicas. En condiciones extremas de sequía pierde hasta un 80% del área foliar (Sherve, 1964). La fecundación se lleva a cabo por medio de insectos y sus frutos son arrastrados por los animales o por el viento (Wettstein, 1994). La gobernadora en América se le conoce con diversos nombres, tales como: arbusto de cerosota, guamis, falsa alcaparra y hediondilla (Standley, 1961).

La gobernadora tiene muchos componentes según la caracterizaron fisicoquímicamente de Treviño Cueto *et al.*, (2006) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Composición fisicoquímica de la gobernadora (*L. tridentata*), porcentaje en materia seca, ( Tomado de Treviño Cueto *et al.*, 2006).

Componentes	%
Humedad	5
Sólidos totales	95
Azúcares reductores	1.6
Azúcares no reductores	12
Proteínas	0.01
Grasas	3.4
Fibra crudo	12.3
Ceniza	10.7
Taninos condensados	39.04
Taninos hidrolizables	22.8
Total	91.54

## Usos

- Adhesivo (hoja). Pegamento para triplay y cartón comprimido.
- Comestible (fruto). Los frutos son utilizados como sustitutos de las alcaparras.
- Especias (flor). El botón de la flor se emplea como condimento.
- Forrajero (hoja). Las hojas son importantes por su contenido de proteínas, lo que permite utilizarlas para consumo animal. Aunque se requiere de la eliminación previa de las resinas para incrementar su digestibilidad y palatabilidad.
- Industria [exudado (látex), exudado (resina)]. Para teñir cuero. Extracción de fenoles que sirven de base para fabricar pinturas y plásticos. La resina que se extrae de las hojas contiene ácido nordihidroguayarático, que se utiliza como antioxidante en la industria alimenticia, en la elaboración de grasas (calzado), aceites, lubricantes, barnices como desincrustante de materias salinas en calderas, productos farmacéuticos, hule.
- Insecticida/tóxica [exudado (resina), toda la planta].

- Las resinas muestran actividad fungicida contra *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium* spp. y otros hongos fitopatógenos. Actividad insecticida contra: gorgojo pardo del frijol (*Acanthoscelides obtectus*, Coleoptera: Bruchidae); barrenador mayor de los granos (*Prostephanus truncatus*, Coleoptera: Bostrichidae).
- Medicinal (hoja). Esta planta recibe un amplio uso en el norte del país, en afecciones de las vías urinarias como los cálculos renales, para deshacerlos, se recomienda tomar como agua de uso la cocción de toda la planta o las ramas.
- Para otros malestares como dolor de riñón e inflamación de vejiga, se utilizan las ramas, raíz o corteza en cocimiento, ingeridas en ayunas. En problemas ginecológicos como esterilidad femenina se sugieren lavados vaginales con el cocimiento de las hojas; también se emplea la raíz, ramas o corteza para el posparto y para regularizar la menstruación. La misma infusión es usada en baños para hemorroides, fiebre, paludismo, granos, golpes, buena cicatrización y reumatismo. La infusión de las hojas se usa como remedio para reuma, cálculos de vesícula y renales, dermatitis, hepatitis y como antiséptico.
- Se le atribuyen propiedades y acciones contra malestares gástricos, enfermedades venéreas y tuberculosis. Se utiliza como tratamiento para micosis.
- Saponífera [exudado (resina)]. Elaboración de jabones. Las resinas sirven para la elaboración de jabones y la fabricación de grasas para calzado.

([http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/70-zygop2m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/70-zygop2m.pdf)).

### **La Nuez (*Carya illinoensis*).**

El nogal pecanero es originario del sureste de los Estados Unidos de América y del Norte de México, es un árbol que puede superar los 30 metros de altura, muy vigoroso y longevo, que inicia su producción de los 6 a los 10 años de edad y continúa produciendo comercialmente durante más de 50 años. La fruta del nogal se considera una drupa, la cual consta de pericarpio, mesocarpio y

semilla (almendra). El pericarpio y el mesocarpio es una estructura segmentada en cuatro partes que al deshidratarse se abre dejando libre al endocarpio y a la semilla. A la porción del mesocarpio y endocarpio se le conoce como ruezno. Las nueces compuestas por el endocarpio y la semilla normalmente miden de 2 a 6 cm de largo y pesan de 4 a 12 g cada una. La semilla presenta dos cotidellones separados por un tabique central, los cuales provienen de los carpelos florales. El fruto del nogal es una nuez de alto valor nutritivo, cuya almendra es rica en proteínas, carbohidratos, grasas (con 94% de aceites insaturados, que reducen el nivel de colesterol en la sangre), minerales, vitaminas y fibras (Puente-González, 2002).

### **Usos.**

Medicinal, mediante la decocción de hojas y frutas evita la caída del cabello; la decocción de las hojas depura la sangre y controla las diarreas. Los almendros son comestibles, de sabor dulce y ricos en principios grasos; la corteza contiene taninos que sirven para curtir la piel (Torres, 2002).

### **Granada (*Punica granatum*)**

La *P. granatum* L. pertenece a la familia *Punicaceae* y es el árbol frutal de la granada (Vit et al., 2004). La granada es nativa de Asia Menor y Asia (Gisper et al, 2001). Los españoles la introdujeron en América, donde se extendió por todo el continente. En México habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado (<http://www.hipernatural.com/es/pltgranada.htm>). Se trata de un árbol o un arbusto (según la variedad y el manejo) de entre 5 y 10 m de altura. Las hojas son brillantes, verde oscuro, oblongas a ovals y de 2.5-3 cm. de longitud. Se disponen en forma opuesta o casi opuesta y están agrupadas en ramitas pequeñas. Las flores son de color naranja-roja, tienen un diámetro de 4-6 cm sus pétalos son arrugados y poseen numerosos estambres. Las flores se disponen solitariamente o en pequeños grupos orientados hacia el final de las ramitas. Las frutas de la granada tienen un color que varía de amarillo-carmelitoso a rojo-púrpura. Poseen un diámetro de 5-12 cm, y su cubierta es lisa y de textura

correosa; son esféricas, algo aplanadas y con un cáliz persistente, que puede tener una longitud de 1-6 cm ( Rodríguez, 1993).

## Usos

- Alivia la tos persistente, es eficaz en caso de fiebre, de diarreas y cólico.
- De los granos rosas de la granada, se extrae una bebida, el « sambu », utilizada en las curas de regeneración y de limpieza interna que, según sus preparadores, ayuda a perder sobrepeso ([http://es.wikipedia.org/wiki/Punica\\_granatum](http://es.wikipedia.org/wiki/Punica_granatum)).
- Otros padecimientos tratados son los parásitos intestinales como lombrices y solitaria. Se dice, además, que la granada trata el empacho, vómito, bilis, infección intestinal y fuegos bucales.
- Inflamación de las encías (gingivitis) y del tejido que sujeta los dientes a los maxilares (periodontitis o parodontosis). Su infusión se aplica en enjuagues bucales, y puede conseguir que se afiancen los dientes sueltos (<http://www.hipernatural.com/es/pltgranada.htm>).
- La corteza del fruto es rica en taninos hidrolizables, entre ellos punicalagina, punicalina y ácido elágico.
- El extracto metanólico y el cocimiento del pericarpio del fruto han mostrado actividad contra bacterias gram + y gram - ,asi como también actividad contra hongos.
- El jugo obtenido tanto de los arilos de las semillas como del fruto entero ha mostrado una fuerte actividad antioxidante, debida principalmente a los taninos hidrolizables y en especial a la punicalagina cuando se trata del zumo de fruto ( [http://www.balansiya.com/ingredientes\\_granada.htm](http://www.balansiya.com/ingredientes_granada.htm)).

## Polifenoles

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas; son considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad; englobando más de 8.000 compuestos distintos. Su forma más frecuente es la de polímeros o lignina

insoluble, mientras que su presencia en los tejidos animales está relacionada con el consumo e ingestión de alimentos vegetales. La distribución de los compuestos fenólicos en los tejidos y células vegetales varía considerablemente de acuerdo al tipo de compuesto químico que se trate, situándose en el interior de las células o en la pared celular (Martinez *et al.*, 2000).

### **Descripción General de los Taninos**

Muchos autores usan la palabra tanino en forma generalizada, pero esto es erróneo, debido a que no solo se trata de un único compuesto. Lekha y Lonsane (1997), reportaron que la terminología relacionada con el tema es muy pobre, sobre todo en la literatura antigua, y criticaron la forma usada por Haslam (1966) y otros autores para referirse al ácido tánico como “taninos”. Lekha y Lonsane (1997), sugirieron que el término correcto debe de apegarse a la clasificación de los compuestos fenólicos en cuestión. El término fue introducido a finales del siglo XVIII para definir sustancias orgánicas solubles en agua, presentes en extractos de hojas, corteza, maderas, frutas y agallas de ciertos helechos, gimnospermas y angiospermas; capaces de curtir pieles convirtiéndolas en cueros impermeables que son resistentes al ataque de bacterias, al calor y a la abrasión (Swain, 1979).

Los taninos son compuestos orgánicos no nitrogenados, amorfos, de sabor astringente, débilmente ácidos, la mayoría solubles en agua, sólo unos pocos en solventes orgánicos; son de color amarillo, rojo, o café y se localizan en el citoplasma y vacuola de la célula como metabolitos secundarios (Sora, 1984; Esau, 1997; Fahn, 1974).

Los polifenoles con pesos moleculares de 500 a 3000 Daltons son los más satisfactorios para esto (Halsman, 1966). El término “fenólico” es usado para definir composición y biodegradación fúngica de compuestos polifenólicos de plantas del semidesierto Mexicano, sustancias que poseen uno o mas grupos hidroxilo (OH) unidos a un anillo aromático. El nombre deriva de la sustancia fenol. Los compuestos que tienen algunos o muchos sustituyentes hidroxil

fenólicos son llamados polifenoles. Sin embargo, no todos los grupos hidroxilo son fenólicos, debido a que no poseen las propiedades de un fenol (Waterman, 1992). Una propiedad importante de los grupos hidroxil fenólicos es su acidez, la cual se debe a la facilidad de rompimiento del enlace entre el oxígeno e hidrogeno y formar el ion fenoxido cargado negativamente (Haslam, 1989).

### Clasificación de los taninos

#### Taninos hidrolizables (HT)

Este grupo involucra un alcohol polihidrico esterificado con ácido gálico o alguno de sus derivados. Constituidos por ésteres de glucosa u otros polioles, ácido elágico, digálico, m- digálico, hexahidroxidifénico o sus congéneres (Figura 1). Los grupos hidroxilos de estos carbohidratos están parcialmente o totalmente esterificados con grupos fenólicos como el ácido gálico o ácido elágico. Por hidrólisis con ácidos, bases y enzimas hidrolíticas se rompe el enlace glucosídico para liberarse azúcar y los compuestos fenólicos que lo integran (López 1989). Los taninos hidrolizables incluyen: Galotaninos y elagitaninos los cuales a continuación se describen, de los cuales el pentagalolilglucosa es el precursor.

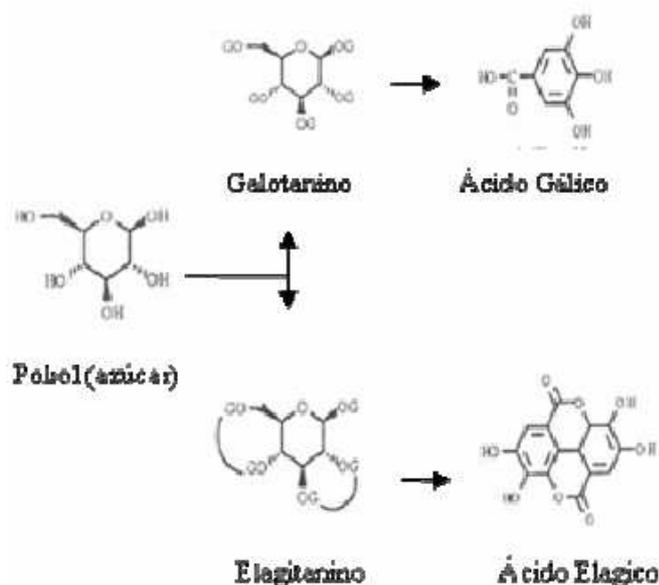


Figura 1. Estructuras básicas de Taninos Hidrolizables

## **Galotaninos.**

Son compuestos que consisten de una molécula central de glucosa, la cual es rodeada por algunas unidades de ácido gálico. Por hidrólisis se obtiene ácido gálico mas azúcar (Mueller-Harvey, 2001). La fuente más famosa de galotaninos es el ácido tánico de origen vegetal, el cual tiene una molécula central de D-glucosa y de 5-9 unidades más de galoilos ligados a uno de los centros del núcleo glucósido. Así también podemos mencionar al que se obtiene de los frutos de la tara (*Caesalpineae tinctoria*), este tanino es fácilmente hidrolizable por la acción de la enzima tanasa, con un peso molecular aproximado de 800 Da (Sánchez, 2001).

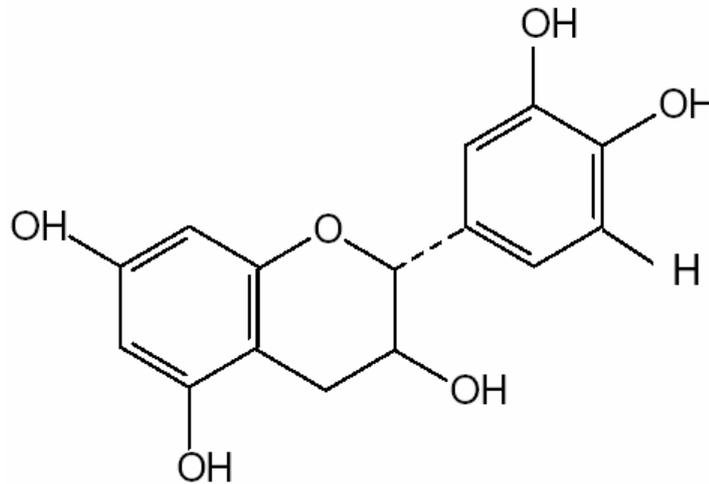
## **Elagitaninos.**

Son compuestos derivados del pentagaloilglucosa por reacciones de oxidación entre las unidades de ácido gálico (Mueller-Harvey, 2001). Por hidrólisis dan ácido elágico (+ azúcar) o un derivado como hexahidroxifénico. Los grupos fenólicos consisten de ácido hexahidroxifénico, el cual espontáneamente se deshidrata a la forma lactona, conocida como ácido elágico. El peso molecular promedio es de 2000-5000 g/mol. Dentro de los elagitaninos podemos citar como ejemplo al corilagin, primer tanino aislado del div-divi (*Caesalpineae corarea*) y del mirabolano (*Terminalla chebula*). El isorugosin B, aislado de Liquidambar, es otro ejemplo (Alnicolsa, 2001).

## **Taninos Condensados o Proantocianidinas**

El término proantocianidinas (PAS), se deriva de la reacción de oxidación que produce antocianidinas (ACS) rojas en soluciones de alcohol ácido. Son polímeros de flavan 3-ol (catequina) y flavan 3-4 diol (leucoantocianidina) y no poseen residuos de azúcar. Su contenido de carbohidratos es nulo o muy bajo. Por ser polímeros grandes tienen un alto peso molecular (1000 a 3000 daltons), lo que les da una relativa inmovilidad (Figura 2). Su complejidad y facilidad para formar enlaces con proteínas hacen difícil su estudio. (Schofield, 2001).

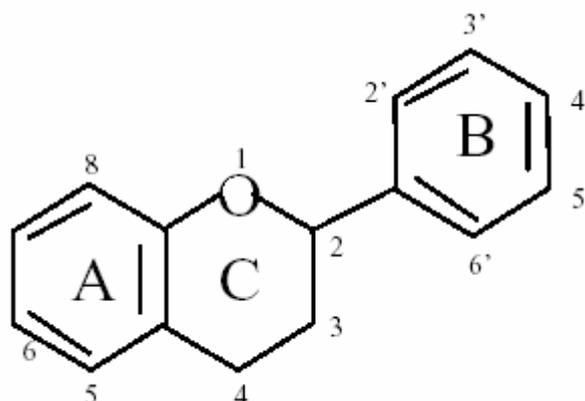
Los taninos condensados incluyen los flavonoides; que a su vez se subdividen en antocianidinas y leucoantocianidinas y la catequina.



**Figura 2. Estructura de Proantocianidina**

### Flavonoides

Los Flavonoides (Figura 3) son compuestos polifenólicos distribuidos ampliamente en los vegetales, frutas y en determinadas bebidas como el té y el vino rojo y poseen actividad antioxidante. Al igual que las vitaminas A, C y E estos compuestos evitan la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y presenta un efecto protector sobre el estrés oxidativa (como cardiopatías y cáncer), que se origina, por alguna razón cuando hay un aumento en la producción de radicales libres y son insuficientes las defensas antioxidantes del organismo (Sánchez, 2001).



**Figura 3. Estructura básica del anillo de un flavonoide (Haslam, 1977).**

## **Antocianidinas**

Son pigmentos principales en flores, tallos, hojas y frutos. El color depende del pH y de la sustitución en el anillo B (Chen and Hrazdina, 1981). Varias antocianidinas, tales como la leutolinidina, cianidina y la apigeninidina, han sido reportadas en el sorgo, siendo la primera y la última producidas por un flavan-4-ol, el cual ha sido encontrado en las hojas y el grano (Watterson and Butler, 1983). Las antocianinas son muy inestables en un medio ácido y son fácilmente convertibles a su correspondiente antocianidina aún en solventes ligeramente ácidos. Esto hace difícil determinar si una pigmentación proviene de una antocianina o de una antocianidina (Butler, 1982).

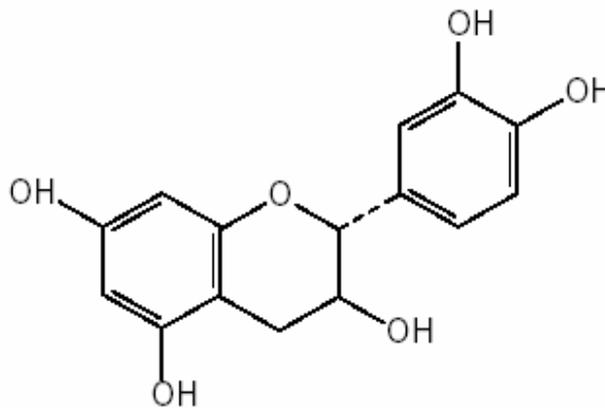
## **Leucoantocianidinas**

Las leucoantocianidinas son moléculas de flavan 3-4 dioles (hidroxilo en C3-C4). Son compuestos incoloros que producen antocianidinas rojas cuando se les trata con ácido (Watterson Y Butler, 1983).

## **Catequinas**

Las catequinas (Figura 4) difieren ligeramente en su estructura química de otros flavonoides, pero comparten con ellos sus propiedades químicas. Las catequinas más comunes son los ésteres gálicos, llamados epicatequinas (EC), galato de epicatequina (GEC) y el galato de epigalocatequinas (GEGC). Todos estos compuestos se encuentran en el té verde (*Camelia sinensis*) y se cree que son responsables de los beneficios protectores de esta bebida. Los tés verdes y negros son productos de la misma planta. El té verde no es fermentado y contiene catequinas naturales tales como la epigalocatequina. El té negro es fermentado y luego secado. El proceso de fermentación oxida las catequinas naturales formando teaflavinas y tearubiginas que le dan al té el color negro. La catequina es un compuesto fenólico, que se encuentra en los taninos del vino tinto y al que se le atribuyen efectos benéficos para la salud gracias a su poder antioxidante.

Las plantas que presentan catequina en su estructura son: *Krameria triandra* (raíz de ratania). Antidiarreico, astringente. *Combretum micranthum* (combreto), *Areca catechu* (nuez de betel), *Camelia sinensis* (té común). Por lo general los taninos catéquicos actúan más que nada como astringentes, antidiarreicos y hemostáticos. Como antidiarreicos pueden generar por administración oral irritación gástrica. De ahí que se suelen administrar combinados con albúmina o gelatina. En cambio las leucoantocianidinas presentan actividad antioxidante y vasculoprotectoras.



**Figura 4. Estructura Básica de la Catequina.**

### **Importancia de los Taninos**

#### **Importancia biológica de los taninos.**

1. Estos compuestos actúan como repelentes naturales contra predadores y microbios. Pueden ayudar de esta manera a proteger la planta.
2. Presentan un efecto tóxico contra patógenos potenciales en ciertos tejidos de la planta produciendo resistencia al ataque de virus y microorganismos. Donde los taninos se polimerizan se forma una barrera protectora insoluble, la cual previene el ataque microbiano.
3. Por su astringencia destruye los tejidos del paladar a través de la precipitación de proteínas salivales (Stumpf y Conn, 1981).
4. Su particular facilidad para combinarse con proteínas y otros polímeros de celulosa y pectina, limita la disponibilidad de proteínas para los animales, inhibe la

acción de algunas enzimas y en general reduce la energía metabolizable (Méndez y Pro, 1984).

5. En frutos no maduros promueven la astringencia, pero al madurar se polimerizan y se elimina el sabor astringente, es decir es un mecanismo de defensa contra insectos nocivos (Olivares, 1983).

6. Tienen un efecto negativo en el suelo al formar enlaces con las proteínas y otros polímeros; disminuyendo por lo tanto el nitrógeno disponible para los microorganismos del suelo (Olivares, 1983).

7. La concentración de taninos varía el sabor del fruto, por ejemplo, en la sidra y la vid, con pocos taninos el sabor es flojo e insípido y con una gran concentración le da una condición demasiado áspera (Stumpf y Conn, 1981).

### **Importancia industrial de los taninos.**

Por sus propiedades intrínsecas los taninos se utilizan como tintes (café, amarillo, rojo), plásticos, conservadores de pesca, para controlar los lodos en los pozos de perforación de petróleo y principalmente para curtir pieles de animales (FAO, 1953).

En curtiduría son importantes por la propiedad de precipitar gelatina y de combinarse con el colágeno y otras materias proteicas contenidas en la piel de los animales, de tal manera que al ponerlos en contacto, éstas se vuelven impermeables e imputrescibles, es decir, se protegen las fibras proteicas de ataques microbianos y en general se da al producto gran estabilidad al agua, calor y abrasión; durante este proceso la piel puede absorber taninos por mas de la mitad de su peso (Solis, 1953; Halsman, 1966; Fernández y Prida, 1977; Olivares, 1983).

### **Importancia agropecuaria de los taninos**

Se ha visto que los compuestos tanicos presentes en granos como sorgo y frijol constituyen un factor limitante dentro de la calidad nutritiva de estos (Burs, 1971, Maxon *et al.*, 1972; Jambunathan y Hertz, 1973; Elias y Bressami, 1979).

En sorgo la calidad del grano depende de su capacidad alimenticia. Sustancias energéticas como el almidón que normalmente constituye el 70-75% (Chavan *et al*, 1979) disminuye conforme aumentan los taninos (Halloran, 1983); así también, la energía metabolizable se correlaciona negativamente con el contenido de taninos (Méndez y Pro, 1984).

### **Extracción y Cuantificación Química de los Taninos**

El objetivo de la extracción es muy simple: remover todas las sustancias polifenólicas del residuo sólido del material vegetal por la obtención de estos en solución. Físicamente se tratan con procesos de solvatación y difusión. Los fenoles pueden extraerse de la muestra si son muy solubles en el extraente y si su concentración en el extractor es relativamente baja y si la temperatura es alta (Waterman y Mole, 1994). Estas condiciones varían dependiendo de la planta. Algunos fenoles presentes en arbustos de resina, son insolubles en agua pero solubles en solventes no polares. Otros como algunos glucósidos fenólicos, son más solubles en agua. Si una planta es extraída previamente para el análisis de fenoles totales se debe de usar un solvente en el cual todos los fenoles de la planta se puedan disolver, como por ejemplo metanol o acetona (Foo y Porter, 1980; Cork y Krockenberger, 1991).

El problema general en el estudio de productos de plantas naturales es que su naturaleza y cantidad son dependientes sobre varios factores que deben de ser controlados tan pronto como sea posible. Algunos de estos factores son; el estado metabólico de la planta que puede cambiar cuando esta es estresada de muchas maneras, causando un problema para su análisis. En las células muertas, la integridad celular se pierde y como resultado se incrementan los procesos de oxidación que es un problema con los fenoles ya que estos son propensos a oxidación. Si una planta es cortada y secada bajo condiciones ambientales, que requieren de largo tiempo de secado, pueden cambiar la naturaleza y contenido de los compuestos polifenólicos; así mismo la edad las hojas y etapa de desarrollo. También se sabe que la luz cambia la naturaleza de los fenoles (Seevers y Daly, 1970; Martin y Martin, 1983; Glyphis y Puttick, 1988).

Los puntos clave para la obtención de los taninos son: 1) Extracciones de corto tiempo ya que extracciones muy largas a temperaturas muy altas pueden conducir a la degradación y pérdida de fenoles, 2) la preparación del extracto fresco debe ser usado para el análisis de taninos inmediatamente, 3) los tubos que contienen el extracto pueden ser colocados en hielo, 4) los pigmentos y la grasa pueden ser removidas de la muestra seca por extracción con dietil eter que contenga 1% de ácido acético antes de la extracción de taninos (Lindroth *et al.*, 1987).

La espectrofotometría es una de las técnicas de medición cuantitativa más sencilla y una de las más valiosas. Esta medición involucra la cantidad de luz de una longitud de onda particular (UV o visible 220-850nm) que es absorbida por una muestra líquida. La medición puede ser usada para determinar la concentración de una sustancia particular o grupo de sustancias (Price y Butler, 1977). Los estados de la fracción de luz absorbida por una solución es proporcional a: 1.- La distancia en que la luz viaja a través de la solución, 2.-La química de la sustancia o parte de la sustancia responsable de absorber la luz (cromóforo) y 3.- La concentración de este cromóforo. Al utilizar el espectrofotómetro para el análisis de fenoles es necesario usar una reacción química que produzca una coloración específica que proporcione la cantidad fenólica presente en el material (Price y Butler, 1977).

Muchos estudios reportan las mediciones de fenoles totales en materiales biológicos. La base conceptual de las mediciones es la cuantificación total de grupos fenólicos hidroxilo presentes en los extractos, independientemente de las moléculas en las cuales ellos ocurran. Tales análisis no proveen la información del compuesto fenólico presente (Folin y Denis, 1912).

Para la cuantificación de rutina de taninos condensados se recomienda usar el método de proantocianidinas y vainillina; en donde el primero involucra la depolimerización de taninos condensados al utilizar ácido clorhídrico-butanol proporcionando una red de antocianina que puede ser detectado espectrofotométricamente (Delcour y de Varebeke, 1985). El método de la

vainillina es usado para tener una estimación de polímeros de taninos condensados por medición espectrofotométrica, este método es técnicamente difícil por lo que no es apropiado para los taninos condensados, pero sin embargo es intentado. Los dos métodos de trabajo tienen diferencias y pueden dar amplia variedad de resultados para algunos taninos (Porter, 1989).

Thies y Fischer (1972) desarrollaron un método para la determinación de ácido gálico, la base de la reacción consiste en la intensificación del color producida por la reacción entre el ácido gálico y la rodanina.

Wilson y Hagerman (1990) observaron la reacción de los elagitaninos o su producto de hidrólisis, hexahidroxidifenico (HHDP) con nitrato de sodio, hasta la formación de un cromóforo nitrosilado, que es utilizada para la medición de elagitaninos. Ambas reacciones pueden ser medidas espectrofotométricamente.

### **Aplicación de los Taninos**

Como ya se mencionó, ambos taninos hidrolizables y condensados, se emplean en la industria de cuero, permitiendo obtener una amplia variedad de cueros, que se diferencian en flexibilidad y resistencia. Los taninos condensados se usan principalmente en la fabricación de adhesivos y resinas. Por ejemplo, aquellos que han sido aislados de especies de Acacia, han servido para desarrollar adhesivos en frío y termofraguados, por tratamiento con ureaformaldehído, o con copolímeros fenol formaldehído, estos últimos usados en la fabricación de enchapas de madera a prueba de agua.

Los taninos hidrolizables se emplean en la industria de alimentos, farmacéutica y en cervecería. En este último campo, se usan como estabilizadores de la cerveza: en el producto, los polifenoles se combinan con las proteínas para formar complejos que precipitan y disminuyen la presencia de turbidez. El nivel de proteínas disminuye a un valor apropiado y se aumenta así el tiempo de almacenamiento de la cerveza (Alnicolsa, 2001). En la industria de alimentos también se emplean en la preservación y maduración de alimentos, aprovechando

sus propiedades antisépticas y antioxidantes; así como en la clarificación del vino. Su aplicación en otros campos está orientada a la extracción de plomo, fierro, calcio, bario y radio presentes en soluciones, por co-precipitación con gelatina y taninos; al efecto anticorrosivo en superficies de fierro, expuestos al medio ambiente; y en empleo en la elaboración de tintas; como recubrimiento protector de zinc y aleaciones.

## Descripción de los Fitopatógenos

### Damping off causada por *Pythium sp*

**Características generales.-** Forma un micelio blanco, filamentoso, profusamente ramificado y de rápido crecimiento. El micelio produce esporangios terminales o que pueden ser de forma esférica filamentosa o de cualquier otra. Los esporangios germinan directamente y produce de uno a varios tubos germinales, o bien forma una hifa corta en el extremo de la cual se forma una vesícula. Cuando las zoosporas son liberados, nadan en el agua durante unos minutos, entran en reposo, se enquistan al envolverse en una cubierta protectora y germinan al producir un tubo germinativo (Agrios, 2004).

**Habitat.-** Viven como organismos saprófitos sobre los restos de plantas y animales muertos, bien como parásitos benignos atacando a las raíces fibrosas de las plantas. Cuando un suelo húmedo se encuentra densamente infestado por *Pythium*, este hongo ataca todo tipo de semillas o las plántulas que se emerjan de aquéllos (Agrios, 2004). Sobrevive en el suelo principalmente como oosporas en sustratos en podredumbre, donde pueden permanecer muchos años (Smith *et al.*, 1992).

**Síntomas.-** La pudrición de raíces y tallo por *Pythium*, se manifiesta primero por un amarillamiento, achaparramiento o una marchitez de la planta. Las raíces pueden tener pequeñas lesiones, las puntas de la raíz y raíces laterales pueden estar ligeramente afectadas (Agrios, 2004; Tlapal, *et al.*, 2002).

**Importancia económica.-** Esta enfermedad que afecta semillas, plántulas y plantas adultas, los daños más importantes son los que sufren las semillas y las raíces de las plántulas durante su germinación, ya sea antes o después de que emerjan del suelo. Las pérdidas debidas a esta enfermedad varía considerablemente de acuerdo con la temperatura, humedad del suelo y otros factores (Tlapal *et al.*, 2002).

### ***Marchitez causado por Fusarium solani***

**Características generales.-** En general produce sólo esporas asexuales, aunque bajo ciertas condiciones se produce un fase peritecial identificada como *Nectria haematococca*. Las esporas asexuales se forman en esporodoquios e incluyen microconidios formados por un o dos células, así como los macroconidios típicos de *Fusarium*, que consisten de 3 a 9 células (a menudo 4 ó 5), levemente encorvados y con extremos más o menos puntiagudos. *Fusarium* también produce clamidosporas de pared gruesa y formadas por una o dos células que soportan la sequía y las bajas temperaturas. Presentan hifas delgadas intracelulares o intercelulares, vive como parásito sobre plántulas o bien como saprofito en el suelo (Agrios, 2004).

**Habitat.-** El hongo vive en los tejidos vegetales muertos e inverna en forma de micelio o esporas en las semillas o en los tejidos muertos o infectados. Las esporas son fácilmente diseminados por el viento, el equipo agrícola, el agua, por contacto, etc., de ahí que el hongo se encuentre ya en forma de micelio o esporas en muchos suelos (Agrios, 2004; Smith *et al.*, 1992).

**Síntomas.-** Los primeros síntomas de la marchitez por *Fusarium* es un aclareo de venas en los márgenes de hojas jóvenes, seguido por epinastia en hojas viejas, causado por el doblamiento de los peciolo en ángulo inferior. Este es seguido por la disminución del desarrollo de la planta, amarillamiento, formación de raíces adventicias, marchitez durante las horas calientes del día, pero hay un recuperación en las horas frescas de la tarde, después esta

marchites se vuelve permanente, seguido de defoliación, necrosis marginal y muerte de la planta (Smith *et al.*, 1992).

**Importancia economica.-** Sánchez en 1983 Citado por Martínez (1993) indica que en México se identifico a *F. oxysporum* y *F. solani* afectando el cultivo de chile, y caracterizado como un problema principal en las zonas productoras del país, sobre todo en Durango y Zacatecas, estos patógenos ocasionan de un 50 a 60 % de perdidas.

La enfermedad representa un serio problema en las principales áreas productoras de esta hortaliza en el mundo, siendo más destructiva en regiones con clima cálido. Puede causar perdidas muy severas, principalmente cuando se siembran cultivares susceptibles bajo condiciones favorables para el patógeno. Produce marchitamientos principalmente en flores y hortalizas anuales, plantas de cultivo, etc. (Agrios, 1988).

**Marchitez causada por *Fusarium oxysporum* (Sheld.) Zinder y Hansen)**

**Característica generales.-** Micelio blanco o ligeramente obscuro pero usualmente con tintes púrpuras. Microconidios originados sobre fialides simples, variables, de ovales a elipsoidales cilindricos, de rectos a curvos, con un tamaño de 5-12 x 2.2-3.5 $\mu$ ; con 5 septas, 35-60 x 3-5 $\mu$ ; de 6 a 7 septas, 50-60 x 3.5-5 $\mu$ . Las clamidosporas generalmente son abundantes, terminales e intercalares, generalmente solitarias pero ocasionalmente formadas en pares o grupos de tres (Holliday, 1980).

**Habitat.-** El patogeno inverna en el suelo en forma de micelio y en cualquiera de sus formas de esporas, pero lo hace con mayor frecuencia en forma de clamidospora. Se propaga a cortas distancias a través del agua y el equipo agrícola contaminado, y a grandes distancias principalmente en los trasplantes infectados o en el suelo que va en ellos. Es frecuente que una vez que un área haya sido infectado por *Fusarium* se mantenga así por un tiempo indefinido.

El hongo se propaga intercelularmente a través de punteaduras. Se mantiene entonces exclusivamente en los vasos xilémicos, se desarrolla a través de ellos, principalmente en sentido ascendente hacia el tallo y la corona de la planta (Agrios, 2004).

**Síntomas.**- Se caracteriza por el achaparramiento de las plantas, las clorosis y en poco tiempo se marchitan y finalmente mueren, mostrando también una coloración café en el xilema (Agrios, 2004).

**Importancia económica.**- El marchitamiento causado por *Fusarium* es una de las enfermedades más prevalentes y dañinas de tomate siempre que las plantas se cultiven intensivamente. La enfermedad es más destructiva en climas cálidos y en suelos cálidos y arenosos de las regiones templadas. La enfermedad puede ocasionar pérdidas considerables, especialmente en variedades susceptibles y bajo condiciones climáticas favorables. En México se ha observado su presencia en los Estados de Guanajuato, Morelos, México y Michoacán (Mendoza, 1996).

**Putrefacción de los granos causado por *Fusarium verticillioides*** sinónimo de *Fusarium moniliforme*

**Características generales.**- Hongos con micelio septado, presencia de reproducción asexual por conidias, ausencia de una fase de reproducción sexual son características primordiales para ser clasificados como hongos imperfectos en los cuales se tienen clasificado a *Fusarium verticillioides*.

Alexopoulos (1979) describe a *Fusarium verticillioides* con microconidias unidas en cadenas en forma de cabezuelas falsas, unicelulares o bicelulares, en forma de huevos de coloración que va desde el amarillo hasta rosado. Macroconidias que tienen forma de punto en los dos extremos con el ápice algunas veces en forma de gancho, con células en la parte de abajo que puede ser verdadera o falsa y estos pueden estar agrupados, presenta color salmón al perder humedad, también podemos encontrar las septas que en ocasiones van

de tres, cinco y hasta siete. Romero (1988) citado por Mendoza (1996) menciona que el estado perfecto de *Fusarium verticillioides* en *Gibberella fujikuroi*.

**Habitat.-** *F. verticillioides* forma peritecios en raras ocasiones. Estos hongos invernan en forma de peritecios, micelio o clamidiosporas en restos de plantas infectadas, particularmente en los tallos del maíz. En la primavera, cuando el clima es cálido o húmedo, las ascosporas maduras son liberados y llevadas por el viento hacia los tallos o mazorcas de maíz, en los cuales penetran directamente o a través de heridas y producen infecciones (Agrios,2004).

**Síntomas.-** Fuentes (1960) reporta que los síntomas de infección por *Fusarium verticillioides* se denota al encontrarse un color rosado a rojizo hasta llegar al gris al extirpar el totomoxtle de la mazorca, encontrándose que la pudrición invade a un grano o grupo de ellos.

**Importancia económica.-** Según Agrios (2004), Las enfermedades del complejo de *Giberella* causa pudrición de tallo, suele causar pérdidas entre 10 y el 30%. Las enfermedades del maíz ocasionadas por *Giberella*, se encuentran ampliamente distribuidas por todo el mundo y causan pérdidas importantes.

### **La pudredumbre de almacén de papa causado por *Fusarium sambucinum***

**Características generales.-** Los cultivos en medios ligeramente ácidos son rosa al principio, haciéndose rojo sangre, con conidiforos (principalmente en esporodoquios) que producen macroconidias septados. En cultivos estériles sobre paja se desarrollan peritecios si se inoculan los tipos de apareamiento adecuados; en campo los peritecios sólo se encuentran normalmente sobre canchales en plantas leñosas (Smith *et al.*, 1992).

**Habitat.-** La especie es frecuente en regiones templadas septentrionales y en el mediterráneo (Smith *et al.*, 1992).

**Síntomas:-** Según Smith *et al.*, (1992) causa la pudredumbre de almacén de papa, de podredumbres de la raíz y de plántulas de distintos cereales, causa anillo del tallo, se acompaña a menudo por hiperplasia, inmediatamente por encima de la lesión y enseguida aparecen pústulas conídicas, de color rosa en condiciones húmedas; hay una marchitez rápida de hojas con clorosis y necrosis; los cambios de coloración del sistema vascular se limitan a unos pocos centímetros por encima de la lesión.

**Importancia económica.-** La enfermedad es esporádica e imprescindible y sólo causa pérdidas económicas secundarias (Smith *et al.*, 1992).

### **Pudrición del cuello y marchitez por *Rhizoctonia solani***

**Características generales.-** Este hongo pertenece al orden Micelia sterilia por que no produce conidios, el micelio es incoloro, cuando es joven, cuando envejece se torna café, la característica es su ramificación en ángulo recto de 90° y constricciones muy marcadas en las septas, la ramificación se origina subterminalmente a donde termina la septa (Mendoza, 1996).

**Habitat.-** Las condiciones que favorecen la incidencia de la enfermedad son exceso de humedad en el suelo y temperatura alrededor de 18° C o mayores. El hongo ocasionalmente produce estructuras de resistencia llamados microesclerocios como piedrecillas negras las cuales quedan adheridos a la raíz dando el aspecto de que estuviera impregnado de lodo. En plantas suculentas como clavel, gladiola, etc., se puede observar el micelio como filamentos de color café a la altura del cuello de la raíz. Esto lo diferencia de *Fusarium*; además de que *Fusarium* se puede observar constricciones de color rosado en la raíz debido a que la epidermis se agrieta y se forman los conidios (Mendoza, 1996).

**Síntomas.-** Según Tlapal y Mendoza (2002) ,si las plantas se infectan a través de las raíces, el primer síntoma notable es una marchitez durante el día con recuperación en la noche. Las raíces dañadas decaen rápido y se pueden desarrollar lesiones café rojizas abajo del suelo.

**Importancia económica.**-Las pérdidas que ocasiona van desde el 20 al 50% de plantas muertas en siembras directa; además de esta pérdida se deben agregar los gastos por replante, diferencias en maduración y reducciones en rendimiento (Mendoza,1996).

### **Punteado negro en tomate y papa *Colletotrichum coccodes***

**Características generales.**- Este patógeno se desarrolla en una variedad de medios de cultivo, incluyendo papa dextrosa agar (PDA), desarrollando un micelio blanco superficial, después de un tiempo, las hifas se convierten en esclerocios. Los conidioforos del hongo son subhialinos, miden de 10-30  $\mu$  de longitud, son cilíndricos y cónicos. Los conidios son unicelulares, hialinos, rectos o curvos; en masas presentan coloraciones que van de amarillo hasta rosa. Los esclerocios miden desde 100  $\mu$  hasta 0.5 mm de diámetro, están arreglados en círculos concéntricos y tienen acervulos que producen numerosas esporas y setas (Calderoni, 1978; Hooker, 1990).

**Habitat.**- Las enfermedad se ve favorecida por las temperaturas elevadas y baja humedad o escasez de agua en el suelo (Calderoni, 1978). Agrios (2004) menciona que el hongo inverna en los restos de las plantas infectadas, así como en tubérculos. Posteriormente los conidios son liberados solo cuando los acervulos se encuentran húmedos, y son generalmente diseminados por la lluvia, transportados por el viento al entrar al contacto con los insectos, otros animales, herramientas, etc. Los conidios germinan solo en presencia de agua.

**Síntomas.**- Calderóni (1978) menciona que los síntomas más notorios aparecen en el tallo subterráneo a partir de las yemas que le dieron origen. Los tejidos externos se pudren y en tallos se observan numerosos puntos negros. Estos síntomas se advierte así mismo, en las raíces y estolones.

**Importancia económica.-** Este patógeno produce escasos daños en plantas o tubérculos; sin embargo demerita la calidad y disminuye el precio de venta en el mercado (Calderón, 1978).

**Antracnosis causado por *Colletotrichum truncatum*.**

**Característica generales.-** *Colletotrichum truncatum* (Schw.) produce inicialmente micelio blanquecino casi siempre de aspecto algodonoso, de crecimiento radial y acérvulos oscuros a negros, agrupados, numerosos, con abundantes setas negras, largas, rígidas, con producción de abundante cirros cremosos, de color blanquecino constituidos por conidios hialinos, unicelulares, ahusados, curvos, (<http://www.unne.edu.ar/cyt/2002/05-Agrarias/A-058.pdf>).

Este hongo tiene la capacidad de invernar sobre restos de cultivo, en hojas enfermas, y hospedantes alternos como las malezas, pero sobretodo puede sobrevivir por más de 10 años en semillas infectadas. Aunado a esto, la importación de altos volúmenes de semilla con fines propagativos incrementan la posibilidad de establecimiento en las zonas productoras del país donde se encuentren las condiciones adecuadas para su desarrollo. Este hongo se desarrolla favorablemente solo cuando se presentan condiciones de clima caluroso y una elevada humedad relativa, la temperatura óptima para su desarrollo es de 25 °C. Sin embargo, existen reportes donde se menciona que este patógeno es capaz de sobrevivir por años.

**Habitat.-** Para que los conidios de este hongo germinen y puedan formar un apresorio, requieren de temperaturas inferiores a los 35 °C y la presencia de agua libre sobre la superficie de la planta por períodos 12 h o más, el tubo germinativo penetra por los estomas o a través de la epidermis y cuando se presentan condiciones de alta humedad relativa y altas temperaturas, se producen abundantes acervulos oscuros sobre los tejidos afectados. Sin embargo, se reporta que este patógeno es capaz de sobrevivir por más de 10 años cuando la semilla es almacenada a 5 °C. Por lo que este patógeno puede permanecer viable por largos periodos de tiempo en espera de condiciones

óptimas para su desarrollo y considerando que la semilla a importar es para fines propagativos se incrementa la posibilidad de que este patógeno se establezca en varios estados del país.

**Importancia económica.-** De acuerdo a la revisión realizada en distintas fuentes bibliográficas existen pocos reportes que hablen sobre las pérdidas ocasionadas por el patógeno, sin embargo, se reporta que este hongo afecta principalmente a especies de la familia Fabaceae como son el frijol, lenteja, alfalfa y la soya, los cuales son cultivos ampliamente distribuidos y con relevante importancia económica en diferentes estados del país, ([http://www.cofemermir.gob.mx/uploadtests/2544.66.59.12.Veza\\_Australia\\_4.doc](http://www.cofemermir.gob.mx/uploadtests/2544.66.59.12.Veza_Australia_4.doc)).

#### ***Moho negro por Alternaria alternata***

**Característica generales.-** El micelio de *A. alternata* en medio de Papa Dextrosa Agar (PDA) al principio es blanco, pero se torna a un gris oscuro con bordes blancos en 48 h. Los conidióforos son café olivo y septados. La conidia es ligeramente café oscuro, usualmente con tres a cinco septas y con una septa longitudinal en la segunda y tercera célula. La conidia se desarrollan en números de tres a cuatro por cadena (Jones, 1997)

**Habitat.-** Este hongo es saprófito y causa enfermedades en frutos, la infección ocurre cuando las esporas son dispersadas por aire, sobre la planta o cuando la planta entra en contacto con suelo infestado y en el fruto por heridas penetra por la cutícula o pericarpio. Plantas poco vigorosas o estresadas son más susceptibles; incrementándose la susceptibilidad con la falta de nutrientes (Jones, 1997).

**Síntomas.-** En hojas y frutos se presentan manchas alargadas café oscuro a negro, con anillos concéntricos. Las áreas afectadas se oscurecen ligeramente hasta que la planta muere. En el fruto estas manchas son firmes, hundidas y a veces con anillos concéntricos con un denso gris oscuro a verde olivo, sobre estas lesiones se producen abundantes fructificaciones (Jones, 1997).

**Importancia económica.-** Este hongo esta presente en todos los continentes causando daños importantes, produce muerte de plantas y puede dañar el fruto y afecta el rendimiento. Las lesiones en el fruto disminuye su valor comercial. Ataca zanahoria, papa, berenjena y otras solanáceas cultivadas o malezas, entre otros muchos hospederos. Sobrevive de una estación a otra y tal vez más, en el suelo y restos de plantas enfermas (Agrios, 2004).

## **Decripción de las Bacterias Fitopatogenas**

### **Importancia de las bacterias**

Las bacterias fitopatógenas ocasionan el desarrollo de diversos tipos de síntomas en las plantas, producen manchas y tizones foliares, pudriciones blandas de frutos, raíces y órganos almacenados, marchitamientos, crecimientos excesivos, hipertrofias, malformaciones, sarnas, canchales, etc. 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 (Agrios, 2004).

### **Tizón común del frijol casusado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Dye.**

**Características generales.-** *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, es un bacteria en forma de varilla; es unicelular, gram (-), con un solo flagelo polar, aerobia; mide de 0.4 a 0.9 x 0.6 a 2.6  $\mu$ . En agar produce colonias convexas de crecimiento mucoide de color amarillo, húmedas brillantes; pigmento amarillo que es extracelular y es un carotenoide tipo alcohol insoluble en el agua denominado xanthomonadina. Hidroliza fuertemente la caseína y almidón. Existen cuatro tipos de colonias de *X. phaseoli*; rugosa, lisa, semimucoide y mucoide; las más virulenta es la del tipo mucoide (Campos, 1977).

**Habitat.**- El patógeno esta presente en la mayoría de las áreas del mundo en que se utiliza para siembra del frijol aunque es más común en climas cálidos subtropicales, y menos frecuente en climas templados. Esta muy extendida en América del Norte, en Europa su presencia es esporádica y no muy extendida en España; pero se ha reportado en Finlandia, Francia, Holanda, Suiza, Moldava, Grecia, Rumania y otras áreas de la antigua Unión de República Soviética (Smith *et al.*, 1992).

**Síntomas.**-En hojas y vainas pueden aparecer lesiones similares a las debidas a la invasión estomática, especialmente a temperaturas de 18°C; en las lesiones foliares las venaciones a menudo son pardo rojizas. Las semillas pueden invadirse vía el pedicelo y el funículo, lo que causa una gama de síntomas que va desde pequeñas manchas amarillas en el hilum a cambios de coloración amarillentos de parte o toda la envuelta seminal, a menudo va acompañado de un arrugado debido a la invasión del área que subyace a la envuelta; estos síntomas se detectan con facilidad en las semillas blancas pero no en las coloreadas. Las plántulas de semillas infectadas tienen a menudo puntos de crecimiento enfermos que mueren dejando solo los cotiledones y se denomina síntoma de cabeza de serpiente (Smith *et al.*, 1992).

**Importancia económica.**- En los Estados Unidos fue la enfermedad de mayor importancia económica de este cultivo en 1976, causando una pérdida estimada de cuatro millones de dólares. En otros países ha llegado a reducir los rendimientos de un 10 a un 20 %, en Canadá se han registrado daños hasta del 38 %. Por otro lado, en Colombia se han determinado daños del orden de 22 % en infecciones naturales, y del 45 % en inducidas (Kendy y Alarcorn, 1980). A su vez Campos (1977) menciona, que en nuestro país ésta enfermedad causa daños que varían de un 10 a 50 %.

**Mancha bacteriana causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Doidge).**

**Características generales.-** La Mancha bacteriana es causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. La bacteria es gram negativa, móvil, mide 0.7-1.0 x 2.0-2.4 µm y posee un solo flajelo polar. Crece lentamente en agar nutritivo, las colonias son circulares, húmedas, se desarrollan entre 48 y 72 h después de su aislamiento, esta bacteria produce ácido, pero no gas, de la glucosa, arabinosa, sucrosa, galactosa, trealosa, celobiosa y fructosa, también produce xanthomonadinas (Jones *et al.*, 1991; Núñez, 1998).

**Habitat.-** El desarrollo de la enfermedad se favorece a temperaturas de 24 a 30 °C y abundante humedad relativa. En el campo la bacteria se disemina a través de gotas de lluvia acarreadas por el viento, el recorte en el transplante y por aerosoles. Penetra a través de los estomas, por heridas creadas por la arena que acarrea el viento, picaduras de insectos y por vía mecánica (Jones, 1991; Nuñez, 1998).

**Síntomas.-** Se inician en el envés, donde aparecen manchas angulares de 2 a 3 mm de diámetro de color verde oscuro y aspecto húmedo, las cuales después adquieren una coloración gris púrpura cuyo centro es de color negro y está provisto de un halo amarillo claro. En ocasiones, el centro puede desprenderse, pero sigue manteniendo un halo amarillento. Como consecuencia de ello las hojas caen prematuramente (Rodríguez, 2000).

**Importancia económica.-** La mancha bacteriana está presente en todos los lugares donde se cultiva chile y jitomate. Sin embargo, es más común en las regiones tropicales y subtropicales donde se presentan abundantes o moderadas precipitaciones. Se estima que los daños causados por esta bacteriosis oscilan entre 3 y 18% y en casos excepcionales, puede ocasionar pérdidas totales (Jones *et al.*, 1991; Nuñez, 1998).

## **Bacteriosis de la lechuga** causado por la *Pseudomonas cichorii*.

**Características generales.-** Es un bastoncillo estrictamente aerobio, Gram-negativo, que mide 1.2-3.5 x 0.8  $\mu\text{m}$  con múltiples flagelos polares. Después de tres días se forma colonias convexas lisas, brillantes de color amarillo claro, en un medio King de B, produce un pigmento verde difusible que se hace fluorescente cuando está expuesto a la luz ultravioleta (Jones *et al.*, 2002).

**Habitat.-** Shirata *et al.* (1982) reportaron que el patógeno puede sobrevivir durante el invierno en hojas secas de lechugas enfermas o tejido enfermo enterrado y durante el verano, en suelo infectado por un mes. Puede aislarse de las hojas afectadas de malas hierbas en los campos de lechuga y de la rizósfera de este cultivo y malas hierbas. Existe evidencia de transmisión por semillas en lechugas arrepolladas, la planta es mas susceptible en estados tardíos del desarrollo, en las hojas, nervaduras y pecíolos medios que en las externas o tiernas, Puede infectar con facilidad a tejidos no heridos y el desarrollo de lesiones tiene lugar a 10 – 30 °C con óptimo de 25 °C.

**Síntomas .-** Según Jones *et al.* (2002) las síntomas de la mancha de barniz se caracteriza por unas manchas necróticas, brillantes, de color pardo, de unos milímetros de diámetro, en las superficies o peciolo de las hojas. Las áreas a lo largo de las venas son frecuentemente las más afectadas. Las lesiones viejas se secan y toman el aspecto de papel. Normalmente, las hojas más exteriores del cogollo no se ven afectadas. Por lo tanto los síntomas no pueden ser evidentes hasta que cortan y abren los cogollos.

**Importancia económica.-** Aunque en general no se dispone de estimaciones cuantitativas de las pérdidas causadas por la enfermedad, parece claro que en Japón se considera de importancia económica para la producción de lechuga al igual que en algunas partes partes de Estados Unidos; apio y crisantemo. En Europa, en general, no se considera una enfermedad principal pero dada su naturaleza, la amplia gama de huéspedes y la evidencia de que

puede ser la causa primaria para ataques posteriores por bacterias causantes de podredumbres blandas, la han tomado muy en cuenta y probablemente las pérdidas no sean pequeñas; se han señalado en Italia ataques epidemiológicos a lechuga (Smith *et al.*, 1992).

### **Pudricion blanda por *Erwinia carotovora* (Jones) Bergey *et al. subsp. carotovora***

**Características generales.**- Los agentes patógenos son bastoncillos con los extremos redondeados, sin capacidad de esporular, aproximadamente de 1.5 x 0.7  $\mu$ . Son gram negativos y móviles, con un número de 1 a 6 flagelos peritricos. En cultivos viejos las bacterias pierden su movilidad. Las colonias sobre agar pectonado son filiformes, de color blanco grisáceo e iridiscentes, aspectos ligeramente húmedos y burbucos. Las distintas características bioquímicas y de cultivo han sido descritas por Díaz (1989).

Esta especie es pectolítica, fuertemente anaeróbico facultativo, que utiliza una amplia gama de fuentes de carbono. La diagnosis de la enfermedad que causa pie negro de la papa, depende principalmente de aislar a la bacteria de las plantas con síntomas típicos de la enfermedad, necesita de temperaturas mayores de 36<sup>0</sup> C, necesita lactosa pero no necesita maltosa para su crecimiento esto es en comparación con *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* que es todo lo contrario (Smith *et al.*, 1992).

**Habitat.**- La bacteria no sobrevive por si misma en el suelo, aunque hay poca duda de que puede invernar en muchos climas en restos o en rebrotes y en la rizosfera de plantas cultivadas y de malas hierbas, probablemente como parte de la flora natural de ésta. Los métodos de dispersión se han investigado con mayor detalle en la subsp. *atroseptica*, pero ambas subespecies se dispersan por insectos, por la maquinaria de cultivo, plantación y recolección y durante el lavado de las hortalizas antes de su comercialización (Smith *et al.*, 1992)

**Síntomas.**- Las síntomas producidos por las pudriciones blandas en frutos de hortalizas y en otros órganos carnosos. Al principio, en los tejidos de dichos órganos aparece una pequeña lesión aguanosa que se extiende con rapidez en lo que se refiere a diámetro y profundidad. La zona afectada se ablanda y suaviza. Su superficie puede quedar manchada y algo hendido o bien puede arrugarse y quedar ampulosa (Agrios 2004).

**Importancia económica.**- Calderoni (1978) menciona que las pudriciones blandas y húmedas son de amplia difusión mundial y causan pérdidas importantes de tubérculos en los depósitos o montones de papa, tanto en campo como en almacén. Cartin y Fucikovsky (1981) señalan que esta enfermedad debe considerarse como de las más importantes y señalan pérdidas hasta de 29 % en rendimientos. Aunque en el cultivo la incidencia normalmente no es superior al 2 %. French (1977) considera esta enfermedad como una de las más importantes en América Latina.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Ubicación del experimento**

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Investigación en Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, Unidad Saltillo. Blvd. Venustiano Carranza s/n. Saltillo, Coahuila, México.

### **Extracción de los polifenoles**

#### **Obtención del material vegetal**

Las muestras de gobernadora, cascara de la nuez y cascara de la granada fueron proporcionadas por el Departamento de Investigación en Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila de la Ciudad de Saltillo, Coahuila, México. La gobernadora, nuez y la granada se secaron en una estufa a 60 °C durante 48 h, enseguida se pulverizaron y se guardaron a temperatura ambiente en recipientes opacos para evitar la exposición directa a la luz ya que esta oxida los polifenoles.

#### **Extracción de polifenoles de la gobernadora**

En tres matraces de Erlenmeyer (1000 mL); se agregaron 100 g de polvo de la gobernadora con 400 mL de acetona al 70% (relación 1:4). Los matraces se forraron con papel aluminio para evitar la exposición de la luz. Se montó un sistema de reflujo a una temperatura no mayor a 60°C por un tiempo de 12 h. Una vez terminado el reflujo, se filtró en la tela de tul, de la cual se obtuvo 270 mL, el extracto recuperado se centrifugó a 3500 rpm por 10 min y se recuperaron 260 mL. Al extracto se le retiró el solvente con ayuda de un rotavapor (YAMATO, RE540) donde se mantuvo a una temperatura no mayor a 60 °C y se evitó la exposición a la luz de la manera antes descrita, en la cual se recuperaron 145 mL de agua y 50 mL de acetona.

## **Extracción de polifenoles de la cáscara de la nuez**

En tres matraces Erlenmeyer (1000 mL), en cada matraz se colocaron 100 g de polvo de la cáscara de la nuez y 400 mL de metanol al 70 % (relación 1:4). Los matraces se forraron con papel aluminio para evitar la exposición de la luz. Se montó un sistema de reflujo a una temperatura no mayor a 60° en un tiempo de 4 h. Una vez terminado el reflujo, el extracto se filtró en la tela de tul. El líquido filtrado se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos. Por último se midió el volumen de extracto recuperado el cual fue de 820 mL.

## **Extracción de polifenoles de la granada**

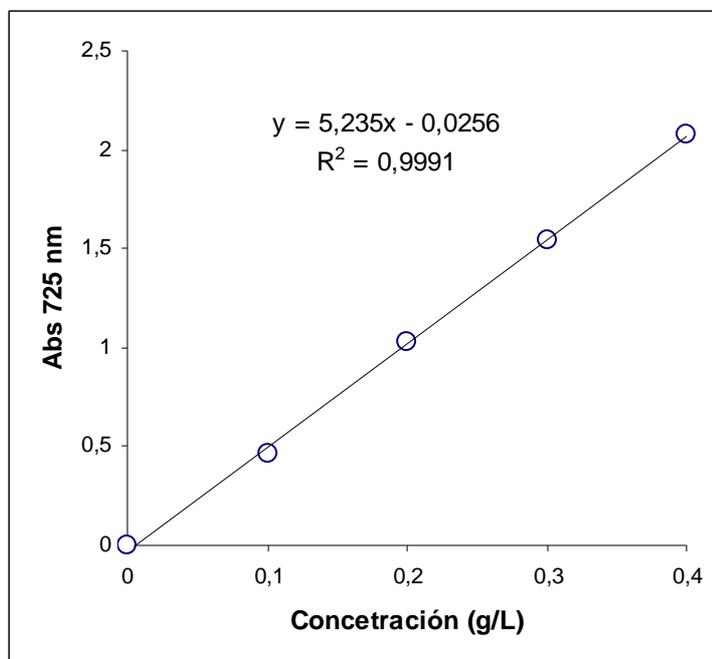
En un recipiente de plástico, se colocaron 150 g de polvo de cascara de granada en 750 mL de agua (relacion 1:5), la mezcla se agitó por un tiempo de 5 h. Enseguida, se filtró por la tela de tul, por el algodón, por la fibra de vidrio No. 4 y por último se pasó por el filtro de Whattman No. 41 recuperándose 368 mL de extracto.

## **Cuantificación de polifenoles**

### **Cuantificación de taninos hidrolizables**

Se preparó una curva patrón utilizando una solución estándar de ácido gálico a una concentración 0.4 g/L. Se realizó el etiquetado de 10 tubos de ensayo del 0 al 4. y se le añadieron a cada tubo 0, 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 ml de la solución estándar, posteriormente se les agregó a cada uno 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 y 0 ml de agua destilada respectivamente. Enseguida se añadieron 400 µL de la muestra diluida en un tubo de ensayo, al que se le adicionaron 400 µL del reactivo comercial Folin Ciocalteu, se agitó y se dejó reposar por 5 min. Después se adicionaron 400 µL de carbonato de sodio (0.01 M), se agitó y dejó reposar por 5 min. Posteriormente se diluyó con 2 mL de agua destilada, enseguida se leyó en un espectrofotómetro UV/Visible (THERMO SPECTRONIC, Biomate3) a 725 nm para determinar fenoles totales. Las lecturas obtenidas fueron analizadas por la

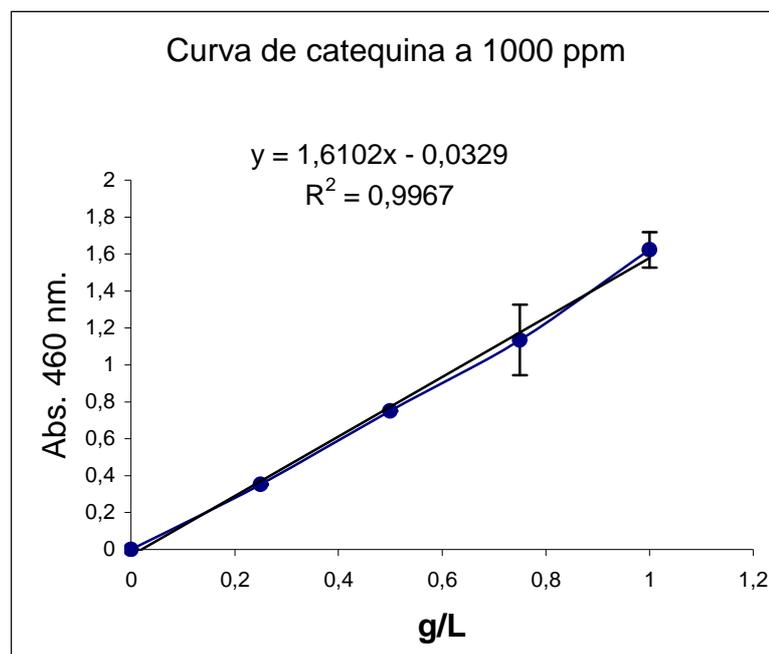
ecuación obtenida en la correspondiente curva patrón (grafica 1 ). Dicho ensayo se realizó por duplicado.



**Gráfica 1. Curva patrón de ácido galico.**

### **Cuantificación de taninos condensados.**

Se preparó una curva patrón utilizando una solución estándar de catequina a una concentración 1 g/l. Se realizó etiquetando 5 tubos de ensayo del 0 al 4. Se le añadieron a cada uno a 0, 0.25, 0.50, 0.75 y 1 ml de la solución estándar, respectivamente y se añadieron a cada uno 1, 0.75, 0.50, 0.25 y 0 ml de agua destilada respectivamente. Para el caso de los tubos con muestra se les agregaron 500 µL de la muestra diluida en un tubo de ensayo (16 x 150), al que se le adicionaron 3 mL de HC1-butanol al 10% , enseguida se le adicionaron 100 µL de reactivo ferrico. Estos tubos se cerraron muy bien con el fin de que no se evapora el NC1-butanol. Después se colocó en baño Maria con agua hirviendo a 1h, se dejó enfriar, enseguida se leyó en un espectrofotómetro UV/Visible (THERMO SPECTRONIC, Biomate3) a 460 nm de absorbancia. Las lecturas obtenidas fueron analizadas por la ecuación obtenida en la curva patrón (grafica 2). Dicho ensayo se realizó por triplicado.



**Gráfica 2. Curva patrón de catequina.**

### **Monofenoles comerciales**

**Acido galico.** Este reactivo puro lo proporcionó el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Investigación en Alimentos el cual contenía un peso molecular de 170.02 , con el número de lote 2050274 (sigma).

Se pesó un 1 mg en 5 mL como solución madre y para diluir se utilizó etanol, dicha solución se preparó a 1000, 500, 250 y 125 ppm respectivamente. Solución de ácido gálico (1.0 g/L). Se pesaron 0.025g de ácido gálico y se aforaron con 25 mL de agua destilada. El procedimiento se llevó a cabo con la mayor brevedad para evitar la exposición del ácido a la luz. Se guardó la solución en un recipiente forrado de aluminio y en refrigeración (4°C).

**Acido elagico.** Este reactivo puro lo proporcionó el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Investigación en Alimentos la cual contenía un peso molecular de 338.2 marca ICN Biomedicals. Se pesó un 1 mg en 5 mL como solución madre y para diluir se utilizó agua, la solución se preparó a 1000, 500, 250 y 125 ppm respectivamente.

## **Selección del método de la esterilización de placas de ELISA**

Esterilización de la placa de poliestileno (ELISA) se evaluaron diferentes metodologías, éstas fueron:

1.- Con UV durante 30 min, después se le agregó medio de cultivo y se incubó a 30° C, durante tres días.

2.-Con el microondas, a traves de la aplicación de dos pulsos de dos minutos.

3.-Con autoclave, durante 20 minutos en un rango de presión de 5-10 lb.

A las placas tratadas se les agregó medio de cultivo sabouraud dextrosa estéril, y se incubaron durante 72 h a 30°C para evaluar la eficiencia de esterilización, revisandolos diariamente cada uno de la placas , es importante mencionar que se metieron en plastico de ciblok, esto con el fin de prevenir la contaminación del medio de cultivo.

## **Actividad biológica (antifungica) de extractos polifenolicos sobre la inhibición del crecimiento de 8 especies de hongos fitopatógenos.**

Los hongos (Cuadro 2) que se utilizaron para el presente trabajo los proporcionó el Centro Internacional de Sevicios Fitosanitarios (CISEF), el cual esta autorizado por la SAGARPA, certificado con el ISO 9001-2000. La identificación de los hongos los realizo el M.C. Faustino Lara Victoriano, jefe del Laboratorio de Micologia y acreditado para tal area.

Cuadro 2.- Hongos fitopatogenos utilizados en este estudio

---

1=*Pytium sp.*

2=*Colletotrichum truncatum*

3=*Colletotrichum coccodes.*

4=*Alternaría alternata*

5=*Fusarium verticillioides.*

6=*Fusarium solani*

7=*Fusarium sambucinum*

8=*Rhizoctonia solani.*

---

## **Conservación de las especies fungicas**

Los hongos se activaron en agar sabouraud dextrosa; las placas se incubaron a 30<sup>0</sup>C. Cada cepa se conservó en un sistema crioprotector a basé de una solución leche:glicerol (9:1). El sistema de crioprotección fue esterilizado a 15 lb de presión por 10 minutos. Posteriormente el micelio activo se cortó con una punta de micro pipeta estéril en discos de 6 mm, los que se colocaron dentro de tubos Eppendorf previamente esterilizados. Se agregaron 0.5 mL del medio crioprotector estéril. Los tubos se etiquetaron y se almacenaron a una temperatura de -20<sup>0</sup>C.

## **Incremento de las cepas**

Los hongos se activaron en agar sabouraud dextrosa; las placas se incubaron a 30<sup>0</sup>C y se mantuvo en observación hasta que se obtuvo suficiente mecelio que fue a los 6 dias.

## **Bioensayo de los diferentes especies de hongos**

La placa de Elisa estéril fue cubierta con aluminio previamente esterilizado, agregandose 200 µL de medio de cultivo estéril por pozo y se dejo reposar durante 30 min; enseguida se le agregó una propagulo definido del micelio de los hongos con la ayuda de una jeringa de insulina (Cuadro 2), después se le agregaron 20 µL de extracto (la gobernadora, nuez y granada) y dos de los monofenoles (galico y elagico), estos con las diferentes concentraciones que se muestran en el cuadro 3. Un testigo (agua destilada estéril) fue utilizado. Posteriormente se incubò a 30<sup>0</sup> C durante 24 h, realizando observaciones con el estereoscopio cada 0, 6,12,18 y 24 h.

Cuadro 3.- Extractos polifenolicos evaluados a diferentes concentraciones sobre la inhibición del crecimiento de 8 especies de hongos fitopatogenos y 10 aislamientos de *Fusarium*.

Extracto polifenólico	Concentración (ppm)	Concentración (ppm)	Concentración (ppm)	Concentración (ppm)
Gobernadora	0.70	0.35	0.17	0.08
Nuez	0.20	0.10	0.05	0.02
Granada	0.21	0.11	0.05	0.02
Galico	1000	500	250	125
Elagico	1000	500	250	125

**Actividad biológica (antifúngica) de extractos polifenoles sobre la inhibición del crecimiento de 10 aislamientos de *F. oxysporum***

Las cepas de *Fusarium* (Cuadro 4) que se utilizaron para el presente trabajo las proporciono el Centro Internacional de Sevicios Fitosanitarios (CISEF), la cual esta certificado con el ISO 9001-2000. La identificación de los hongos los realizo el M.C. Faustino lara victoriano, la cual es el encargado del Laboratorio de Micologia y acreditado para tal area.

Cuadro 4.-Cepas de *Fusarium oxysporum* utilizados en el experimento

- 
- 1=*Fusarium oxysporum* No.1
  - 2=*Fusarium oxysporum* No.2
  - 3=*Fusarium oxysporum* No.9
  - 4=*Fusarium oxysporum* No.10
  - 5=*Fusarium oxysporum* No.11
  - 6=*Fusarium oxysporum* No.14
  - 7=*Fusarium oxysporum* No.15
  - 8=*Fusarium oxysporum* No.22
  - 9=*Fusarium oxysporum* No.28
  - 10=*Fusarium oxysporum* No.29
-

## **Incrementos de los aislamientos de *Fusarium oxysporum***

Los aislamientos se activaron en agar sabouraud dextrosa; las placas se incubaron a 30<sup>0</sup>C. Cada cepa se conservó en un sistema crioprotector a base de una solución leche:glicerol (9:1). El sistema de crioprotección fue esterilizado a 15 lb de presión por 10 minutos. Posteriormente el micelio activo se cortó con una punta de micro pipeta estéril en forma de discos de 6 mm, que se colocaron dentro de tubos Eppendorf previamente esterilizados. Se agregaron 0.5 mL del medio crioprotector estéril. Los tubos se etiquetaron y se almacenaron a una temperatura de -20<sup>0</sup>C. Para el incremento de los aislamientos de *Fusarium*, la optimización de la esterilización de las placas y el acondicionamiento del ensayo se utilizó los mismos procedimientos descritos en la etapa anterior.

## **Diseño experimental**

Para el análisis de la inhibición de crecimiento de 8 especies de hongos fitopatógenos y 10 aislamientos de *Fusarium oxysporum*, se utilizó el programa del SAS, la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis .

## **Actividad biológica (antibactericida) de extractos polifenoles sobre la inhibición del crecimiento de cuatro especies de bacterias fitopatógenos**

Las cepas bacterianas que se utilizaron en la presente investigación fueron proporcionadas por el laboratorio de bacteriología del CISEF donde se analizaron las pruebas bioquímicas pertinentes y correspondientes a su caracterización e identificación. Las bacterias proporcionadas fueron; *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *Xanthomonas vesicatoria*, pv. *vesicatoria*, *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* y *Pseudomonas cichorii*.

## **Preparación de los inoculos y conservación**

En tubos de eppendorf previamente esterilizados con 500 µL de caldo, se agregaron 100 µL de bacteria activa se etiquetó y congeló a -20<sup>0</sup> C.

### **Preparación de las diluciones bacterianas.**

Se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de la bacteria activa, a cada tubo de ensaye correspondiente, el cual contenía 4 mL de caldo previamente esterilizado, enseguida este caldo se leyó en un espectrofotómetro (THERMO SPECTRONC) a 625 nm, ajustándose a 0.08-0.1 de absorbancia, esta turbidez corresponde a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL.

### **Preparación de medio para bacterias.**

Activación de bacterias. En un matraz Erlenmeyer (500 mL) se prepararon 250 mL de caldo KB, que contenía 5.0 g de peptona, 0.4 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.4 g de  $\text{MgSO}_4$ , 5 mL de glicerol y 250 mL de agua destilada; este caldo se agregó (en alícuotas de 5 mL) en tubos de ensaye y con una asa microbiológica se inóculo la bacteria a los tubos y se incubó a  $30^\circ\text{C}$  durante 18 -24 h. Para la esterilización de material de las placas de Elisa se utilizó el mismo procedimiento descrito en las etapas de los hongos.

### **Bioensayo de los extractos sobre las bacterias**

La placa de Elisa, cubierto con aluminio previamente esterilizado se le agregaron 200  $\mu\text{L}$  de medio KB, el medio se dejó reposar durante 30 minutos, enseguida se le agregó 20  $\mu\text{L}$  de inóculo (Cuadro 2) (ajustado)  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL, después se le agregaron 20  $\mu\text{L}$  de extracto (la gobernadora, nuez y granada), estos con diferentes concentraciones al 10%, 5%, 2.5%, 0.25 y el Testigo (Cuadro 5). Al tener listo se incubó a  $30^\circ\text{C}$  durante 36 horas, al no observarse el crecimiento con el estereoscopio a este tiempo se decidió, hacerle una punción al medio de cultivo con el fin de poder observar el crecimiento bacteriano, enseguida se refrigeró para detener el crecimiento, sin embargo, esto permitió que se observara mejor la inhibición a los 60 h.

Cuadro 5. Extractos polifenolicos evaluados a diferentes concentraciones sobre la inhibicion de crecimiento de bacterias fitopatogenas.

Extracto polifenólico	concentracion (ppm)	Concentracion (ppm)	concentracion (ppm)	Concentracion (ppm)
Gobernadora	0.70	0.35	0.17	0.08
Nuez	0.20	0.10	0.05	0.02
Granada	0.21	0.11	0.05	0.02

### **Diseño experimental**

Para las bacterias se utilizo el programa estadistico del SAS, un analisis categorico de datos usando tablas s x r donde las variables de las columnas y de las hileras fueron clasificados nominalmente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1.- Extracción de taninos de gobernadora y de dos cáscaras de granada y nuez.

Para realizar la cuantificación de polifenoles de los tres extractos, se hizo una curva patron de Acido galico (Grafica 1) y Catequina (Grafica 2). Como se puede observar (Cuadro 6) la gobernadora es el extracto de la cual se obtuvo mayor cantidad de taninos hidrolizables, en comparación con la nuez y la granada (Grafica 3), sin embargo entre estos dos últimos no varia significativamente la cantidad de taninos totales. Bello Cueto *et al.* (2006) reporta que la gobernadora es una buena fuente de taninos condensados seguidos de taninos hidrolizables y sumado para lo dos cubre un 61.12 % del total de la planta.

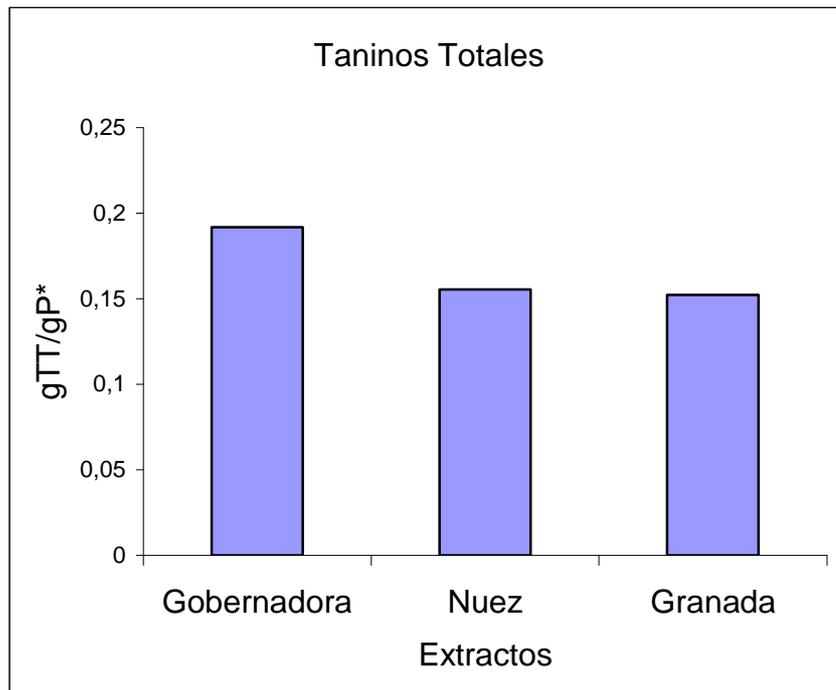
Cuadro 6.- Taninos totales cuantificados el los tres extractos con una curva patron de Acido galico y Catequina.

Extractos	gAG/gP*	gC/gP**	gTT/gP***
Gobernadora	0,16063885	0,03116605	0,19180489
Nuez	0,11486109	0,04050882	0,15536991
Granada	0,10951439	0,04259327	0,15210765

\*= gramos de acido galico por gramos de planta

\*\*=gramos de catequiza por gramos de planta

\*\*\*=gramos de taninos totales por gramos de plantas



Grafica .-3 Gramos de taninos totales por gramo de planta en los tres extractos.

## 2.- Evaluación del metodo de esterilización de placas de poliestireno

Después de tres días y con revisiones diarias de cada placa se observó que el mejor método de esterilización fue la de autoclave (cuadro 7), ya que no hubo crecimiento microbiano en ninguno de los pozos, aunque en este caso se bajó la presión en un rango de 5-10 Lb en un tiempo de 20 minutos, esto porque el plástico no tolera altas temperaturas. En cambio cuando se esterilizó por los métodos de UV y microondas sí hubo crecimiento microbiano. Es importante mencionar que no hay antecedentes que se haya esterilizado la placa de Elisa con algún método similar a las que se probaron en este trabajo. Ponce *et al.* (2006) mencionan que la autoclave es una técnica con efectividad alta y tiempo corto, así mismo que la esterilización por UV no es total.

Cuadro 7.-Pozos contaminados por hongos en placas de Elisa sometidos a diferente metodo de esterilización a los tres dias.

Metodo de esterilización	P	Dias			Total
		1	2	3	
UV	29	0	1	1	2
Microondas	9	0	1	1	2
Autoclave	9	0	0	0	0

UV=rayos ultravioleta, P=pozso observados por placa

### 3.- Evaluación de la actividad biológica de los extractos sobre la inhibición del crecimiento de 8 especies de hongos fitopatógenos.

Se observo que a concentracion alta del extrcato aumenta la inhibición del crecimiento y que al disminuir la concentración disminuye la inhibición, en la gobernadora, las especies que presentaron mayor inhibición del crecimiento fueron: *Phytium sp*, *C. coccodes*, *C. truncatum* y *R. solani* (Cuadro 8). Solo *Fusarium verticillioides* no fue inhibida. Estos resultados son comparables con los obtenidos por Ventura- Sobrevilla *et al.*, (2006) quienes mencionan que el extracto de gobernadora tiene efectos inhibitorios sobre *Colletotrichum truncatum*, *Alternaria alternata*, *Fusarium sambucinun* y para *Fusarium verticillioides* solo tiene actividad fungistatica. Segun Lira-Saldivar *et al.* (2003) *Pythium* es inhibido por el extracto de gobernadora obteniendo resultados similares a los nuestros. Este es un efecto importante desde el punto de vista fitopatologico dado que el extracto tiene efecto contra organismos oomycetes y deuteromycetes mientras que los fungicidas quimicos ejercen accion contra oomycetes y no actuando contra deuteromicetes y viceversa.

Cuadro 8.- Porcentaje de Inhibición del crecimiento de 8 especies fungicas por 4 concentraciones del extracto de gobernadora.

Especies	ppm				
	0.70	0.35	0.17	0.08	testigo
1= <i>Pythium sp.</i>	100	100	100	100	50
2= <i>Colletotrichum truncatum</i>	100	100	100	100	75
3= <i>Colletotrichum coccodes.</i>	100	100	100	75	0
4= <i>Alternaría alternata</i>	100	100	50	50	50
5= <i>Fusarium verticillioides.</i>	75	50	50	0	0
6= <i>Fusarium solani</i>	100	75	75	75	0
7= <i>Fusarium sambucinum</i>	100	75	50	50	25
8= <i>Rhizoctonia solani.</i>	100	100	100	75	0

Cuando se probaron los extractos de cascara de nuez se aprecio que las concentraciones mas altas 0.20 y 0.10 tuvieron inhibición equivalente y actuan sobre las especies *Phytium sp*, *Colletotrichum truncatum*, *Colletotrichum coccodes* , *Fusarium sambucinum*, *Rhizoctonia solani* ya que muestran 100 % de inhibición, para las especies *Alternaría alternata*, *Fusarium verticillioides*, y *Fusarium solani* solo mostraron actividad fungistatica (Cuadro 9). Es importante hacer mencion que no existe antecedentes, sobre el uso del extracto de la nuez como inhibidor del crecimiento fungico, sin embargo presenta altas cantidades de polifenoles y pudiera ser un buen agente inhibidor del crecimiento de algunas especies fungicas.

Cuadro 9.- Porcentaje de inhibición del crecimiento de 8 especies fungicas por 4 concentraciones del extracto de la nuez.

Especies	ppm				testigo
	0.20	0.10	0.05	0.02	
1= <i>Pythium sp.</i>	100	100	100	100	50
2= <i>Colletotrichum truncatum</i>	100	100	100	100	0
3= <i>Colletotrichum coccodes.</i>	100	100	75	75	0
4= <i>Alternaría alternata</i>	50	50	25	25	0
5= <i>Fusarium verticillioides.</i>	50	50	50	0	0
6= <i>Fusarium solana</i>	75	75	50	75	0
7= <i>Fusarium sambucinum</i>	100	100	75	75	0
8= <i>Rhizoctonia solani.</i>	100	100	100	100	100

En el cuadro 10 se observa que tambien a mayor concentración del extracto de granada, mayor es la inhibición y que la concentración de 0.21 fue la que mas inhibio a las especies *Colletotrichum truncatum*, *Colletotrichum coccodes*, *Rhizoctonia solani* , y no se afecto para las especies *Alternaría alternata* y *Fusarium solani* mientras que para las concentraciones 0.11 ,0.05 y 0.02 hay equivalencia que solo tiene actividad fungistatica. Cabe señalar que no hay antecedentes de que la granada tenga efecto inhibitorio sobre hongos fitopatógenos, sin embargo Aguilera-Carbo *et al.* (2005), reportan que los polifenoles de la granada tuvieron efecto inhibitorio con bacterias de alimentos y esto se tomo como base para probar sobre los diferentes hongos que se evaluaron ya que contiene un gran cantidad de polifenoles.

Cuadro 10.- Porcentaje de inhibición del crecimiento de 8 especies fungicas por 4 concentraciones del extracto de la Granada.

Especie	ppm				
	0.21	0.11	0.05	0.02	testigo
1= <i>Phytium sp.</i>	75	75	75	75	0
2= <i>Colletotrichum truncatum</i>	100	100	50	50	0
3= <i>Colletotrichum coccodes.</i>	100	50	25	100	25
4= <i>Alternaría alternata</i>	0	0	75	0	0
5= <i>Fusarium verticillioides.</i>	25	0	0	0	0
6= <i>Fusarium solani</i>	0	0	0	0	0
7= <i>Fusarium sambucinum</i>	25	0	0	0	0
8= <i>Rhizoctonia solani.</i>	100	100	100	100	100

De acuerdo a los resultados obtenidos en el cuadro 11 se observa que no hubo diferencia significativa entre las concentraciones de 1000 ppm con la de 500 ppm de Ac. Galico y la especie donde mas se afecto el crecimiento fue *Colletotrichum truncatum*, mientras que para *Alternaría alternata*, *Fusarium verticillioides* y *Fusarium sambucinum* solo manifesto actividad fungistatico esto en todas las concetraciones; por lo tanto es de gran importancia decir que hay muchas posibilidades que el acido galico halla perdido sus propiedades, como se sabe se oxida a la luz y eso pudo influir en su actividad inhibitoria. Es importante mencionar que no se encuentro reportes de que el acido galico comercial, tenga efecto antimicrobiano.

Cuadro 11.- Porcentaje de inhibición del crecimiento de 8 especies fungicas por 4 concentraciones del Acido Galico.

Especie	ppm				
	1000	500	250	125	testigo
1= <i>Pythium sp.</i>	50	50	0	50	0
2= <i>Colletotrichum truncatum</i>	100	100	50	0	0
3= <i>Colletotrichum coccodes.</i>	50	25	25	100	0
4= <i>Alternaria alternata</i>	0	50	0	0	0
5= <i>Fusarium verticillioides.</i>	0	0	0	0	0
6= <i>Fusarium solani</i>	25	0	0	0	0
7= <i>Fusarium sambucinum</i>	0	0	0	0	0
8= <i>Rhizoctonia solani.</i>	25	25	75	75	75

Las concentraciones de acido elagico que más inhibieron el crecimiento de las especies fungicas son 500 ,125, (Cuadro 12) enseguida la de 250 y 1000 ppm, esto puede ser debida a una mala manipulación del reactivo y por eso las concentraciones mas bajas fueron las que mas inhibieron el crecimiento fungico. La especie que no fue inhibida fue la *Fusarium verticillioides*, esto se le atribuye por las toxinas que produce ya que estas degradan los componentes del extracto. para el caso de los hongos *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Fusarium sambucinum*, *Rhizoctonia solani* solo mostro actividad fungistatico. En contraste, Ventura- Sobrerilla *et al.* (2006) reportan que el acido elagico solo tiene activida fungistatica.

Cuadro 12.- Porcentaje de inhibición del crecimiento de 8 especies fungicas por 4 concentraciones del Acido elagico.

Especie	ppm				
	1000	500	250	125	testigo
1= <i>Pythium sp.</i>	100	100	50	50	0
2= <i>Colletotrichum truncatum</i>	25	100	100	100	0
3= <i>Colletotrichum coccodes.</i>	100	100	100	100	0
4= <i>Alternaria alternata</i>	0	50	50	100	0
5= <i>Fusarium verticillioides.</i>	0	0	0	0	0
6= <i>Fusarium solani</i>	75	75	25	50	0
7= <i>Fusarium sambucinum</i>	75	75	75	75	0
8= <i>Rhizoctonia solani.</i>	75	50	75	75	75

El analisis de Kruskal-Wallis (Cuadro 13) marcado como diferencia de la calificación promedio de hileras es igual a 57.506 con 7 grados de libertad correspondiendo un valor de  $P=0.001$  de significancia, por lo tanto se determina que la inhibición del crecimiento fue diferente entre los 8 hongos fitopatógenos evaluados. El analisis estadístico de correlación uso calificaciones de rangos para probar la hipótesis nula, la cual indica que no hay una asociación entre los hongos con el grado de inhibición de su crecimiento por los extractos sin tomar en cuenta las concentraciones, contra la hipótesis alternativa de una asociación entre los hongos y la inhibición del crecimiento por el extracto. El crecimiento es diferente para cada uno de los hongos esto por las diferencias entre especies, pero tambien por el tipo de extracto, ya que cada uno de los extractos tiene diferente cantidad y diversidad de polifenoles. Además este resultado coincide con lo reportado por Tequida *et al.* (2002) quienes indican que hay mucha variación en el grado de inhibición de los hongos, estos autores probaron diferentes extractos entre los que destacan extractos de *L. tridentata*, *B. glutinosa*, *D. discolor* y *P. parviflora*, sobre la inhibición de 6 hongos fitopatógenos tales como: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus Níger*, *Fusarium poae* y *Fusarium verticillioides*.

Cuadro 13.- Comparación estadística para crecimiento de los hongos por el estadístico de Cochran-Mantel-Haenszel (Basado en calificaciones de rangos).

Estadístico	Hipótesis alternativa	gl	valor	Prob
1	Correlación no cero	1	2.912	0.088
2	Difer. calif. promedio hileras	7	57.506	0.001

Numero total de muestras = 200

Para determinar el efecto del extracto sobre la inhibición del crecimiento se encontro que el valor del Estadístico de Kruskal-Wallis (Cuadro 14) fue de 34.409 con 4 grados de libertad y un valor de  $P=0.001$  de significancia, por lo tanto el tipo de extracto afecta en forma diferente el crecimiento de los diferentes hongos. El estadístico de correlación usó calificaciones de rangos y fue de 14.554 y  $P=0.001$  por lo tanto se acepta que hay una asociación entre el extracto y la inhibición del crecimiento.

Cuadro 14.- Comparación estadística del los extratos sobre la inhibición del crecimiento por el estadístico de Cochran-Mantel-Haenszel (Basado en calificaciones de rango).

Estadístico	Hipotesis alternativa	gl	Valor	Prob
1	Correlación no cero	1	14.554	0.001
2	Difer. calif. promedio hileras	4	34.409	0.001

Numero total de muestras = 200

En la determinación del grado de inhibición del crecimiento por la concentración del extracto, se encontro que el valor del estadístico del Kruskal-Wallis (Cuadro 15) fue de 37.130 con 4 grados de libertad y con un valor de  $P=0.001$  de significancia por lo tanto, la concentración del extracto afecta en forma diferente el crecimiento de los hongos. El estadístico de correlación de 27.283 y  $P=0.001$  indica una asociación entre la concentración del extracto y la inhibición del crecimiento.

Cuadro 15.- Comparación estadística de las concentraciones utilizadas por el extracto por el crecimiento con el estadístico Cochran-Mantel-Haenszel (Basada en calificaciones de rango).

Estadístico	Hipotesis alternativa	gl	Valor	Prob
1	Correlacion no cero	1	27.283	0.001
2	Difer. calific. promedio hileras	4	37.130	0.001

Numero total de muestras = 200

De acuerdo a los resultados obtenidos en las calificaciones de rangos medios de Wilcoxon (cuadro 16). En las especies 1=*Pythium sp*, 2=*Colletotrichum truncatum*, 3=*Colletotrichum coccodes*, la inhibición del crecimiento fue equivalente, pero también con las especies 4=*Alternaría alternata*, 6=*Fusarium solani* y 7=*Fusarium sambucinum*, y la especie menos afectada fue la 5=*Fusarium verticillioides* y la más afectada fue la especie 8=*Rhizoctonia solani*, esto sin importar el extracto ni la concentración.

Cuadro 16.-Calificaciones Wilcoxon (Suma de rangos) para la variable inhibición del crecimiento por especie fungica.

Hongos	N	suma de calificaciones	Esperado bajo H0	Dev. Est. bajo H0	calificación promedio
1	25	1994.50000	2512.50000	261.441017	79.780000
2	25	1790.50000	2512.50000	261.441017	71.620000
3	25	1961.00000	2512.50000	261.441017	78.440000
4	25	3102.50000	2512.50000	261.441017	124.100000
5	25	3744.00000	2512.50000	261.441017	149.760000
6	25	3097.00000	2512.50000	261.441017	123.880000
7	25	2913.50000	2512.50000	261.441017	116.540000
8	25	1497.00000	2512.50000	261.441017	59.880000

Promedio de calificaciones relacionados

Kruskal-Wallis Test (aproximacion de la Chi-cuadrada)

CHISQ = 57.506      DF = 7      Prob > CHISQ = 0.0001

De acuerdo a las calificaciones promedio se observa (cuadro 17) claramente que de los 3 extractos y de los 2 reactivos puros, la gobernadora es el que inhibió más el crecimiento, seguido de la nuez y el reactivo de ac. elagico, mientras el extracto de la granada y el acido galico son los que menos inhibieron, cabe aclarar que esto es sin importar el hongo en la cual se aplicó, esto se relaciona por la cantidad de polifenoles de cada una de los extractos, ya que la gobernadora mostro mayor cantidad de polifenoles.

Cuadro 17.- Calificaciones de Wilcoxon (suma de rangos) por la inhibición del crecimiento clasificado para el tipo de extracto.

Extracto	N	Esperado calificaciones	Dev. Est. bajo H0	calificación bajo H0	promedio
Gobernadora	40	2923.0	4020.0	316.209332	73.075000
Nuez	40	3177.0	4020.0	316.209332	79.425000
Granada	40	4640.0	4020.0	316.209332	116.000000
Acido galico	40	5432.0	4020.0	316.209332	135.800000
Acido elagico	40	3928.0	4020.0	316.209332	98.200000

Promedios de calificaciones relacionados

Kruskal-Wallis Test (Aproximacion de la Chi-cuadrada)

CHISQ = 34.409      gl = 4      Prob > CHISQ = 0.0001

De acuerdo al rango de calificaciones promedio a mayor concentración es mayor la inhibición y como se observa en el cuadro 18, no hay gran diferencia significativa entre las concentraciones 1 y 2 seguidas de las concentraciones 3 y 4 que tampoco difieren entre ellos, aunque hay un diferencia significativa para la concentracion 5 que fue el testigo. Esto de acuerdo a la sumas de calificaciones y calificación promedio de cada uno de los extractos.

Cuadro 18.- Calificaciones de Wilcoxon (suma de rangos) por la inhibición del crecimiento clasificado para la concentración del extracto.

Concent	N	suma de calificaciones	Esperado bajo H0	Dev. Est. bajo H0	calificación promedio
1	40	3198.00000	4020.0	316.209332	79.950000
2	40	3347.00000	4020.0	316.209332	83.675000
3	40	3849.00000	4020.0	316.209332	96.225000
4	40	3829.50000	4020.0	316.209332	95.737500
5	40	5876.50000	4020.0	316.209332	146.912500

Promedios de calificaciones relacionados

Kruskal-Wallis Test (Aproximacion de la Chi-cuadrada)

CHISQ = 37.130      gl = 4      Prob > CHISQ = 0.0001

#### 4.- Evaluación de la actividad biológica de los extractos sobre la inhibición del crecimiento de 10 aislamientos monospóricos de *F. oxysporum*

En el cuadro 19, se observa que en la concentración mas alta del extracto de gobernadora hay mayor inhibición del crecimiento ya que inhibio 8 de las 10 cepas, se le atribuye por su mayor concentración de polifenoles y a menor concentracion disminuye la inhibición, sin embargo la cepa 2 solo mostro actividad fungistatica, mientras en la que se presento la mayor inhibición fue en la cepa 5, esto nos indica que hay diferencias entre estos aislamiento ya que se comportan de manera distinto. Resultados reportados por Ventura-Sobrevilla (2006) coinciden en el sentido de que *Fusarium* es inhibido por el extracto de la gobernadora, la diferencia es de que dicho autor solo probó un aislamiento.

Cuadro 19.- Porcentaje de Inhibición del crecimiento de 10 aislamientos de *Fusarium oxysporum* con 4 concentraciones del extracto de gobernadora (*Larrea tridentata*).

Cepas	ppm				
	0.70	0.35	0.17	0.08	testigo
1	100	100	75	0	0
2	0	0	0	0	0
3	100	100	75	75	25
4	100	75	75	25	0
5	100	100	100	0	0
6	100	100	75	0	0
7	100	100	75	75	0
8	100	100	75	75	0
6	100	75	75	75	0
10	75	75	0	0	0

En este resultado (Cuadro 20) muestra que las cepas 1 y 8 tuvieron mayor inhibición a concentraciones de 0.20, 0.10 y las cepas 2, 3, 5, 6, y la 10 solo mostraron actividad fungistática en todas las concentraciones, podemos decir que se necesita probar mayores concentraciones del extracto de la nuez., y que hay diferencias entre cepas; esto se le atribuye a que puede presentar diferencia de variación genética entre cepas de la misma especie. Cabe señalar que no existen antecedentes de que la nuez tenga efectos inhibitorios sobre hongos fitopatógenos.

Cuadro 20.- Porcentaje de Inhibición del crecimiento de 10 aislamientos monospóricos de *Fusarium oxysporum* con 4 concentraciones del extracto de nuez.

Cepas	ppm				
	0.20	0.10	0.05	0.02	testigo
1	100	100	75	50	0
2	50	50	50	25	25
3	75	75	50	50	25
4	100	50	75	75	0
5	75	75	75	50	0
6	75	75	25	0	0
7	100	75	75	75	0
8	100	100	75	75	0
9	100	75	50	50	25
10	75	75	75	75	0

Se observa (Cuadro 21) que no hubo inhibición en ninguno de los aislamientos, al extracto de la granada solo se leyó actividad fungística en las diferentes concentraciones, sin embargo, el testigo tampoco hubo crecimiento, esto puede ser que no se le halla inoculado suficiente micelio, según Aguilera-Carbo *et al.* (2005), el extracto de la granada tiene efecto inhibitorio sobre bacterias de alimentos, pero no hay reportes que tenga efectos sobre hongos fitopatógenos.

Cuadro 21.- Porcentaje de Inhibición del crecimiento de 10 aislamientos monosporicos de *Fusarium oxysporum* por 4 concentraciones del extracto de granada.

Cepas	ppm				testigo
	0.21	0.11	0.05	0.02	
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	25	25	0	0	0
5	50	25	0	0	0
6	25	0	0	0	0
7	25	0	0	0	0
8	25	25	0	0	0
6	0	0	0	0	0
10	25	0	0	0	0

El ácido galico solo tubo actividad fungística en el aislamiento 2 (Cuadro 22), es importante mencionar que en los otros aislamientos no hubo crecimiento, es muy probable que no se le haya inoculado suficiente micelio. No hay literatura que demuestre que el ácido galico comercial tenga actividad inhibitoria sobre hongos fitopatógenos.

Cuadro 22.- Porcentaje de Inhibición del crecimiento de 10 aislamientos monosporicos de *Fusarium oxysporum* por 4 concentraciones del acido galico.

Cepas	ppm				Testigo
	1000	500	250	125	
1	0	0	0	0	0
2	25	25	25	25	25
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0

En el cuadro 23, se observa que el unico aislamiento inhibido por el acido elagico es la 7 en la concentracion 125 y las demas concentraciones solo tubo efecto fungistatico, es raro ver una concentración baja inhibiendo, pero es muy probable que le haya inoculado muy poco micelio, pero tambie puede ser que el ac. elagico haya perdido sus propiedades, ya que la exposición de al luz lo oxida., estos resultado son equivalentes a los obtenidos por Ventura–sobrevilla (2006) la cual encontrao que el acido elagico solo tiene efecto fungistatico en *Fusarium oxysporum* y otros hongos.

Cuadro 23.- Porcentaje de Inhibición del crecimiento de 10 aislamientos monosporicos de *Fusarium oxysporum* por 4 concentraciones del acido.elagico.

Cepas	ppm				testigo
	1000	500	250	125	
1	50	0	0	0	50
2	50	50	50	50	25
3	75	75	0	0	25
4	0	0	0	0	0
5	0	0	50	0	100
6	75	75	0	0	0
7	75	75	75	100	25
8	0	25	50	0	0
9	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0

El análisis para determinar el efecto del extracto sobre la inhibición del crecimiento de 10 aislamientos de *Fusarium oxysporum* (Cuadro 24) se determinó que el valor del estadístico de Kruskal-Wallis fue de 7.112 con 9 grados de libertad y un valor de  $P=0.625$  de significancia, por lo tanto los aislamientos de *F. oxysporum* son inhibidos de igual manera por los diferentes extractos. El estadístico de correlación fue de 0.338 y  $p=0.561$  por lo tanto no hay una asociación entre el tipo de aislamiento y la inhibición por el extracto.

Cuadro 24.-Comparación estadística para *Fusarium* por crecimiento con el estadístico Cochran-Mantel-Haenszel (basado en calificaciones de rangos)

Estadístico	Hipótesis alternativa	gl	Valor	Prob
1	Correlación no cero	1	0.338	0.561
2	Difer. calific. promedio hileras	9	7.112	0.625

Numero total de muestras = 249

En la determinación del efecto del extracto sobre la inhibición del crecimiento se encontró que el valor del análisis estadístico de Kruskal-Wallis (Cuadro 25) fue de 88.553 con 4 grados de libertad y un valor de  $P=0.001$  de significancia por lo tanto el tipo de extracto afecta en forma diferente el crecimiento de los *F. oxysporum*. El análisis estadístico de correlación fue de 40.605 y con  $P=0.001$ , por lo tanto, hay una asociación entre el extracto y el grado de inhibición del crecimiento de los aislamientos, no se encontraron trabajos de este tipo con este método estadístico no paramétrico.

Cuadro 25.-Comparación estadística para el extracto por crecimiento con el estadístico de Cochran-Mantel-Haenszel (Basado en calificaciones de rango)

Estadístico	Hipótesis alternativa	gl	Valor	Prob
1	Correlación no cero	1	40.605	0.001
2	Difer. calific. promedio hileras	4	88.553	0.001

Numero total de muestras = 249

Para determinar el grado de inhibición del crecimiento por la concentración del extracto se encuentra que el valor del estadístico de Kruskal-Wallis (cuadro 26) fue de 27.271 con un valor de significancia de  $P=0.001$ , por lo tanto la concentración del extracto afecta en forma diferente el crecimiento de los aislamientos. La correlación fue de 27.045 y  $P=0.001$  de significancia, por lo tanto hay una asociación entre la concentración del extracto y la inhibición del crecimiento de los aislamientos, es decir, que cada extracto inhibe de diferente manera dependiendo de la concentración.

Cuadro 26.-Comparacion estadistico para concentración por el crecimiento con el estadístico Cochran-Mantel-Haenszel (basado en calificaciones de rango )

Estadístico	Hipotesis alternativa	gl	Valor	Prob
1	Correlacion no cero	1	27.045	0.001
2	Difer. calific. promedio hileras	4	27.271	0.001

Numero total de muestras = 249

En este caso se utilizó un procedimiento no paramétrico con la opción Wilcoxon (cuadro 27) que da calificaciones de dos diferentes variables. El procedimiento no paramétrico mostró que las calificaciones de rangos medios en los aislamientos 1,2,5, y 8 fueron equivalentes entre ellos, se agrupó con los aislamiento 4, 6, 9, mientras que el más afectado por los extractos es la cepa 7 y el menos afectado la cepa 10.

Las calificaciones medias de la inhibición de los extractos sin importar la concentración (cuadro 28) muestra que el extracto que inhibió más fue la 2 seguido por 1 y 5 y por último tenemos a la 3 y a la 4 que son lo que inhibieron menos de todos, esto es sin importar el aislamiento de *Fusarium oxysporum*.

Cuadro 27.- calificaciones de Wilcoxon (Suma de rangos) para la variable crecimiento clasificado como variable hongo.

Hongos	N	Esperado calificaciones	Dev. Est. bajo H0	calificación bajo H0	promedio
1	25	3084.50000	3137.50000	311.517685	123.380000
2	25	3143.00000	3137.50000	311.517685	125.720000
3	25	2841.50000	3137.50000	311.517685	113.660000
4	25	3302.00000	3137.50000	311.517685	132.080000
5	25	3053.50000	3137.50000	311.517685	122.140000
6	25	3353.00000	3137.50000	311.517685	134.120000
7	25	2605.50000	3137.50000	311.517685	104.220000
8	25	2964.00000	3137.50000	311.517685	118.560000
9	25	3360.50000	3137.50000	311.51768	134.420000
10	25	3667.50000	3137.50000	311.517685	146.700000

Promedio de calificaciones relacionados

Kruskal-Wallis Test (Chi-Square Approximation)

CHISQ = 7.5563      DF = 9      Prob > CHISQ = 0.5794

Cuadro 28.- Wilcoxon calificaciones (Suma de rangos) para la Variable crecimiento clasificado por la variable extracto.

Extracto	N	Esperado calificaciones	Dev. Est. bajo H0	calificación bajo H0	promedio
1	50	4328.50000	6275.0	415.356913	86.570000
2	50	3728.00000	6275.0	415.356913	74.560000
3	50	8126.00000	6275.0	415.356913	162.520000
4	50	8583.00000	6275.0	415.356913	171.660000
5	50	6609.50000	6275.0	415.356913	132.190000

Promedio de calificaciones relacionados

Kruskal-Wallis Test (Chi-Square Approximation)

CHISQ = 88.759      DF = 4      Prob > CHISQ = 0.0001

Las calificaciones medias obtenidas indican que a mayor concentración hay mayor inhibición esto sucede porque hay mayor cantidad de polifenoles, y a menor concentración sucede lo contrario (Cuadro 29), estos resultados concuerdan con los reportados por Lopez *et al.* (2005), esto sin importar en el hongo que se aplico ni tampoco el tipo de extracto.

Cuadro 29.- Wilcoxon calificaciones (Suma de rangos) para la variable crecimiento clasificado por la variable concentración.

Concent	N	Suma de calificaciones	Esperado bajo H0	Dev. Est. bajo H0	calificación promedio
1	50	4872.00000	6275.0	415.356913	97.440000
2	50	5358.50000	6275.0	415.356913	107.170000
3	50	6198.00000	6275.0	415.356913	123.960000
4	50	7071.50000	6275.0	415.356913	141.430000
5	50	7875.00000	6275.0	415.356913	157.500000

Promedios de calificaciones relacionados

Kruskal-Wallis Test (Chi-Square Approximation)

CHISQ = 27.863      DF = 4      Prob > CHISQ = 0.0001

## 5.- Evaluación de la actividad biológica de los extractos, sobre cepas de bacterias fitopatógenas.

Para el análisis de datos se utilizó el Análisis categorico de datos usando tablas s x r donde las variables de las columnas y las hileras fueron clasificados nominalmente. El estadístico al azar de Qs está marcado como Mantel-Haenszel Chi-cuadrada, el valor Chi-cuadrada de Pearson Qp está etiquetado "Chi-Square". Qs tiene un valor de 21.073 (Cuadro 30) y P=0.001; Qp tiene un valor de 173.413 y P=0.001, ambos son claramente significativos, por lo que se concluye que hay una estrecha asociación entre el extracto y la inhibición del crecimiento de las bacterias. Para la variable extracto se encontró un valor de 21.073 el cual es altamente significativo, por lo tanto los extractos inhiben diferente el crecimiento de las bacterias. La gobernadora inhiben más el crecimiento de las bacterias seguido del extracto de la nuez y la granada inhibiendo en menor grado

el crecimiento (cuadro 31). Por lo tanto hay un asociación entre el extracto y el crecimiento.

El valor QMH para la correlacion no cero fue =21.073, con 1 grado de libertad esto es claramente significativo la cual refuerza la idea de la relacion estrecha entre el extracto y la inhibición de crecimiento de la bacterias (Cuadro 32). Una posible explicación es que la gobernadora inhibio mas porque presenta una mayor concentración de polifenoles, en comparación con la nuez y la granada. Cabe señalar que Aguilera-Carbo *et al.* (2005) reportan que la gobernadora y la granada tienen efectos inhibitorios sobre bacterias de alimentos a concentraciones mayores de 50 µgmL<sup>-1</sup>. En este estudio se evaluo el efecto de los extractos de gobernadora sobre el crecimiento de bacterias fitopatogenas, sin embargo, coincide con lo reportado para bacterias de alimentos. Es de enfatizar que aunque no se tiene estudios del efecto de los tres extractos (gobernadora, nuez y granada) sobre bacterias fitopatogenas, Peralta-Bello (2004) reporta que hay inhibición del crecimiento de las bacterias *Pseudomana cichorii*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* y *Erwinia carotovora* pv *atroseptica*, con extractos de *Flourensia cernua* D.C.

Cuadro 30.-Comparacion estadistica para el efecto del extracto sobre el crecimiento bacteriano con el estadístico Cochran-Mantel-Haenszel (Basado en calificaciones de rango)

Esatdistico	Hipotesis alternativa	gl	Valor	Prob
1	Correlación nocero	1	21.073	0.001
2	Difer. Calific.promedio hileras	2	37.089	0.001
3	Asociación general	6	173.048	0.001

Numero total de muestras=475

Cuadro 31.- Porciento de crecimiento de diferentes bacterias fitopatogenas expuestas a tres extractos vegetales y cuatro concentraciones

Frecuencia, Percepcion , hilera Pct , Col Pct	% de crecimiento bacterias				Total
	E.c.sbsp. c.	Ps.c	X.a.pv ph.	X.a.pv v.	
Gobernadora	50	0	25	0	75
	10.53	0.00	5.26	0.00	15.79
	66.67	0.00	33.33	0.00	
	33.33	0.00	14.29	0.00	
Granada	75	75	75	75	300
	15.79	15.79	15.79	15.79	63.16
	25.00	25.00	25.00	25.00	
	50.00	100.00	42.86	100.00	
Nuez	25	0	75	0	100
	5.26	0.00	15.79	0.00	21.05
	25.00	0.00	75.00	0.00	
	16.67	0.00	42.86	0.00	
Total	150	75	175	75	475
	31.58	15.79	36.84	15.79	100.00

Cuadro 32.-Estadistico de extracto menos inhibición de las bacterias fitopatogenos

Estadistico	gl	Valor	Prob
Chi-Square	6	173.413	0.001
Likelihood Ratio Chi-Square	6	209.316	0.001
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	21.073	0.001
Phi Coefficient		0.604	
Contingency Coefficient		0.517	
Cramer's V		0.427	

Muestras totales = 475

## CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales en las que se desarrollo la presente investigación podemos concluir lo siguiente:

El mejor metodo de esterilizacion de la placa tipo Elisa fue el de autoclave en un tiempo de 20 minutos con un rango de presion de 5-10 Lb.

El extracto de la gobernadora (*Larrea tridentata* Cov.) a concentraciones altas de 0.20 y 0.10 ppm fue la que mas inhibio las 8 especies de hongos fitopatógenos

El Acido elagico no inhibio a ninguna de las cepas de hongos de las 8 especies diferentes.

La especie mas inhibida por todas los extractos fue *Rhizoctonia solani* y la menos inhibida fue *Fusarium verticillioides*.

El extracto que más inhibio a las cepas 10 de *Fusarium oxysporum* fue el de la nuez, y el que menos efecto fue el Acido elagico; la cepa mas afectada es la 10 y la menos inhibida es la cepa 7; se observó que a mayor concentracion hay menor crecimiento.

El extracto que mas inhibio el crecimiento de las bacterias fitopatogenas es el de gobernadora; las bacterias que mejor se inhibieron son *Pseudomonas cichorii* y *Xanthomonas axanopodis* pv. *vesicatoria* .

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adams, D.W. 1970. A study of the possibilities of treating creosotebush with NaOH to make a good livestock feed. Alpine (Texas). Tesis presentada al Consejo de Graduados de Sul Ross State College.
- Aguilar, C.N., Augur, C., Favela Torres, E. and Viniegra-González, G. 2001 Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. *Process Biochemistry* 36: 565-570.
- Aguilera-Carbo, A. 2005. Efecto inhibitorio del Ácido Elágeno obtenido de cáscaras de granada (*Púnica granatum*) y gobernadora (*Larrea tridentata*) sobre diferentes microorganismos patógenos. Memorias, Congreso internacional de Inocuidad Alimentaria 2005. Monterrey Nuevo León, México.
- Agrios, G.N., 2004, Fitopatología, Editorial Limusa, S.A. de C.V, Grupo Noriega Editores, Mexico, D.F. 428, 444 p.
- Alexopoulos, C. J. and Mins, W.C. 1979. Introductory Micology. 3<sup>th</sup>, edition, 132 p.
- Benson, L. and R.A. Darrow, 1981. *Trees and Shrubs of the southwestern deserts*. The Univ. Of Arizona Press. Tucson, Arizona United States of América. 416 p.
- Botkin, C., W. y Duisberg, P., C. (1949). The Nordihidroguajetico Acid content of the Creosotebush. Bull, 349, New México State College, 15 p.
- Bovey, R. 1977. La defensa de las plantas cultivadas. Primera Edición, Editorial omega. España, 883 p.
- Calderoni, V.A. 1978. enfermedades de la papa y su control. 1<sup>a</sup> Edición editorial, Hemisferio Sur, Argentina, 142 p.
- Campos, A. J. 1977. Prácticas de bacteriología. Colegio Postgraduados. Rama de Fitopatología. Chapingo, México 45 p.
- Cruz-Hernández, M. 2002. Aislamiento y caracterización morfológica de cepas Fúngicas degradadoras de taninos. Tesis de nivel Licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila. México. pp 50-69.
- De las Fuentes, V., 1970. Utilización de la gobernadora (*Larrea tridentata*, cov.) Como forraje en comparación con alfalfa (*Medicago sativa* L.). Monterrey, I.T.E.S.M. Tesis 41 p.
- De la Garza, G.J.L.; 1996. Fitopatología general. Ed. Universidad Autónoma de Nuevo León, 513 p.

- Delcour, J.A. and de Varebeke, D.J. (1985). A new colorimetric assay for Flavanoids in pilsner beer. *Journal of the Institute of Brewing*. 91:37-40.
- Diaz, Z. R. 1989. Estudio monográfico de la pierna negra (*Erwinia corotovora* var. *atroseptica* (Van may) Dye .) en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.). Monografía. UAAAN. Saltillo, Coahuila, México. Pp 88-89.
- Dubois, M. Guiles, K. A. Hamiton, J.K. Rebers P.A. y Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem*.25:530.
- Duisberg, P. C. (1952) "Development of a Feed from the Creosotebush and the determination of its Nutritive Value". *J. Of Animals Science*. Vol., 11:174-180.
- Esau, K. 1977. *Anatomy of seed plants*. 2<sup>a</sup> ed. Wiley, New York. 58 p.
- Fahn, A. 1974. *Plant Anatomy*. 2ed. Pergamon Press, Oxford. 60 p.
- FAO, 1953. Proyecto 5000. Las posibilidades de producción de materiales taninos vegetales. Inst. Mex. De Inv. Tec. México.
- Fernandez-Prida, C. 1977. *Análisis de productos forestales*. Esc. Tec. Sup. De Ing.De Montes, Madrid.
- Fuentes, D., V. O. 1960. *Elementos de fitopatología*. Ediciones . Universidad de coahuila. 56 p.
- Folin, O. and Denis, W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as colour reagents. *Journal of Biological Chemistry*. 12:245-251.
- French, E. R. 1977. Enfermedades bacterianas de la papa en Latinoamérica. *Fitopatología*. 12 (2): 87-96 .
- Gallegos, M. G., Cepeda, S. M. Olayo, P. R. P. 2003. *Entomopatógenos*, Editorial, Trillas, Mexico, pp 9-10.
- Gisper, C. Gay, J. Vidal, J. A. 2001. *Enciclopedia práctica de la agricultura y ganadería*, Editorial . Grupo oceano, pp 703-704.
- González, E.M. 1975. *Distribución especial de la vegetación y su interpretación sucesional en el Norte del estado de Zacatecas*. Tesis Lic. Chapingo. Estado de México, 263 p.
- González, M. H. 1968. "Ecología y Distribución de la gobernadora". Sumario de la Conferencia sobre Gobernadora (*Larrea tridentata*). Sul Ross State College, Alpine Texas, 9 p.

- Haslam, E. 1966. Chemistry of vegetable tannins. In: Economic Botany. Plants in our world. Berul Brintnall-Simpson and Molly Conner- Ogorzaly., the University of Texas at Austin editorial Mc Graw-Hill, Inc. 505 p.
- Holliday, P. 1980. Fungos diseases of tropical crops. London 85, p
- Hooker, W. J. 1990. Compendium of potato Diseases. The America Phytopathological Society. United dtates of America, 125 p.
- Jones, J.B., J.P. Jones, R.E.stall y T.A. Zitter ;1997. Compendium of tomato es diseases. The American Phytopathological, Society, 73 p.
- Jones , J. *et al.* 1991 Compendium of tomato diseases. Aps- Prens. Usa. 20 p.
- Kennedy, B. W. and Alcorn, S. M. 1980. Estimatos of us crop losses to procaryote plant pathogens. Plant Disease. 64: 614-676 .
- Lastra, N. 1970. "La gobernadora (*Larrea tridentata*, Cov.). Procesada como forraje para caprinos". Monterrey. I.T.E.S.M. Tesis, 61 p.
- Lindroth, R. L., Hsai, M.T.S. and Scriber, J.M. (1987) Seasonal patterns in the phytochemistry of three *Populus* species. Biochemical Systematics and Ecology. 69: 814-822.
- Lopez B. A., Lopez B. S. R., Vázquez B., Rodriguez H. , Mendoza Elos y Patron C. E. 2005. Inhibición del Crecimiento Micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. *F. sp. Lycopersici* (Sacc.) Zinder y Hansen, *Rhizoctonia solini* Kuhn y *Verticillium dahliae* Kleb. Mediante extractos de Vegetale acuosos, Revista Mexica de Fitopatologia vol.23, 2005. 183-190p
- López Ríos, G.F. 1989. Fitoquímica. 1 ed. U.A. Chapingo. Estado de México.13p.
- Luis, M. 2002. Fúngica de la Tanasa en Cultivo Sumergido y en Estado Sólido Utilizando *Larrea tridentata* Cov, Como Fuente de Carbono y Energía. Tesis de nivel Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México.
- Martinez, G.F.1993. Principales plagas y enfermedaes que atacan al cultivo chile (*capsicum anum* L.) monografía.UAAAN., Buenavista , Saltillo, Coahuila , México, 1-7, 139 p.
- Martinez-Valverde, I, Periago, M de J y Ros, G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. ALAN. [online]. mar. vol.50, no.1 , p.5-18.
- Martin,J.S. and Martin, M.M. 1983. Tannin assays in ecological studies:Precipitation of ribulose-1,5-biphosphate carboxilase/-oxygenase by tannin acid,que bracho and oak leaf foliage extracts. Journal of Chemical Ecology. 9: 285-294.

- Méndez, A. y P.R.O. 1984. Energía metabolizable del sorgo y efecto de la adición de aceite a dietas con sorgo dulce o amargo. Avances de investigación (resúmenes). Colegio de Postgraduados.
- Mendoza, Z. C. 1996. Enfermedades fungosas de hortalizas. Patronato Universitario de Chapingo , México. pp 4, 43-44, 55.
- Michael D.R.; V.Subbaroo K.; N, Raid.; Kurtz A. E. 2002. Plagas y enfermedades de la lechuga; The American phytopathological society, Edición Mundi-Prensa .pp 30-31.
- Montes-Belmont R., 1996. Productos naturales de origen vegetal para el combate de Patógenos. Revista Mexicana de Fitopatología 14 (1): 9-14.
- Mueller-Harvey, I. 2001. Análisis of hydrolysable tannins. Animal Feed Science and Technology. 91, 3-20.
- Naczk, M.; Oickle, D.; Pink, D. and Shahidi F. 1996. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 44:2144-2148.
- Nelson, T.E. 1994. A photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucosa. Journal of Biological Chemistry. 153:375-381.
- Núñez, C.R. De. 1998. Cancer bacteriano In. J.Cruz O., R. Garcia E., y A. Carrillo F. (eds.). Enfermedades de las hortalizas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Sinaloa, México. p.73-78.
- Ohata K., Serizawa S. y Shirata A. 1982. Infection source of the bacterial rot lettuce by *Pseudomonas cichorii*. Bolletin of the National Institute of Agricultural Sciences. 36: 75-80.
- Olivares, S.C. 1983. Determinación del contenido de taninos vegetales en *Acacia*, *Phosopis* y *Quercus*. Inst. Tecn. Y de Est. Sup. De Monterrey. Tesis.
- Ortis, C.1972. "Procesado de la planta de gobernadora (*Larrea tridentata*, cov.) con cal  $\text{Ca(OH)}_2$  para posibles usos en alimentación del ganado". Monterrey, I.T.E.S.M. Tesis, 51 p.
- Peralta-Bello , J. E. 2006. Evaluacion de la actividad de extractos de hojas en *Flourensia cernua* D.C. in vitro en el control de las bacterias fitopatogenas; *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye., *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica* (Van may) Dye y *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp. pp 55-62.
- Ponce, G. F., Acosta, R. M., Mendoza, Z. C. 2006. Manual de micología taxonómica, area de fitopatología, deparatmento de parasitología agrícola, Universidad Autonoma Chapingo. pp 6-12.

- Porter, L.J. 1989. Tannins. In Harborne, J.B. (ed.) *Methods in Plant Biochemistry*. 1, 389-419.
- Puente-González, A. 2002 La *Nuez*, análisis de su rentabilidad. Revista "Claridades Agropecuarias, pp 3-4.
- Price, M.L. and Butler, L.G. 1978. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 25, 1268-1273.
- Rodríguez A. J. 1993, *Fruticultura, ciencia y arte*; Agt Editor, S.A. 344 p.
- Rodríguez, M.M. L. 2000. Enfermedades bacterianas más comunes en hortalizas. P. 128-133. In: N. Bautista M., D. Suárez V. A. y O. Morales G. (eds.) *Temas selectos en fitosanidad y producción de hortalizas* Colegio de postgraduados. Montecillos, México.
- Sánchez A., E.E. 2001. Aplicación y usos potenciales de la tanasa y taninos Monografía QFB. U. A. de C. Saltillo. Coah. 25 p.
- Sánchez-Lamar, A., Cozzi, R., Cundari, E., Fiore, M., Ricordy, R., Gensabella, G., Degrassi., y De Salvia, R. 2005. Extracto de frutos enteros de *Punica granatum* L. como agente protector del daño inducido por el peróxido de hidrógeno. *Rev Cubana plant med*;10(2)
- Sherve, F. and Wiggins I., L. (1964) *Vegetation and Flora of the Sonora Desert*. Stanford University Press, copia 1, pp 165-167.
- Shirata A., Ohata, K., Serizawa S., y Tsuchiya Y. 1982. Relationship between the lesion development by *Pseudomonas cichorii* and growth stage and leaf position of lettuce and its infection mechanism. *Bulletin of the National Institute of Agricultural Science*. 36, 61- 73 .
- Smith, I. M.; Dunez, J.; Phillips, D.H.; Lelliott R. A.; Archer, S.A. 1992, *Manuel de enfermedades de las plantas*. Mundi-Pensa. España, pp 201- 329.
- Standley, P., C. 1961. *Trees and Shurb of México Sonora*, M.E. 1984. Algunas consideraciones nutricionales y químicas de sorgos con diferente contenido de taninos. Tesis M.C. México.
- Swain, R.G. 1979. Tannis and Lignins in herbivores their interaction with Secondary. 61 p.
- Tequida-Meneses, M., Cortez R. M., Rosas B. E. C., Lopez S.S. y Corrales M. C., 2002. Efectos de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus Níger*, *Penicillium chrysogenum*, *penicillium expansum*, *Fusarium verticillioides* y *Fusarium poae*. *Rev. Iberoam Micol*;19:84-88

- Torres, S. C. X. , 2002 Manual Agropecuario ; Biblioteca del Campo. fundación hogares juveniles campesinos, Bogota , Colombia. pp 1012-1013.
- Tlapal, B. B.;Mendoza, Z. C. 2002. Enfermedades de origen fungoso en ornamentales *In: manejo fitosanitario de ornamentales*. N, Bautista M, Jorje A. L., J.Cesar C. P., Hussein S. A. (eds.) Intituto de Fitosanidad , Colegio de postgraduados. pp 100-102.
- Thies, M. and Fischer, R. (1972). Photometrische bestimmung von gallosaure durch farbreaction mit rhodanin. *Mikrochimica Acta*. pp 809-814.
- Treviño-Cueto, B. 2006. Obtencion de acido galico y tanasa a partir de gobernadora (*Larea tidentata* Cov.) , estudios basicos. 40 p.
- Ventura-Sobrevilla, J., Saucedo-Pompa, S., Belmares cerda, R. Aguilera-Carbo, A.,Heredia, N. y Aguilar, C.N, (2006) Nuevas alternativas efectivas de control de microorganismos patogenas bacterianos y fungicas de alimentos. caretel. Congreso internacional de Inocuidad Alimentaria 2006. Monterrey Nuevo León, México.
- Vit, P.,M. Corao,G.,2004. (*Punica granatum*) L. Ficha botánica de interés Apícola en Venezuela, No. 9 Granada. Revista de la facultad de farmacia vol. 46 (2) 41 p.
- Watterson, J. J., and Butler, L.G. 1983. Occurrence of an unusual eucoanthocyanidin and absence of proanthocyanidins in sorghum leaves. . *Agric Food Chem*.
- Wettsein, R. I (1994). Tratado de Botánica Sistemática. Editorial Labor, S. 767 p.
- Wilson, T.C. and Hagerman, A.E. 1990. Quantitative determination of ellagic cid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38, 1678-1683 p.
- Zavaleta, M. E. 1987. Modificadores orgánicos en el manejo de enfermedades e la raíz. *Revista Mexicana de Fitopatología* 5 (2): 159-168.

### **Paginas de internet consultadas**

[http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/70-zygop2m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/70-zygop2m.pdf).

<http://www.unne.edu.ar/cyt/2002/05-Agrarias/A-058.pdf>

[http://www.cofemermir.gob.mx/uploadtests/2544.66.59.12.Veza\\_Australia\\_4.doc](http://www.cofemermir.gob.mx/uploadtests/2544.66.59.12.Veza_Australia_4.doc)

[www.rancholobos.com/rancholobos/plantasmed.shtm](http://www.rancholobos.com/rancholobos/plantasmed.shtm)

"[http://es.wikipedia.org/wiki/Punica\\_granatum](http://es.wikipedia.org/wiki/Punica_granatum)".

<http://www.hipernatural.com/es/pltgranada.htm>