

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS VEGETALES PARA EL
CONTROL DE *Fusarium oxysporum* EN LA PUDRICIÓN DE RAÍZ DE *Picea*
mexicana

Tesis

Que presenta PATRICIA FERNÁNDEZ GUZMÁN

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Saltillo, Coahuila

Diciembre 2017

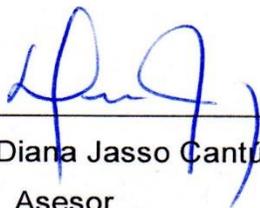
ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS VEGETALES PARA EL
CONTROL DE *Fusarium oxysporum* EN LA PUDRICIÓN DE RAÍZ DE *Picea*
mexicana

Tesis

Elaborada por PATRICIA FERNÁNDEZ GUZMÁN como requisito parcial para
obtener el grado de Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola con la
supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo
Asesor Principal



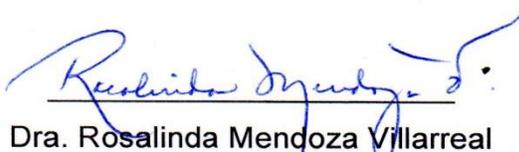
Dra. Diana Jasso Cantú
Asesor



Dr. Roberto Arredondo Valdés
Asesor



Dr. Francisco Castillo Reyes
Asesor



Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Subdirectora de Postgrado
UAAAN

Saltillo, Coahuila.

Diciembre 2017

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Gracias por darme la vida, por enseñarme el camino correcto y por permitirme concluir exitosamente una etapa más en mi vida.

Al Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo por su apoyo, su paciencia, disposición y sus aportaciones en la realización de esta investigación.

A la Dra. Diana Jasso Cantú por el tiempo dedicado a la revisión de esta investigación y sus aportaciones

Al Dr. Roberto Arredondo Valdez por el tiempo y aportaciones realizadas a este trabajo de investigación.

Al Dr. Francisco Castillo Reyes por su tiempo invertido en la revisión de esta investigación así como las aportaciones realizadas.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo económico otorgado para la realización de este trabajo.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por ser parte de mi vida y de mi formación profesional.

A los profesores del Departamento de Parasitología por haberme transmitido sus conocimientos y ser parte de mi formación profesional.

DEDICATORIA

A mi esposo Jaime Trejo Cerón y a mis hijos: Abdul, Abdiel y Amir

Enormemente agradecida por la paciencia y la comprensión que me han brindado en esta etapa de mi vida como estudiante, porque han estado a mi lado; por los maravillosos momentos de risas, alegrías y sobre todo el apoyo incondicional, para ser mejor cada día.

A mis padres: Sra. Ángela Guzmán Soto y Sr. Cosme Fernández López

Porque gracias a su cariño, los valores que me instruyeron desde niña, me han ayudado a culminar una etapa más en mi vida profesional.

A mis hermanos: Ene, Toño, Male, Idalid y Aby

Quienes han creído y confiado en todo momento en mí, deseo compartirles un triunfo más en mi vida profesional.

A mis suegros: el Sr. Sotero Trejo baños y a la Sra. Teresa Cerón García

Gracias por cada momento, por compartir su cariño, su conocimiento y experiencias conmigo.

A mis cuñados Mine, Leo, Chely, Licho y Tere

Enormemente agradecida por su apoyo y su cariño.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Clasificación Taxonómica de <i>Picea mexicana</i> Martínez (1961).....	4
Descripción de <i>Picea mexicana</i>	4
Descripción Ecológica de <i>Picea mexicana</i>	5
Enfermedades Fungosas de Coníferas en Invernaderos.....	5
Pudrición de la Raíz por <i>Fusarium oxysporum</i>	5
Clasificación taxonómica de <i>F. oxysporum</i>	5
Importancia de <i>F. oxysporum</i> en pinaceas.....	6
Características Morfológicas de <i>Fusarium oxysporum</i>	6
Sintomatología de <i>F. oxysporum</i>	7
Biología y ecología.....	7
Medidas de Control de <i>Fusarium oxysporum</i>	8
Control cultural.....	8
Control químico.....	8
Control biológico.....	9
Extractos Vegetales Como Fungicidas Naturales.....	10
<i>Larrea tridentata</i> Moc. & Seseè D.C. Coville.....	12
Clasificación taxonómica.....	12
Distribución geográfica.....	12
Descripción botánica.....	13
Composición fitoquímica.....	13
Propiedades antifúngicas.....	13
<i>Agave lechuguilla</i> Torr	14
Clasificación taxonómica.....	14
Distribución geográfica.....	14

Descripción botánica.....	14
Composición fitoquímica.....	15
Propiedades antifúngicas.....	15
<i>Jatropha dioica</i> Sessé	15
Distribución geográfica.....	15
Descripción botánica.....	15
Composición fitoquímica.....	16
Propiedades antifúngica.....	16
<i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch	16
Clasificación taxonómica.....	16
Distribución geográfica.....	16
Descripción botánica.....	17
Composición fitoquímica.....	18
Propiedades antifúngicas.....	18
<i>Lippia graveolens</i> Kunth.....	19
Clasificación taxonómica.....	19
Distribución geográfica.....	19
Descripción botánica.....	20
Composición fitoquímica.....	20
Propiedades antifúngicas.....	20
MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
Localización del Área de Estudio.....	22
Extractos Vegetales.....	22
Colecta de plantas.....	22
Procesamiento de las plantas.....	22
Preparación de Extractos Crudos.....	22
Preparación de Extractos Resuspendidos.....	23
Análisis de Compuestos Fitoquímicos de Extractos Acuosa y Etanólicos.....	23
Aislamiento e Identificación de <i>F. oxysporum</i>	24
Conservación de hongos.....	24

Actividad Antifúngica de los Extractos Vegetales.....	24
Prueba in vitro de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre <i>Fusarium oxysporum</i>	24
Porcentaje de Inhibición.....	25
Concentraciones Inhibitorias al 50% (CI50).....	25
Efecto de Diferentes Extractos Etanólicos como Tratamiento a la Semilla para el Control de <i>Fusarium oxysporum</i>	26
Incidencia.....	26
Germinación.....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
Extractos Obtenidos.....	27
Fitoquímicos Presentes en los Extractos Acuósos y Etanólicos.....	27
Agente Causal de la Pudrición Radical de <i>Picea</i>	30
Actividad Antifúngica de los Extractos de Plantas Sobre el Crecimiento de <i>F. oxysporum</i>	31
Efecto de Diferentes Concentraciones de Extractos Acuósos sobre <i>F.</i> <i>oxysporum</i>	31
Efecto de Diferentes Extractos Etanólicos sobre el Crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i>	32
Concentración Inhibitoria al 50% (CI50) de los Extractos Etanólicos...	34
Efecto de diferentes extractos etanólicos como tratamiento a la semilla para el control de <i>Fusarium oxysporum</i> en <i>Picea mexicana</i>	36
Incidencia.....	36
Germinación.....	38
CONCLUSIONES.....	40
REFERENCIAS.....	41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.Extractos obtenidos y empleados para determinar su actividad antifúngica contra <i>F. oxysporum</i> mediante el método de microdilución en placa.....	27
Cuadro 2 .Componentes fitoquímicos encontrados en los extractos vegetales acuosos y etanólicos.....	29
Cuadro 3.Concentración CI_{50} de extractos etanólicos resuspendidos para inhibición de <i>F. oxysporum</i>	35
Cuadro 4. Concentración CI_{50} de extractos etanólicos crudos para inhibición de <i>F. oxysporum</i>	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pagina
1	Características morfológicas del hongo fitopatógeno <i>Fusarium oxysporum</i> A) Crecimiento de micelio en PDA.B) microconidia, macroconidia.....	30
2	Microplaca de extractos acuosos con crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i>	31
3	Porcentaje de inhibición de extractos resuspendidos etanólicos de plantas sobre <i>F. oxysporum</i>	32
4	Porcentaje de inhibición de extractos resuspendidos etanólicos de plantas sobre <i>F. oxysporum</i>	33
5	Incidencia de <i>Fusarium oxysporum</i> en semillas de <i>Picea mexicana</i> con influencia de los extractos vegetales.....	37
6	Germinación de semillas de <i>Picea mexicana</i> con influencia de los extractos vegetales.....	39

RESUMEN

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS VEGETALES PARA
CONTROLAR A *Fusarium oxysporum* EN LA PUDRICIÓN DE RAÍZ EN *Picea*
mexicana

Por

PATRICIA FERNÁNDEZ GUZMÁN

MAESTRO EN CIENCIA EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
CALZADA ANTONIO NARRO No. 1923, BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA
OCTUBRE 2017

DR. FRANCISCO DANIEL HERNÁNDEZ CASTILLO –ASESOR-

Palabras Clave: Peligro de extinción, Inhibición, Patógeno, Dilución en Micro-Placa.

Picea mexicana Martínez especie endémica de México en peligro de extinción amenazada por diversos factores, entre estos; plagas y enfermedades como es el caso de la pudrición de raíz por *Fusarium oxysporum* ocasionando pérdida de 60 % o más en plántula. El uso de extractos vegetales es una alternativa frente al uso de fungicidas químicos que son potencialmente dañinos y generan cepas resistentes. En el presente trabajo se evaluó *in vitro* e *in vivo* la actividad antifúngica de extractos vegetales de *Larrea tridentata*, *Lippia graveolens*, *Agave lechuguilla*, *Jatropha dioica* y *Carya illinoensis* contra *Fusarium oxysporum* agente causal de la pudrición de raíz en *Picea*. El ensayo *in vitro* se realizó mediante micro dilución en placas. El bioensayo *in vivo* se realizó

aplicando los extractos que obtuvieron mayor actividad antifúngica *in vitro* a semillas de *Picea* en placas Petri con medio MS. Se evaluó la incidencia del patógeno así como el porcentaje de germinación. El extracto etanólico de *Lippia graveolens* tallo fue el que obtuvo mejores resultados *in vitro* alcanzando hasta un 97 % de inhibición en el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, sin embargo se encontró que los extractos acuosos no presentaron actividad antifúngica. En el bioensayo *in vivo* el mejor tratamiento fue el de *Agave lechuguilla* hoja etanólico, reduciendo la incidencia del patógeno y favoreciendo en un 65 % la germinación de la semilla.

ABSTRACT

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF VEGETABLES EXTRACTS TO CONTROL
Fusarium oxysporum IN ROOT PUDDING IN *Picea mexicana*

By

PATRICIA FERNÁNDEZ GUZMÁN

MASTER IN SCIENCE IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
CALZADA ANTONIO NARRO No. 1923, BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA
OCTOBER 2017

DR. FRANCISCO DANIEL HERNÁNDEZ CASTILLO –ADVISOR–

Keywords: Danger of extinction, inhibition, pathogen, dilution in micro-plate

Picea mexicana Martinez is an endemic species of Mexico in danger of extinction, threatened by several factors, among them; pests and diseases as is the case of root rot by *Fusarium oxysporum* causing loss of 60% or more in seedling. The use of plant extracts is an alternative to the use of chemical fungicides that are potentially harmful and create resistant strains. In the present study we evaluated in-vitro and in-vivo antifungal activity of plant extracts of *Lippia graveolens*, *Larrea tridentata*, *Agave lechuguilla*, *Jatropha dioica* and *Carya illinoensis* against *Fusarium oxysporum* agent causal effect of root rot in Spruce. The *in vitro* assay was performed by micro dilution the *in vivo* bioassay was performed by applying the extracts that obtained the highest antifungal activity *in vitro* to *Picea* seeds in Petri dishes with MS medium. The incidence of pathogen as well as the percentage of germination were evaluated. The *in vitro* ethanolic extracts in general had inhibition in the growth of *Fusarium oxysporum*

at 1000 ppm from 75%, *Lippia graveolens* stem reached up to 97% inhibition at 1000 ppm however the aqueous extracts showed no antifungal activity In the *in vivo* bioassay the best treatment was the *Agave lechuguilla* ethanolic leaf, reducing the incidence of the pathogen and favoring in 65% germination of the seed.

INTRODUCCIÓN

Picea mexicana Martínez Silba es una especie endémica que se considera rara, e importante en los bosques del norte de México. Actualmente su distribución espacial se limita a condiciones ambientales muy específicas y poco frecuentes de la zona subalpina entre los 3350 y 3550 msnm (Rzedowski, 1983). Su distribución geográfica está limitada a tres poblaciones endémicas en la Sierra Madre Oriental, en los estados de Chihuahua, Nuevo León y Coahuila, México, con un total de alrededor de 48,527 individuos (Flores-López *et al.* 2005; Ledig *et al.* 2002; Martínez, 1963). *Picea mexicana* se ha situado en la categoría de peligro de extinción en la Norma Oficial Mexicana 059 SEMARNAT 2010 (SEMARNAT, 2010). La especie está amenazada por diversos factores, entre estos; las plagas y enfermedades como es el caso de la pudrición de raíz por *Fusarium oxysporum*, que es una de las enfermedades más comunes en plántulas de coníferas y está ampliamente dispersa en los viveros forestales (García *et al.*, 2007). Este hongo llega a causar la muerte de hasta en un 60 % o más de toda la producción de plántulas (Cibrián *et al.* 2007). Es un patógeno que puede ser transmitido por semilla, por agua de riego o en suelo infectado; llega a causar la muerte de la planta en platabandas completas y se manifiesta desde la germinación de la semilla hasta cuando la planta tiene un desarrollo avanzado; causa la pudrición de la radícula y el endospermo (Cibrián, 2007). Hoy en día existen fungicidas sintéticos ampliamente utilizados en el control de enfermedades de plántulas; sin embargo, los efectos adversos que estos ocasionan por el surgimiento de poblaciones de plagas más agresivas y resistentes, el desequilibrio ambiental que inducen y por ser potencialmente dañinos para la salud humana (FAO 2002), ha generado la búsqueda de alternativas naturales de menor riesgo a la salud y al ambiente. En ese sentido los extractos naturales de plantas, son una área de oportunidad, ya que contienen metabolitos con propiedades antimicrobianas, antivirales y con efecto fungicida, por lo que pueden ser empleadas para controlar diferentes hongos causantes de enfermedades de las plantas (Hernández *et al.* 2007). En el norte de México se desarrollan plantas con un alto potencial en la actividad antimicrobiana (Trejo *et*

al.2015). En el presente trabajo se evaluó la actividad anti fúngica *in vitro* e *in vivo* de los extractos acuosos y etanólicos de *Larrea tridentata*, *Lippia graveolens*, *Agave lechuguilla*, *Jatropha dioica* y *Carya illinoensis* contra *Fusarium oxysporum* para el control de la pudrición radical de *Picea mexicana*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar extractos vegetales de *L. tridentata*, *A. lechuguilla*, *J. dioica*, *C. illinoensis* *L. graveolens* para control de *Fusarium oxysporum*; en la pudrición de raíz en *Picea mexicana*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar taxonómicamente las especies de *Fusarium*, asociadas a la pudrición de raíz de *Picea mexicana*
- Evaluar los extractos de *Larrea tridentata*, *Agave lechuguilla*, *Jatropha dioica*, *Carya illinoensis* y *Lippia graveolens* para el control de la pudrición de raíz de *Picea mexicana*, “*in vitro* e *in vivo*”

HIPÓTESIS

- Al menos algún extracto vegetal de *L. tridentata*, *L. graveolens*, *A. lechuguilla*, *J. dioica* y *C. illinoensis* tiene actividad antifúngica sobre el crecimiento de *F. oxysporum in vitro*.
- Al menos un extracto vegetal controla la pudrición de raíz en *Picea mexicana*.

REVISION DE LITERATURA

Clasificación Taxonómica de *Picea mexicana* Martínez (1961)

Martínez (1961) realizó una comparación entre *Picea mexicana* Martínez, *Picea engelmanni* Parry y *Picea pungens* Engelm, encontrando diferencias entre estas especies por lo cual la consideró como una nueva especie. Por otra parte, Taylor y Patterson (1980) examinaron las comparaciones taxonómicas realizadas por Martínez (1961) y utilizando los resultados de análisis fitoquímicos, concluyeron que *Picea mexicana* no se diferencia de *Picea engelmanni* y reducen la especie a un estatus varietal, nombrándola como *Picea engelmanni* Parry var. *mexicana*. Sin embargo, Ledig et al., (2004) realizaron estudios de isoenzimas, DNA y comparación de cloroplastos en *Picea chihuahuana*, *P. martinezii*, *P. mexicana*, *P. breweriana* S. Watson, *P. engelmannii* y *P. pungens*, concluyendo que *P. mexicana* regresa a su estatus anterior como una especie diferente de *P. engelmannii* quedando en la siguiente clasificación: Reino, Plantae; División, Pinophyta; Clase, Pinopsida; Orden, Pinales; Familia, Pinaceae; Género, *Picea*; Especie, *mexicana*.

Descripción de *Picea mexicana*

Esta especie presenta una altura de entre 25 a 28 m, con un diámetro de 50 a 60 cm, es de corteza lisa con un grosor de 8 a 15 mm. La ramificación inicia desde los 2 o 3 m, presentan ramas verticiladas, las inferiores están extendidas y las superiores son ascendentes formando una copa piramidal. Las ramillas son de color amarillo opaco y finamente pubescente. Las hojas presentan forma cuadrangular de 18 a 36 mm de largo y 1.0 mm de ancho, la terminación de las hojas son córneas y pungentes, con tres y cuatro hileras de estomas en cada cara y no presentan canales resiníferos. Los conos masculinos son subterminales en grupos de tres, de 15 mm de largo por dos de ancho, la prolongación escamiforme del conectivo rómbico orbicular de 2.5 mm de largo y 2.0 mm de ancho, borde superior desigual. Los conos femeninos de forma oval de 5 a 6 cm, de color amarillento opaco ya sean en la parte terminal o en la parte lateral del árbol. Las escamas son rómbicas, estriadas con el ápice redondeado presentando borde superior

con el ápice finamente desigual denticulados con una longitud de 14 mm y 10 a 12 mm de ancho. La bráctea dorsal es elíptica, acuminada (Martínez 1963 y Ledig *et al.*, 2004).

Descripción Ecológica de *Picea mexicana*

Los bosques de *Picea* se encuentran entre 2,000 a 3,200 msnm en áreas con escasa radiación solar y alto contenido de humedad, en laderas de cañadas y barrancas, por lo que ocupan superficies muy reducidas. Las poblaciones de *P. mexicana* se localizan en la Sierra Madre Occidental, en el Cerro Mohinora, Chihuahua y en la Sierra Madre Oriental, entre los Estados de Coahuila y Nuevo León (Rzedowski, 1983). Según (Braham, 1995) los bosques de *Picea mexicana* en el estado de Coahuila se encuentran a una altitud de 3200 a 3700 msnm.

Enfermedades Fungosas de Coníferas en Invernaderos

Los hongos pueden causar muchas enfermedades en las raíces de las plántulas que se producen en contenedores en vivero, estos hongos normalmente se presentan en semillas cuando existen condiciones adecuadas de humedad y temperatura, afectando los tejidos muertos de la testa y algunos logran penetrar el embrión y matar al endospermo y los cotiledones antes de la germinación de la planta; otros alcanzan la planta cuando ya germino, colonizan el tejido suculento y provocan su muerte. La importancia de los problemas fungosos es grande ya que la pérdida de semilla o de plántula puede alcanzar hasta el 100% del total. Los géneros *Rhizopus*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, y *Fusarium* spp. son los fitopatógenos de la raíz más comúnmente reportados (Pawuk, 1981; James, 1985a). Sin embargo el número de hongos que puede estar sobre la semilla puede rebasar las 30 especies.

Pudrición de la Raíz por *Fusarium oxysporum*

Clasificación taxonómica de *F. oxysporum*

La especie *F. oxysporum* pertenece al Phylum Ascomycota, Clase Sordariomycetes, Orden Hipocreales y Familia Nectriaceae. Entre los

hongos filamentosos, el género *Fusarium* es uno de los más importantes, fue descrito por primera vez por Link en 1809 (Leslie *et al.*, 2001

Importancia de *F. oxysporum* en pinaceas

La marchitez por *Fusarium oxysporum* afecta a muchos cultivos agrícolas y representa el problema fitopatológico más importante de las plantas que crecen en sustratos artificiales. Es una de las enfermedades más comunes en plántulas de coníferas, y está ampliamente dispersa en los viveros forestales, causa "Damping-off" preemergente y postemergente y llega a causar la muerte de hasta en un 60 % o más de toda la producción (García *et al.*, 2007). *Fusarium oxysporum* es un patógeno que puede ser transmitido por semilla, por agua de riego o encontrarse en suelo infectado; llega a causar la muerte de la planta en platabandas completas y se manifiesta desde la germinación de la semilla hasta cuando la planta tiene un desarrollo avanzado; causa la pudrición de la radícula y el endospermo (Cibrián, 2001). La mayoría de las plántulas de coníferas incluyendo *Picea*, *Abies*, *Pinus* y *Larix*, son susceptibles a este problema. Aunque las infecciones iniciales son usualmente aleatorias, la dispersión secundaria es probablemente debida a las esporas salpicadas desde semilla o plántulas contaminadas durante el riego y los manchones de enfermedad aparentemente se desarrollan como resultado de esta dispersión secundaria (Bloomberg, 1981).

Características Morfológicas de *Fusarium oxysporum*

F. oxysporum produce tres tipos de esporas asexuales; las microconidias que están conformados por una o dos células, son las más frecuentes y las únicas que se pueden producir en el interior de las haces vasculares de las plantas afectadas. Otro tipo de esporas son los macroconidios los cuales son curvos, se forman en esporodoquios en la superficie de las plantas y presentan de dos a tres septos transversales; las clamidosporas tienen una o dos células redondeadas, son de pared gruesa y se producen en la parte terminal o intercalar en el micelio viejo, este tipo de esporas son estructuras de supervivencia y pueden sobrevivir en el suelo durante más de cinco años dependiendo del clima, cuando estas germinan penetran a través de las heridas que se forman al emerger las raíces laterales o penetran al tejido

joven en la zona de elongación, el micelio avanza intercelularmente y alcanza la región del xilema, se ramifica y produce microconidias, las células se desprenden y son arrastradas hacia arriba por corriente de savia, vuelven a germinar y producen más microconidias, el hongo se desarrolla en las traqueidas, vasos y células parenquimatosas

Sintomatología de *F. oxysporum*

Los síntomas foliares de la pudrición de la raíz por *Fusarium* son variables: las plántulas recientemente infectadas, tienen acículas esparcidas y cloróticas o acículas retorcidas, seguidas por muerte descendente de las puntas, síntomas de marchitamiento y achaparramiento, conforme la enfermedad progresa, el follaje de la plántula frecuentemente se pone café-rojizo justo antes de que ésta muera. Los sistemas radiculares enfermos muestran carencia de desarrollo de raíces finas y extensiva pudrición cortical, por lo que la epidermis puede retirarse en tiras con facilidad. Uno de los principales signos de esta enfermedad, es la producción de estructuras de fructificación (esporodoquios) sobre el tallo de las plántulas, donde masas de esporas amarillo-anaranjadas son exudadas (James, 1985; Landis, 1976). Estas esporas típicamente son multicelulares, tienen forma de hoz, y pueden ser usadas para identificar al hongo. El hongo puede invadir una planta ya sea con el tubo germinativo o el micelio penetrando las raíces de las plantas. Una vez dentro de la planta, el micelio crece intercelularmente a través del tejido cortical. El micelio permanece en los conductos del xilema donde usualmente avanza la infección en dirección de la corona del tallo. Las cepas de *Fusarium oxysporum* entran al sistema vascular a través del xilema no diferenciado en la porción juvenil de las raíces cuando la endodermis todavía no está formada.

Biología y ecología

F. oxysporum puede sobrevivir como saprófito en el suelo, sobre tejidos de plantas, sobre materia orgánica muerta (Castaño, 1994). El hongo puede sobrevivir como micelio o en sus tres diferentes tipos de esporas (Agrios, 1988). La incidencia de la marchitez vascular es severa en cultivos desarrollados bajo condiciones de invernadero. *F. oxysporum* es un hongo

de temperatura cálida; el desarrollo óptimo se presenta a 20 °C aunque el rango varía de 12 a 28°C. Esta temperatura, acompañada de alta humedad relativa, días cortos de baja intensidad lumínica favorecen el desarrollo de la enfermedad.

Medidas de Control de *Fusarium oxysporum*

Control cultural

Los viveristas deben considerar varios aspectos, entre ellos el manejo del sustrato ya que este debe estar formulado para un buen drenaje y un pH ligeramente ácido o neutro así como evitar humedad excesiva en las semillas, almacenar las semillas secas y mantenerlas en condiciones de buena aireación, evitando que se humedezcan. Los contenedores reutilizables deben ser lavados y desinfectados cuidadosamente para prevenir que el inóculo de los hongos pase de un cultivo al siguiente. Los sustratos contaminados son una fuente de inóculo de hongos, y las mezclas con textura fina con frecuencia se compactan y proveen un medio ideal para hongos causantes de enfermedades. La fertilización con elevados niveles de nitrógeno y el exceso de riego, también pueden predisponer a las plántulas, tanto como un ambiente de cultivo con elevada humedad, poca luz, y temperaturas extremadamente altas o baja. Es importante señalar que la aplicación de prácticas culturales inadecuadas, derivadas del desconocimiento de los factores antes mencionados, puede conducir al agravamiento de los problemas fitosanitario

Control químico

Los tratamientos a la semilla incluyen la inmersión en Thiram a razón de 100-200 ml/100 kg de semilla, enjuagues en agua corriente y tratamientos químicos con blanqueador, peróxido de hidrógeno o fungicidas. Las aspersiones con fungicidas también pueden ser aplicadas una vez que los síntomas de la enfermedad se hacen evidentes; esta práctica raramente es curativa ya que la mayor parte del daño ya estará hecho. Los métodos de control químico pueden ser divididos en saneamiento de los contenedores y superficies en el área de cultivo, tratamientos a la semilla, tratamientos al

sustrato, y con fungicidas. El sustrato debe ser analizado para tener la seguridad de que está libre de fitopatógenos, y los contenedores deben ser cuidadosamente lavados y tratados con calor o esterilizantes químicos. Las aspersiones con fungicidas, comúnmente son utilizadas para controlar la pudrición de la raíz por *Fusarium*, pero tales tratamientos funcionan principalmente para limitar su propagación, más que para curar la enfermedad. Durante muchos años, una gran variedad de productos químicos han sido utilizados como fungicidas para inhibir la acción de los fitopatógenos. Sin embargo, estos son potencialmente dañinos para los ecosistemas, afectando el suelo, microorganismos y los animales superiores. Este trastorno puede ser provocado por toxicidad directa, pero a menudo los efectos son más por la ruptura de las cadenas alimentarias, debilitamiento de los sistemas inmunológicos o confusión de las señales químicas por las que se comunican muchos organismos.

Los residuos de plaguicidas se acumulan en los alimentos para consumo humano, un factor asociado cada vez más a las alergias y otras enfermedades. Estos problemas son ahora motivo de preocupación del más alto nivel y han sido relacionados con cánceres, leucemia en niños y defectos de nacimiento. Muchos plaguicidas son directamente tóxicos para los seres humanos; los envenenamientos por plaguicidas son comunes y afectan tanto a los trabajadores que los aplican como a las personas que ingieren alimentos contaminados. El proceso de fabricación de plaguicidas también contamina el medio ambiente, sea por accidente o por emisiones rutinarias (Lampkin 2001). Así, en los últimos años, debido a las preocupaciones sobre la seguridad de los fungicidas de origen químico, ha habido un aumento en el uso de las sustancias naturalmente desarrollados, lo que ha dado lugar a un enorme incremento en el uso de compuestos de origen natural como aceites esenciales y extractos vegetales de diversas partes de las plantas como agentes antifúngicos (Hernández *et al.*, 2007).

Control biológico

Una alternativa ecológicamente amigable del manejo de las enfermedades es el control biológico que se puede definir, como el uso de organismos

vivos para control de plagas como insectos, bacterias, hongos o malezas y como parte de esa estrategia se han usado diferentes organismos antagonistas a los fitopatógenos, como son diferentes especies del género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, y *Streptomyces* entre otros. (Agrios, 2001; Nuez, 1995 y Jaimes *et al.*, 2008). Este tipo de control tiene ciertas ventajas como: la especificidad en su actuación, respeto al medio ambiente y los patógenos tienden a desarrollar menor resistencia a productos microbianos que a productos químicos (Fernández y Juncosa, 2002).

Extractos Vegetales Como Fungicidas Naturales

El uso de extractos vegetales también es importante en el manejo de enfermedades causadas por hongos y bacterias (Rodríguez *et al.*, 2002 y Hernández *et al.* 2011). Actualmente se han descrito una gran cantidad de trabajos relacionados con el efecto antifúngico que presentan algunas plantas. Montes *et al.* (2000) mencionan que han estudiado alrededor de 206 especies de plantas contra 26 especies de hongos fitopatógenos, observando que algunas de ellas tienen efecto durante la germinación de esporas, desarrollo del micelio, esporulación, tanto en pruebas de invernadero como de campo. Así mismo, mencionan que se ha logrado formular productos orgánicos a partir de las plantas en presentación de extractos acuosos, hexánicos, polvos, aceites esenciales y metabolitos secundarios antifúngicos. En términos generales, mencionan que, entre 21 y 32 % de las plantas probadas interactúan con los hongos y las respuestas de los patógenos varían desde la estimulación biológica hasta su total inhibición.

Zapata *et al.* (2003) evaluaron el efecto de los extractos de *Carbón lefaria* (*Cereus deficiens* Otto & Diert) sobre el desarrollo *in vitro* de 10 hongos fitopatógenos creciendo en Papa-Dextrosa-Agar con 0, 25, 50 y 75 % de extracciones etanólicas desgrasadas (EDD) y sin desgrasar (EESD), y acuosas (EA). Los resultados mostraron un efecto significativo de los extractos sobre la reducción del crecimiento micelial de todos los hongos

ensayados, especialmente de *Phytophthora infestans* y *Sclerotium rolfsii*, donde se obtuvieron reducciones del 70 a 94 % de crecimiento micelial.

López *et al.* (2005) evaluaron el efecto inhibitorio de los extractos acuosos de ajo (*Allium sativum*), gobernadora (*Larrea tridentata*), hojaseñ (*Flourensia cernua*), clavo (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y mango (*Mangifera indica*) sobre el crecimiento micelial de *F. oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Verticillium dahliae*. Los resultados indican que el fungicida tiabendazol a una concentración de 100 ppm, inhibió por completo el crecimiento de *F. oxysporum* y *R. solani*, los extractos de clavo y ajo en sus dos concentraciones inhibió el 100 % del crecimiento de los tres hongos después de 72 h de incubación. Todos los extractos mostraron la tendencia a incrementar su efecto inhibitorio con el aumento de las concentraciones dentro del mismo periodo de incubación. Los extractos con el mayor efecto inhibitorio sobre las tres especies de hongos fueron los de clavo, ajo y gobernadora.

Gamboa *et al.* (2003) evaluaron el efecto de inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Phytophthora infestans* Mont. (De Bary) con extractos matanolicos de hojaseñ (*Flourensia cernua* D.C.), mejorana (*Origanum majorana* L.) y trompetilla (*Bouvardia ternifolia*), a diferentes concentraciones (4000, 8000, 12000, 16000 y 20000 ppm). Los resultados indican que los tres extractos mostraron un efecto inhibitorio en el crecimiento de *R. solani* desde la dosis de 4,000 ppm además, se logró inhibir hasta en un 86.2 % el crecimiento de *P. infestans* con el extracto de *F. cernua*; el extracto de *O. majorana* mostro el efecto fungicida desde la concentración de 8,000 ppm; el efecto fungistático sobre este patógeno se conservó a las 96 h con el extracto de *F. cernua* y *B. ternifolia* a la mayor concentración con un 67.2 % y 34.9 % respectivamente.

Salazar *et al.* (1990) mostraron que la resina de la planta rastrea conocida comúnmente como alfombrilla (*Drimaria arenarioides*) al ser aplicada sobre *F. solani*, inhibió su crecimiento en un 85% a la concentración de 5000 ppm.

En el caso de México, una fuente importante de plantas para obtener extractos con potencial antifúngica es el desierto Chihuahuense; en el existe una gran diversidad de plantas que producen compuestos con actividad antifúngica, entre estas se encuentra *L. graveolens* con compuestos como aceites esenciales, timol, carvacol y p-cimeno (Silva *et al.*, 2008); *L. tridentata* que contiene fitoquímicos como polifenoles, taninos, ácido gálico, catequina y NDGA (Mercado y Aguilar, 2008); *J. dioica* contiene compuestos como terpenos, flavonoides, derivados gálicos y catéticos (Belmares *et al.*, 2008); y *A. lechuguilla* que contiene sales minerales, saponinas y oxalatos de calcio (Hernández-Soto y Díaz-Jiménez, 2008). Se han investigado algunas de estas plantas como fungicidas, ejemplo de esto es *L. tridentata* que afectó el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* y *F. oxysporum*, *A. lechuguilla* que controló a *Botrytis cinerea* y *L. graveolens* controló *Penicillium digitatum* (Hernández *et al.*, 2011). En el caso de *J. dioica* disminuyó la incidencia y severidad de *F. oxysporum* en tomate usando extractos del tallo (Salas, 2013).

El uso de extractos vegetales en el tratamiento de enfermedades tanto de humanos como de las plantas, es una práctica muy antigua en muchas partes del mundo. Según los informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente el 80% de la población mundial utiliza productos naturales con fines medicinales (OMS, 2004). Las especies vegetales sintetizan metabolitos secundarios, como polifenoles, taninos, ácido gálico, catequina entre otros, que se utilizan para defenderse de la infección por agentes fitopatógenos, entre ellos los hongos. Por esta razón y otras ya antes mencionadas es factible el estudio de extractos de origen vegetal contra hongos causantes de enfermedades fitopatógenos.

***Larrea tridentata* (Moc. & Seseé ex DC.)**

Clasificación taxonómica

L. tridentata es un arbusto de la familia Zygophyllaceae nativa del suroeste de Estados Unidos y Norte de México (Thompson y Anderson, 2005).

Distribución geográfica

La *L. tridentata* es un arbusto muy común y se encuentra ampliamente distribuido en el desierto de Norteamérica (Rzedowski y Calderón, 2002). En México, la gobernadora se encuentra localizada en los estados del Norte, en partes del desierto sonorense, incluyendo los estados de Baja California Norte, Baja California Sur, Sonora y en el desierto Chihuahuense incluyendo los estados de Chihuahua, Nuevo León, Zacatecas, San Luis Potosí y Durango. Se estima que el 25 % del territorio nacional (500, 000 km) ésta cubierto con este arbusto, presentando diferentes razas.

Descripción botánica

Arbusto muy ramificado, perennifolio, de 0.6 a 3 m de altura. Sus hojas formadas por dos folíolos unidos entre sí en la base. Los folíolos son oblicuamente ovados a lanceolados o falcados, divaricados, de 4 a 15 mm de largo por 3 a 8 mm de ancho, enteros, coriáceos, resinosos, de olor penetrante, verde o verde amarillentos. Sus flores son solitarias de 2.5 cm de diámetro, sépalos elípticos de 6 mm de largo por 4 mm de ancho, pubescentes, caedizos; pétalos de color amarillo fuerte, oblongos a lanceolados, de 1 cm de largo por 3 a 5 mm de ancho, caedizos. Su fruto es subgloboso a ovoide, de 7 mm de largo, coriáceo, con pelos blancos, sedosos, que se vuelven café-rojizos con el tiempo, 5 mericarpios con una semilla cada uno. La semilla café a negra, algo curvadas, de 2 a 4 mm de largo; con contornos triangulares, embrión con los cotiledones paralelos al plano longitudinal. Su sistema radicular superficial, poco profundo y muy extenso. Llega a ocupar casi el total del espacio que hay entre un arbusto y otro.

Composición fitoquímica

Los principales compuestos en la resina de *L. tridentata* Cov reportados hasta ahora en la literatura son muy numerosos; estos son: lignanos, fenoles, flavonoides, aminoácidos y minerales. El ácido nordihidroguairético (NDGA), es uno de los antioxidantes mejor conocido (Tejada, 1983). Presenta propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobiales y es inhibidor de enzimas, con una concentración de cerca de 50 % de la resina

que forma parte de un 10 a 15 % del peso seco de las hojas. Treviño-Cueto *et al.*, (2006).

Propiedades antifúngicas

Rivera Castañeda *et al.* (2001) observaron una inhibición total en la germinación de teliosporas de *Tilletia indica* tratadas con extractos de *L. tridentata* a una concentración de 500mg/mL, las teliosporas tratadas con este extracto no mostraron viabilidad cuando se transfirieron a medio de cultivo fresco, por lo que el extracto de gobernadora mostró su potencial como agente de control.

En un estudio de Lira-Saldívar *et al.* (2002) se encontró que los extractos metanólicos hidrosolubles de resina de *L. tridentata* colectados a diferentes latitudes en los desiertos Chihuahuense y desierto Sonorense, mostraron claramente una acción inhibitoria sobre el crecimiento del hongo *F. oxysporum*, revelando un marcado efecto diferencial en relación con la región geográfica donde se colectó el follaje de gobernadora, debido a que la mayor inhibición (90.3%) ocurrió con los extractos de latitudes sur del desierto sonorense.

Agave lechuguilla Torr

Clasificación taxonómica

La (lechuguilla) *A. lechuguilla* pertenece a la familia Agavaceae, es una planta nativa de las zonas áridas y semiáridas del sur de Estados Unidos de América y del noreste de México hasta los centrales estados de Querétaro, Hidalgo y Guanajuato de México (Castillo *et al.*, 2011).

Distribución geográfica

La lechuguilla es una planta xerófila que vive en zonas áridas y semiáridas del país, crece en condiciones desfavorables, de largos períodos de sequía y altas temperaturas. Nativa del sur de los Estados Unidos y de México representativa del Desierto de Chihuahua (Nobel y Quero, 1986). En México su distribución superficial aproximada es de 20 millones de hectáreas entre

los estados de Coahuila, Nuevo León, Durango, San Luis Potosí, Tamaulipas, Zacatecas, Hidalgo y Oaxaca (Castillo *et al.*, 2011).

Descripción botánica

Planta que forma rosetas pequeñas, muy surculosa (con renuevos de una planta, generalmente de origen subterráneo), de color verde amarillento, de 2-3 m de alto; flores dispuestas en racimos de 1 a 3, 2.5-4 cm de largo (base del ovario a extremo del tépalo); ovario amarillo verdoso, fusiforme, 12-14 cm de largo; tubo poco profundo, con abertura de 2-4 mm de profundidad; tépalos 12-18 mm de largo, extendidos, lineares, amarillos a rojos o púrpuras; filamentos amarillos o rojos, de 2.5-4 cm de largo, insertos en el tubo; anteras amarillas, de 11-16 mm de largo; cápsulas oblongas, de 2-3 cm de largo (Castillo *et al.*, 2011).

Composición fitoquímica

Hernández *et al.* (2005) identificaron distintos compuestos bioactivos, en los que destacaron las saponinas y esteroides; a los que se les atribuyen efectos antifúngicos, antimicrobianos y antiinflamatorios. De igual manera Santos *et al.* (2012) identificaron compuestos fenólicos (polifenoles) con actividad antioxidante, antiinflamatorios, antimicrobianos y probióticos.

Propiedades antifúngica

Jasso de Rodríguez *et al.* (2011), mencionan que extractos etanólicos y hexánicos de *A. lechuguilla* presentaron un efecto antifúngico sobre *R. stolonifer* inhibiendo al 100% su crecimiento, Almanza (2004), también observó una inhibición del 74% en el crecimiento de *Rhizoctonia solani* al usar un extracto etanólicos de *A. lechuguilla* a una concentración de 10%. Pérez-Hernández (2010), observó una inhibición del 100% al usar extractos etanólicos de *A. lechuguilla* sobre el crecimiento de *R solani*.

***Jatropha dioica* Sessé**

Clasificación taxonómica

Es un arbusto de la familia Euphorbiaceae, que presentan un jugo incoloro el cual se vuelve oscuro en contacto con el aire.

Distribución geográfica

J. dioica es nativa de México y de Texas (Richardson, 2010; Fresnedo y Orozco, 2012) se distribuye desde Texas (EUA) y Chihuahua hasta Oaxaca, en la mayoría de los estados del centro del país.

Descripción botánica

Jatropha dioica es una planta originaria de México, comúnmente conocida como sangre de drago, sangre de grado o sangregado. Es un arbusto de 50 cm a 1.50 m de altura, sus ramas son de color rojizo-moreno con las hojas más largas que anchas. Sus flores son pequeñas y en grupos de color rosa. Los frutos son globosos de 1.5 cm de largo y tienen una semilla en su interior (BDMTM, 2009, UAQ, 2009).

Composición fitoquímica

De la raíz se han identificado principalmente diterpenos, citlalitriona, jatrofona, y riolosatriona y un esteral, el R-sitosterol. De las raíces se obtiene un aceite esencial, resina, saponinas, un alcaloide y ácido oxálico. De los tallos emana un látex rico en taninos. Además se ha demostrado que extractos acuosos de la raíz ejercen una actividad antibiótica contra *Staphylococcus aureus* (BDMTM, 2009).

Aguilera *et al.* (2008) cuantificaron uno de los taninos presentes en *Jatropha dioica*, específicamente el ácido elágico, reportando una concentración de 0.81 mg g⁻¹ de planta por lo que puede ser considerada como una importante fuente alternativa de dicho compuesto debido a sus propiedades relacionadas a la salud.

Propiedades antifúngicas

Silva–Belmares *et al.* (2014) probaron extractos de *J. dioica* con hexano, etanol y acetona como solventes, contra diversos microorganismos como *Bacillus sereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*; y observaron que los extractos hexánicos fueron los que presentaron mayor actividad y espectro microbicida atribuido a la presencia de β -sitoesteroles.

***Carya illinoensis* (Wangenh.) K.Koch**

Clasificación taxonómica

Fue descrita por Friedrich von Wangenheim. *C. illinoensis* pertenece a la familia Juglandaceae

Distribución geográfica

Este árbol es nativo de las regiones del Sur de los Estados Unidos y Norte de México. Se han encontrado restos fósiles en Texas y en el Norte de México indicando su existencia antes que los americanos nativos vivieran ahí

Descripción botánica

Árbol de gran altura que puede alcanzar los 60 m, con la corteza marrón, tintada de rojo, irregularmente agrietada, desprendiéndose en escamas. Hojas de hasta 50 cm de longitud, con 11-17 folíolos lanceolados u oblongos, sentados excepto el folíolo terminal, más o menos falciformes, con el margen doblemente aserrado. Base redondeada o cuneada. Limbo de color verde amarillento en el haz y envés más pálido. Flores masculinas en amentos de color verde amarillento que salen en las axilas de las hojas del año anterior. Flores femeninas en espigas con pubescencia amarilla. Frutos en racimos, oblongos, puntiagudos, con 4 costillas. Nuez ovoide o elipsoidal, de agradable sabor y alto valor alimenticio. Las hojas son compuestas, dispuestas en forma alternada, imparipinadas, teniendo de 11 a 17 folíolos de forma oblongo-lanceolada, glabros y de borde aserrado. Presenta una floración diclinomonoica con dicogamia, es decir que las flores femeninas y masculinas de una misma variedad y dispuestas sobre un mismo pie no maduran al mismo tiempo.

La inflorescencia masculina está compuesta por tres amentos péndulos los cuales están unidos por un pedúnculo. Estos amentos se disponen sobre el tercio apical de ramas del último año teniendo de 72 a 123 flores individuales. Cada flor individual a su vez contiene de 3 a 7 estambres con anteras oblongas, presentando cuatro sacos polínicos de dehiscencia

longitudinal.

Las flores femeninas se disponen en una inflorescencia formando un racimo sobre las ramas nuevas. El número de flores producidas varía de acuerdo al largo de las ramas, el cultivar y el clima. Presentan estigma bífido sobre un disco estigmático rodeado de tres bracteolas y una bráctea. Estas últimas se encuentran fusionadas en la base formando el involucreo o ruezno. La inflorescencia femenina está compuesta por flores sésiles en número que oscila entre 3 y 10. El estigma es un carácter que sirve para identificar los cultivares debido a que presentan una forma y coloración características. Los amentos presentan una coloración verdosa amarillenta debido a la liberación de los granos de polen. En el estado de fin de liberación de polen, cuando las anteras comienzan a secarse, se pueden observar los amentos con una coloración parda oscura.

El fruto es una drupa seca de forma oblonga y elipsoidea teniendo de 3-5 cm de largo, constituida por un embrión (parte comestible), un endocarpio liso y delgado (cáscara de la nuez) y un epicarpio y mesocarpio carnosos los cuales se abren a la madurez formando cuatro valvas longitudinales (ruezno) tiene un espesor de entre 3 y 4 mm. En sus etapas tempranas de desarrollo el ruezno es de color verde y va volviéndose de color marrón a medida que llega a su etapa de madurez, momento en el que el ruezno se abre en cuatro secciones para liberar el fruto que lleva en su interior.

Composición fitoquímica

Los metabolitos encontrados han sido esteroides y tocoferoles y un alto contenido de compuestos fenólicos con posible actividad antioxidante, algunos de estos son los taninos, metabolitos secundarios en las plantas los cuales pueden ser encontrados en forma condensada o hidrolizada, estas moléculas son de gran importancia medicinal y nutricional, es importante mencionar que dependiendo de la parte de la planta que se analice se encontraran diferentes tipos de metabolitos, en las hojas se han reportado naftoquinonas (juglona, plumbagina, betahidroplumbajina), en el pericarpio ácidos orgánicos, taninos y naftoquinonas; en los cotiledones, ácidos grasos insaturados; en el tegumento polifenoles y taninos; en la nuez vitamina

A,B,C y E, sales minerales y yodo. (Raissouni, 2005) en el ruezno se reporta azaleatin (quercitina 5-metil éter y el flavonol caryatin (quercetina 3;5 dimetil éter) (Sasaky, 1964).

Propiedades antifúngicas

Investigaciones realizadas por Do Prado *et al.* (2014), utilizando extractos con elevado contenido de compuestos polifenólicos y taninos condensados y con significativa actividad antioxidante (DPPH⁻, ABTS⁻) obtenidos por infusión, infusión con secado por aspersión e hidro alcohólicos han demostrado actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahemolyticus* y *Bacillus cerus*. Los tres extractos evaluados en las pruebas de mínima concentración inhibitoria y mínima concentración bactericida demostraron acción antimicrobiana y bactericida contra estos microorganismos relacionados con enfermedades causadas por alimentos. Los resultados obtenidos por Osorio *et al.* (2010), con extractos polifenólicos de cáscara de nuez pecanera obtenidos vía etanólica contra hongos patógenos de plantas; *Pythium* sp., *Colletotrichum truncatun*, *C. coccodes*, *Alternaria alternata*, *F. verticillioides*, *F. solani*, *F. sambucinum* y *R. solani*. Mostraron un efecto fungistático contra *A. alternata*, *F. solani* y *F. verticilloides* y un efecto fungicida contra *Pythium* sp., *C. coccodes*, *C. truncatun*, *F. sambucinum* y *R. solani*, lo que demuestra que la cáscara de nuez representa un subproducto atractivo en la producción de extractos con un amplio espectro de actividad antibacteriana.

***Lippia graveolens* Kunth**

Clasificación taxonómica

L. graveolens pertenece a la familia Verbenaceae, es un arbusto pequeño que puede crecer hasta los 2 m. (BDMTM, 2009a).

Distribución geográfica

Originaria de América presente en climas cálido, semicálido, semiseco y templado desde el nivel del mar hasta los 2200 msnm. Cultivada en huertos familiares y asociada a bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio,

subperennifolio y perennifolio, matorral xerófilo, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña, bosques de encino y de pino. En México se distribuye en 24 entidades. En los estados donde existe mayor concentración de especie es en; Baja California Sur, Coahuila, Chihuahua, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Guanajuato, Jalisco, Guerrero, Hidalgo, Querétaro, Puebla, Morelos y Sonora. Es una planta característica del matorral xerófilo, crece y se desarrolla en temperaturas de 20 a 24 °C, no es exigente al agua ya que es suficiente una precipitación de 180 a 270 mm. Prospera sobre laderas y planicies en suelos con textura ligera. Se distribuye en un rango altitudinal de 0 hasta los 2,300 msnm. Esta especie se adapta a condiciones muy variadas de clima, preferentemente del tipo seco y semiseco. Prefiere suelos alcalinos, con pH de 7.3 a 8.5, en general pedregosos, de textura franco-arenosa. Las poblaciones de *Lippia graveolens* del sur y sureste de México, se establecen en el bosque tropical caducifolio, en matorrales de cactáceas columnares, bosques de encino-enebro y en selva mediana subcaducifolia. En las zonas tropicales más húmedas, se distribuye en la vegetación secundaria derivada del bosque tropical subperennifolio. En zonas más secas, es uno de los arbustos más comunes de la vegetación primaria (Huerta, 2005).

Descripción botánica

Arbusto delgado de hasta 2 m de altura, ramas con pubescencia cortopilosa, hojas en peciolo de 5-10 mm de largo, las láminas oblongas, elípticas a ovalado-oblongo, de 2-4 cm de largo, usualmente obtusas o redondeadas en el ápice, algunas veces agudas, redondeadas o subcorbadas en la base, opuestas, alternas y de forma ovalada, enteras, dentadas, aserradas de textura rugosa y con ligeras vellosidades; inflorescencias en forma de cabezuelas, solitarias o numerosas, constituidas por muchas flores de color blanco, pequeñas, sésiles, naciendo en las axilas de brácteas conspicuas, sobrepuestas, algunas veces forma una cruz o son seriadas; cáliz pequeño, membranoso, generalmente comprimido o campanulado; corola zigomorfa, tubo cilíndrico, recto o curvo; los frutos son pequeñas capsulas, secos, dentro de la cual se encuentran las semillas de color café (Villavicencio-Gutiérrez *et al.*, 2010)

Composición fitoquímica

Contiene un aceite esencial en el que se han identificado los monoterpenos borneol, canfeno, cineol, para-cimeno, mirceno, alfa y beta-pineno, terpinenol, alfa-terpineno, alfa-terpineol, alfa-tuyeno y timol, sesquiterpenos beta-cariofileno y humuleno y el componente fenílico eugenol. En las ramas y la raíz se han identificado los flavonoides naringenín y pinocembrín; y el compuesto heterocíclico de oxígeno, papachenole (Huerta, 2005).

Propiedades antifúngicas

Jasso de Rodríguez *et al.* (2011) mencionan que los extractos etanólicos y hexánicos de *L. graveolens* presentaron un efecto antifúngico sobre *Rhizopus stolonifer* inhibiendo el 100% del crecimiento. Peschiutta *et al.* (2016) observaron mayor inhibición de *Fusarium veticilloides* que con aceite esencial de hojas de *L. graveolens*. Finalmente Hernández *et al.* (2008) reportaron actividad antifúngica por parte de aceite esencial de *L. graveolens* sobre *F. sporotrichum*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes*, *F. moniliforme* y *Rhizoctonia solani*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Localización del Área de Estudio

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, en Saltillo, Coahuila, México.

Extractos Vegetales

Colecta de plantas

Las plantas de *Larrea tridentata*, *Lippia graveolens*, *Agave lechuguilla*, *Jatropha dioica* y *Carya illinoensis* fueron colectadas en el municipio General Cepeda, Coahuila, México; durante el mes de Enero de 2016, cerca de la carretera estatal 105 localizada en las coordenadas 25°21'40.55"N y 101°28'08.68" O a una altitud 1 507 msnm. Las plantas se colocaron en bolsas negras de plástico con una identificación, para su traslado al laboratorio de Fitopatología de la Universidad.

Procesamiento de las plantas

En el laboratorio las plantas se lavaron cuidadosamente con agua corriente para la eliminación de residuos contaminantes procurando no dañarlas y se dejaron secar sobre papel secante (Ruiz *et al.*, 2010). Posteriormente se realizó la separación de sus partes en hojas, tallos, raíces y ruzno en el caso del nogal y se cortaron en trozos pequeños reduciendo así su tamaño. El material vegetal se colocó en una estufa de sacado a 60°C hasta obtener un peso constante. Las partes de las plantas secas se trituraron en un molino manual para granos, Surtek, se molieron en una licuadora (Mabe) hasta obtener un polvo fino que se tamizó en una malla N°0.2 mm. El material tamizado fue almacenado y protegido de la luz en recipientes blancos a temperatura ambiente hasta su utilización (Tiwari *et al.*, 2011; Reyes *et al.*, 2015).

Preparación de extractos crudos

Los extractos se obtuvieron de acuerdo a la metodología de Shami *et al.* (2003) realizando algunas modificaciones. En un matraz Erlenmeyer de 1L, cubierto con papel de estraza y aluminio para evitar la oxidación de

metabolitos secundarios por efecto de la luz, se agregaron 42 g de polvo fino de muestra vegetal y 750 mL de solvente (agua o etanol 96 %), se colocaron por 72 h en agitación constante en una parrilla eléctrica (Thermo Scientific) a una temperatura de 50°C, posteriormente se filtró con ayuda de una bomba de vacío utilizando papel filtro Whatman número 1 colocado sobre el embudo Buhner, el filtrado se recolectó en un matraz Kitasato de 1 L obteniendo los extractos crudos, los cuales se conservaron en recipientes protegiéndolos de la luz.

Preparación de extractos resuspendidos

Los extractos etanólicos resuspendidos, se rotoevaporaron mediante un (rotavapor IKA – RV 10 digital) a 60°C y 200 rpm, para separar el solvente (750ml) de los 42g de muestra vegetal, posteriormente, el extracto se colocó en la estufa de secado (Avsa) a 50°C durante 15 días, y el remanente fue almacenado en tubos eppendorf. La metodología empleada para los extractos resuspendidos con el solvente agua fue la misma, solo que en el rotavapor se modificó la temperatura a 90°C. Este procedimiento se realizó con cada una de los extractos excepto con el de *Agave lechuguilla* ya que el contenido de saponinas es muy elevado en esta especie, por lo que se decidió colocar el filtrado en parrilla a 50°C hasta obtener el extracto cuidando que no llegara al punto de ebullición para no perder los componentes fitoquímicos.

Análisis de Compuestos Fitoquímicos de Extractos Acuosos y Etanólicos

Para la identificación de los fitoquímicos de los extractos acuosos y etanólicos se utilizaron los extractos en polvo a una concentración de 1000 ppm. Las determinaciones fueron cualitativas por colorimetría, se identificaron: alcaloides (Reacción de Dragendorf y Sonneschain), glicósidos cianogénicos (Reacción de Grignard), azúcares reductores (Reacción de Fehling y Benedict); saponinas (Prueba de espuma), esteroides y terpenos (Reacción de Libermann-Bouchard), taninos (Reacción de gelatina y FeCl₃), quinonas (Reacción de Hidróxido de amonio y Borntrager), cumarinas (Reacción de Erlich y de Hidróxido de amonio), purinas y carotenoides (H₂SO₄ y FeCl), carbohidratos (Prueba de Molisch) y flavonoides (Prueba

de Shinoda y de NaOH) mediante los métodos de Sahgalet *et al.* (2009) y Usman *et al.* (2009).

Aislamiento e Identificación de *F. oxysporum*

Los aislamientos de *Fusarium oxysporum* se realizaron de raíces de plántulas de *Picea* con síntomas de pudriciones radiculares, producidas en el invernadero de forestal de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Bajo condiciones de asepsia en una cámara de transferencia, se realizaron cortes finos a las raíces, se desinfectaron con una solución de cloro al 3 % durante 3 min, posteriormente se enjuagaron con agua destilada tres veces consecutivas, se colocaron en papel secante estéril, se transfirieron a cajas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar, y se incubaron por tres días a 28°C. Finalmente se realizó la purificación de *Fusarium oxysporum* mediante cultivos monosporicos y la identificación morfológica se realizó mediante la observación al microscopio de estructuras de acuerdo a las claves taxonómicas de Leslie and Summerell (2006).

Conservación de hongos

Las cepas obtenidas de *Fusarium oxysporum* se codificaron y se conservaron a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ en tubos ensayo para su uso posterior.

Actividad Antifúngica de los Extractos Vegetales

Prueba *in vitro* de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre *Fusarium osysporum*

La cuantificación de la actividad anti fúngica *in-vitro* de los extractos acuosos y etanólicos se evaluó mediante una adaptación de la técnica de microdilución en placa descrito por Eloff (1998) y modificada para hongos por Motsei *et al.* (2003); Masoko *et al.* (2005) y Gabrielson *et al.* (2002). En total se evaluaron 32 tratamientos, 8 tratamientos etanólicos crudos, 8 tratamientos etanólicos resuspendidos, 8 tratamientos acuosos resuspendidos y 8 tratamientos acuosos crudos, con tres repeticiones cada uno. Se realizó la microdilución en placas de 96 pozos (12mm x 8mm) en donde las tres primeras columnas se emplearon como controles y las nueve restantes para las diluciones de los extractos (concentraciones estudiadas).

En cada pozo de cada columna se colocaron 100 μ L de caldo de sabouraud, 40 μ L 2, 3,5 triphenyltetrazolium (TTC, tetrazolium, USA.) para determinar por turbidez o cambio de color el crecimiento o no del microorganismo (Masoko *et al.*, 2005). Se agregaron 100 μ L del solvente extractante en la tercera columna, y a partir de la cuarta columna se agregaron 100 μ L de los diferentes extractos, los cuales fueron preparados a una concentración de 2000 ppm se agitaron y mezclaron para diluir en serie al 50% de su concentración, finalmente se agregan 10 μ L de una suspensión de esporas del patógeno a una concentración de 1×10^8 , desde la columna dos hasta la columna 12, finalmente las placas se sellaron con cleen pack para evitar la evaporación del medio de cultivo y se incubaron por 48 h a 28°C. Las placas fueron leídas en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan Go) a una absorbancia de 590 nm. Mediante esta técnica se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración fungicida mínima de (CMF) de cada extracto vegetal. La concentración mínima inhibitoria (MIC) es definida como la concentración más baja de extracto que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubarse por 24 h. En la microplaca los valores de la MIC corresponden a los pozos que presenta coloración antes de la concentración necesaria para matar el inóculo inicial que no cambia de color, por lo tanto los pozos que no presentan coloración nos indica que el extracto inhibió el crecimiento del hongo y viceversa.

Porcentaje de Inhibición

De las lecturas obtenidas con el espectrofotómetro se determinó el porcentaje de inhibición, tomando el promedio de las tres repeticiones, considerando que la inhibición es el inverso del crecimiento, lo que fue calculado mediante las siguientes fórmulas (Moreno – Limón *et al.*, 2011):

$$\% \text{ de crecimiento} = (A-B/C) (100)$$

$$\% \text{ de Inhibición} = 100 - \% \text{ de crecimiento}$$

A=Absorbancia tratamiento

B=Absorbancia testigo negativo

C=Absorbancia testigo Positivo

Concentraciones Inhibitorias al 50% (CI₅₀)

La CI₅₀ de los diferentes extractos se determinó con los valores, de las concentraciones que inhibieron el 50 % del crecimiento del hongo, mediante un análisis Probit en el programa SAS versión 9.1. Posteriormente se realizó un análisis de varianza, y la prueba de comparación de medias de Tukey al 0.05 % de significancia.

Efecto de Diferentes Extractos Etanólicos como Tratamiento a la Semilla para el Control de *Fusarium osyспорum*

Se evaluaron siete tratamientos: *Larrea tridentata* hoja, *Lippia graveolens* tallo, *Agave lechuguilla* hoja, *Agave lechuguilla* raíz, mezcla de los cuatro extractos que presentaron la mayor ocho semillas de *Picea* en cada una, en un diseño de bloques completamente al azar. La concentración de los extractos fue considerando la CI₅₀ que se determinó en el ensayo *in-vitro*; para el benomilo se utilizó 1gr/L y para el control se utilizó agua destilada. Se sumergieron las ocho semillas por un minuto en cada uno de los diferentes tratamientos, posteriormente, se colocaron en papel secante estéril para retirar la humedad, y se transfirieron a cajas Petri con medio MS con nutrientes específicos para germinación de semilla y se incubaron por 15 días, para evaluar el porcentaje de incidencia del patógeno en la semilla y el porcentaje de germinación de cada tratamiento. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza y prueba de comparación de medias Tukey al 0.05 % de significancia utilizando el programa SAS versión 9.1.

Incidencia

Los datos de la incidencia de la enfermedad se tomaron cuando las semillas presentaron los síntomas de pudrición y crecimiento de micelio sobre estas. De este modo la incidencia se consideró como el porcentaje de semillas en pudrición.

Germinación

El porcentaje de germinación de las semillas se evaluó considerando el número de plantas emergidas a los 15 días después de haberlas colocado en la incubadora.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extractos Obtenidos

Se obtuvieron 32 extractos vegetales para determinar la actividad antifúngica contra *F. oxysporum*, estos fueron: 8 acuosos crudos, 8 acuosos resuspendidos, 8 etanólicos crudos y 8 acuosos resuspendidos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Extractos obtenidos y empleados para determinar su actividad antifúngica contra *F. oxysporum* mediante el método de microdilución en placa

Extractos			
Acuosos		Etanólicos	
Crudos	Resuspendidos	Crudos	Resuspendidos
1. <i>L. tridentata</i> hoja	1. <i>L. tridentata</i> hoja	1. <i>L. tridentata</i> hoja	1. <i>L. tridentata</i> hoja
2. <i>A. Lechuguilla</i> hoja	2. <i>A. Lechuguilla</i> hoja	2. <i>A. Lechuguilla</i> hoja	2. <i>A. Lechuguilla</i> hoja
3. <i>A. Lechuguilla</i> raíz	3. <i>A. Lechuguilla</i> raíz	3. <i>A. Lechuguilla</i> raíz	3. <i>A. Lechuguilla</i> raíz
4. <i>J. dioica</i> tallo	4. <i>J. dioica</i> tallo	4. <i>J. dioica</i> tallo	4. <i>J. dioica</i> tallo
5. <i>J. dioica</i> raíz	5. <i>J. dioica</i> raíz	5. <i>J. dioica</i> raíz	4. <i>J. dioica</i> raíz
6. <i>C. illinoensis</i> ruezno	6. <i>C. illinoensis</i> ruezno	6. <i>C. illinoensis</i> ruezno	6. <i>C. illinoensis</i> ruezno
7. <i>L. graveolens</i> tallo	7. <i>L. graveolens</i> tallo	7. <i>L. graveolens</i> tallo	7. <i>L. graveolens</i> tallo
8. <i>L. graveolens</i> hoja	8. <i>L. graveolens</i> Hoja	8. <i>L. graveolens</i> hoja	8. <i>L. graveolens</i> hoja

Fitoquímicos Presentes en los Extractos Acuoso y Etanólicos

El resultado de las pruebas colorimétricas de los extractos crudos y resuspendidos indica la presencia de los fitoquímicos que se muestran en el (Cuadro 2). En los extractos de *Lippia graveolens* hoja y tallo tanto acuoso como etanólico se identificaron la presencia de taninos, cumarinas y flavonoides dentro de los cuales destacan flavonones, flavonas y flavononas.

Los extractos de *Larrea tridentata* etanólicos y acuosos presentaron saponinas, flavonoides, glucósidos cianógenos. Para los extractos de *A. lechuguilla* tanto en el caso de las hojas como las raíces se identificaron saponinas triterpenoides, esteroidales y taninos. Para el caso en los extractos de *Carya illinoensis* ruezno se encontraron taninos, flavonoides y quinonas. Finalmente en los extractos *Jatropha dioica* tallo se identificaron azúcares reductores, saponinas, flavonoides, quinonas, taninos, cumarinas y carbohidratos. Los fitoquímicos identificado en este trabajo para *Lippia graveolens* hoja y tallo son similares con los reportados por Güereca *et al.* (2007) y Hernández-Castillo *et al.* (2010), ya que demuestran la presencia de taninos y flavonoides. En los extractos de *Agave*, Sidana *et al.* (2016) reportaron más de 141 saponinas estereoidales, estas de interés farmacológico, coincidiendo con algunas de las obtenidas en las extracciones de *A. lechuguilla* de esta investigación. En los extractos *Jatropha dioica* tallo se encontraron fitoquímicos similares a los reportados por Martínez *et al.* (2014), donde señalan la presencia de azúcares reductores, saponinas, flavonoides, quinonas, taninos, cumarinas y carbohidratos. Así mismo, Xiang-Ming (2009) menciona la presencia de quinonas en ruezno de *Carya illinoensis*, siendo similar a los fitoquímicos identificados en los extractos que se obtuvieron en nuestros ensayos.

Cuadro 2. Componentes fitoquímicos encontrados en los extractos vegetales acuosos y etanólicos

Extractos	Compuestos fitoquímicas									
	Carbohidratos	Flavonoides	Glicósidos cianogénicos	Azucares reductores	Saponinas	Taninos	Quinonas	Cumarinas	Purinas	Carotenoides
Etanólicos										
<i>Larrea tridentata</i> hoja	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>Agave lechuguilla</i> hoja	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Agave lechuguilla</i> raíz	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Jatropha dioica</i> raíz	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
<i>Jatropha dioica</i> tallo	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Carya illinoensis</i> ruezno	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lippia graveolens</i> hoja	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>Lippia graveolens</i> tallo	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Acuosos										
<i>Larrea tridentata</i> hoja	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Agave lechuguilla</i> hoja	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
<i>Agave lechuguilla</i> raíz	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>Jatropha dioica</i> raíz	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>Jatropha dioica</i> tallo	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>Carya illinoensis</i> ruezno	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lippia graveolens</i> hoja	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>Lippia graveolens</i> tallo	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-

(+) Positivo o presencia,

(-) Ausencia o negativo

Agente Causal de la Pudrición Radical de *Picea*

Los síntomas observados en las plántulas de *Picea mexicana* de las cuales se aisló el hongo, presentaban marchitez, acículas cloróticas retorcidas, o de color café-rojizo, seguidas de muerte descendente de las puntas, se caracterizan por la ausencia de raíces secundarias y pudrición café cortical de la raíz. Para el caso del hongo, las características morfológicas macroscópicas encontradas en la cepa aislada fueron; micelio abundante, en un principio de color blanco y al finalizar toma la coloración morada. Las características microscópicas observadas son macroconidias delgadas, ligeramente curvadas con medidas de $33.46\ \mu\text{m}$ ($26.4\ \mu\text{m}$) x $4.8\ \mu\text{m}$ ($3.61\ \mu\text{m}$), la parte apical es cónica y en forma de gancho, con tres septos, las microconidias son abundantes, sin septos, ovales y se producen en falsas cabezas, las clamidosporas están presentes y se producen solas o en pares (Figura 1). Estas características corresponden a las descritas por Leslie y Summerell, (2006) para *Fusarium oxysporum* y coinciden con las señaladas por Roldan (2008) y Don Juan (2006) para aislamientos realizados de raíces de *Pinus michoacana* y *P. pseudostrobus*, e identificadas como *Fusarium oxysporum* y reportada como el principal agente causal de la pudrición de raíz en estas pináceas.

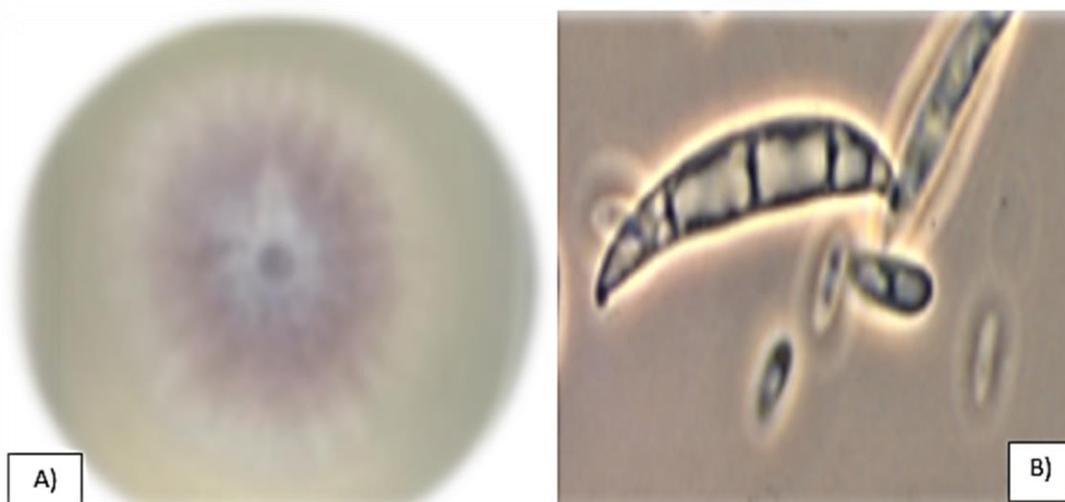


Figura 1. Características morfológicas del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* A) Crecimiento de micelio en PDA. B) microconidia y macroconidia

Actividad Antifúngica de los Extractos de Plantas Sobre el Crecimiento de *F. oxysporum*

Efecto de diferentes concentraciones de extractos acuosos sobre *F. oxysporum*

No se observó que los extractos acuosos, crudos y resuspendidos presentaran inhibición contra *F. oxysporum* a las concentraciones estudiadas. La concentración mínima inhibitoria (MIC) es definida como la concentración más baja de extracto que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubarse por 24 h. En la microplaca (Figura 2) los valores de la MIC corresponden a los pozos que presenta coloración antes de la concentración necesaria para matar el inóculo inicial que no cambia de color, por lo tanto los pozos que no presentan coloración nos indica que el extracto inhibió el crecimiento del hongo y los pozos que presentan coloración nos indican crecimiento de *F. oxysporum* y por lo tanto sin efecto de los extractos sobre el patógeno. Diversos autores también señalan el nulo o bajo efecto de extractos acuosos sobre *F. oxysporum* y otros hongos, o bien indican que se requieren aplicar concentraciones más altas como 8000 ppm para obtener un 73% de inhibición de *F. oxysporum* con extractos acuosos de *L. tridentata* (Castillo *et al.*, 2010)

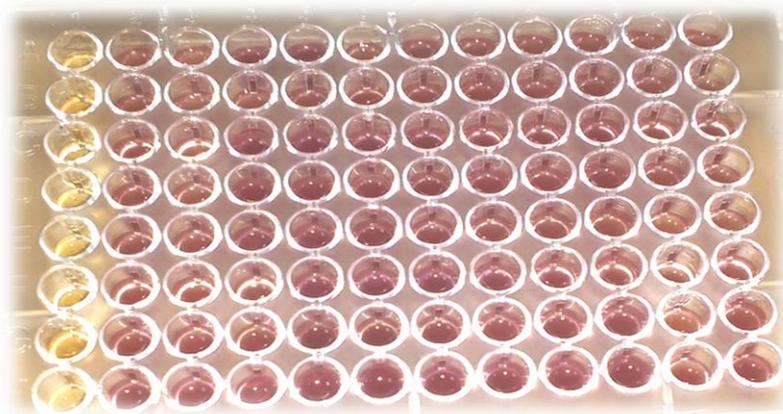


Figura. 2 Microplaca de extractos acuosos con crecimiento de *Fusarium oxysporum*.

Efecto de Diferentes Extractos Etanólicos sobre el Crecimiento de *Fusarium oxysporum*

En los extractos etanólicos resuspendidos, el mayor efecto inhibitorio sobre *F. oxysporum* se observó en *Larrea tridentata* y *Lippia graveolens* tallo con 97 % de inhibición del crecimiento a 1000 ppm seguido de *Agave lechuguilla* raíz y *Agave lechuguilla* hoja con 96 y 95 % respectivamente. Los extractos de *Jatropha dioica* inhibieron el 94 % de este hongo a 1000 ppm (Figura 3). El extracto que obtuvo el menor porcentaje de inhibición a 1000 ppm fue el de *Lippia graveolens* hoja con un 79 %.

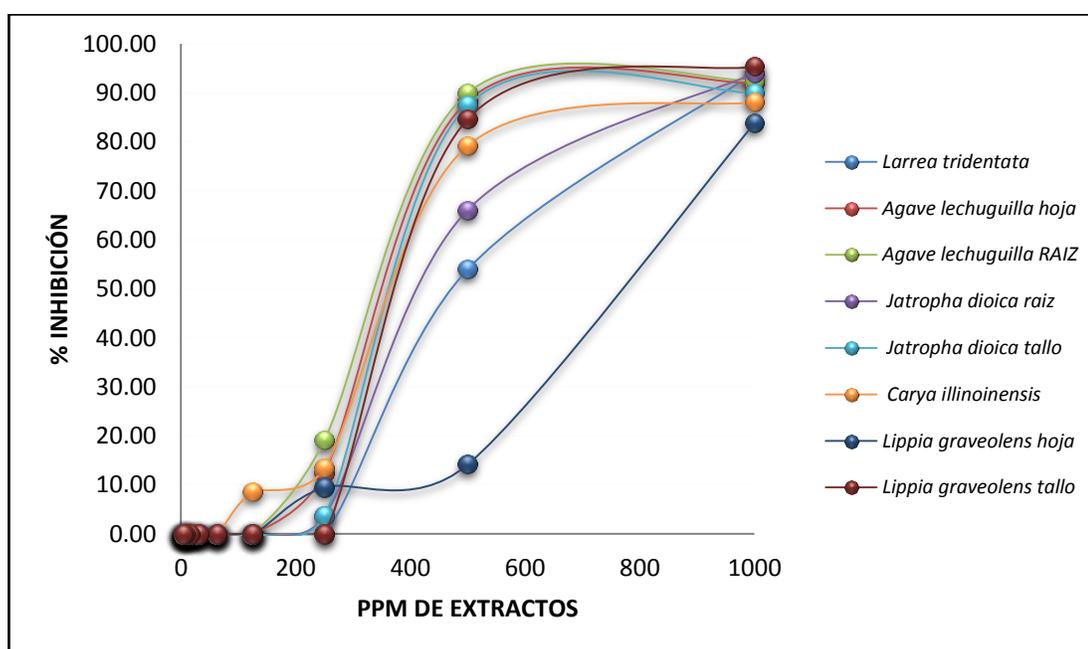


Figura 3. Porcentaje de inhibición de extractos resuspendidos etanólicos de plantas sobre *F. oxysporum*.

En los extractos etanólicos crudos el mayor efecto inhibitorio de *F. oxysporum* se presentó con *Lippia graveolens* tallo con 97 % a 1000 ppm seguido de *Agave lechuguilla* raíz y hoja con un 96 y 95% respectivamente. En los extractos de *Larrea tridentata* también se observa un buen efecto sobre el hongo al inhibir el 90% de su crecimiento. El efecto del resto de los extractos sobre el hongo también es adecuado ya que a 1000 ppm alcanza un 90% de inhibición del desarrollo de este patógeno (Figura 4).

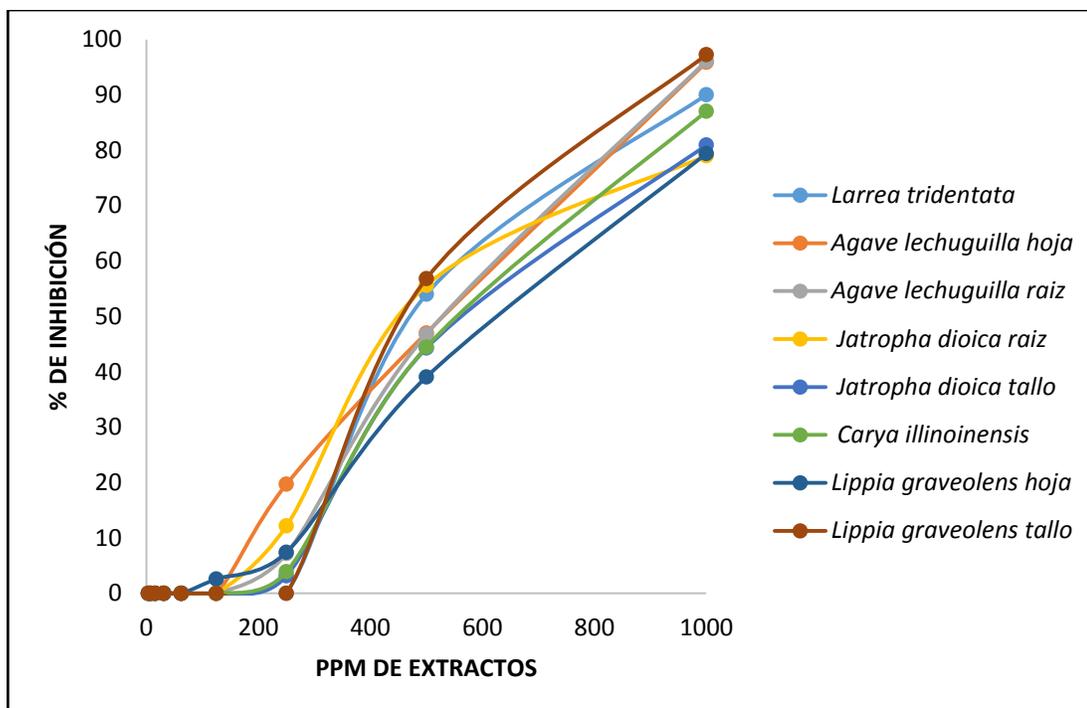


Figura 4. Porcentaje de inhibición de extractos crudos etanólicos de plantas sobre *F. oxysporum*

De Rodríguez *et al.* (2011), mencionan que en general, los extractos etanólicos presentan un alto porcentaje de inhibición sobre el crecimiento de hongos patógenos de plantas, debido a que los activos que son arrastrados con este solvente poseen alta actividad biológica; los polifenoles en el caso de *L. graveolens* y las saponinas esteroidales en el caso de *A. lechuguilla*. De Rodríguez *et al.* (2011), mencionan que los extractos etanólicos de *A. lechuguilla* son capaces de inhibir hasta el 100% del crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* lo cual es muy similar al porcentaje de inhibición que se logró en esta investigación con *F. oxysporum*. Hernández *et al.* (2010) reportaron 100% de inhibición en *R. solani* con extractos etanólicos de *C. illinoensis*. Gamboa-Alvarado *et al.* (2003), mencionan que los extractos metanólicos hidrosolubles de gobernadora obtenida de los desiertos Sonorense (DS) y Chihuahuense (DCh); a 500 ppm el extracto obtenido de DS inhibió a *R. solani* por 53.86%, mientras que el extracto obtenido de DCh redujo el crecimiento del mismo hongo por 35.52 %; y a 1000 ppm, el extracto obtenido

de DS inhibió a *R. solani* por 75.73 %, el extracto obtenido de DCh lo afectó 51.81%. El extracto etanólico de *Larrea tridentata* colectada en saltillo, Coahuila, con el que se evaluó para este estudio alcanzo una inhibición de 94 % a 1000 ppm en extractos resuspendidos y 90 % en extractos crudos lo que nos indica que trae aun mayor actividad que la del extracto obtenido del DCh y DS; se concuerda con Cruz, (1993), quien menciona que las plantas pueden tener diferentes concentraciones de componentes químicos en sus diferentes partes; raíz, hojas, flores y frutos e inclusive puede estar ausente en una o en varias partes, así como también depende de los factores ambientales de cada región por lo que al coleccionar es conveniente tomar muestras integrales (Romero, 1993); así también, considerar la ubicación y factores climáticos de lugar donde se coleccionan las plantas.

Concentración Inhibitoria al 50% (CI₅₀) de los Extractos Etanólicos

La CI₅₀ de los diferentes extractos etanólicos varía desde 464 ppm en *Agave lechuguilla* hoja a 780 ppm *Lippia graveolens* hoja. La CI₅₀ observada con el extracto de *Agave lechuguilla* es estadísticamente el más bajo de todos los extractos estudiados. (Cuadro 3 y 4). Estos resultados difieren a los reportados por Hernández *et al.* (2010), quienes determinaron CI₅₀ de 1930 ppm y 4340 ppm con extractos etanólicos de *L. graveolens* y *C. illinoensis* respectivamente sobre *R. solani*.

Cuadro.3 Concentración CI_{50} de extractos etanólicos resuspendidos para inhibición de *F. oxysporum*

Extractos etanólicos resuspendidos	CI_{50}
<i>Larrea tridentata</i>	578 b
<i>Agave lechuguilla</i> hoja	464 h
<i>Agave lechuguilla</i> raíz	470 g
<i>Jatropha dioica</i> raíz	507 c
<i>Jatropha dioica</i> tallo	472 f
<i>Carya illinoensis</i>	503 d
<i>Lippia graveolens</i> hoja	780 a
<i>Lippia graveolens</i> tallo	487 e

Cuadro.4 Concentración CI_{50} de extractos etanólicos para inhibición de *F. oxysporum*

Extractos etanólicos crudos	CI_{50}
<i>Larrea tridentata</i>	578 b
<i>Agave lechuguilla</i> hoja	545 c
<i>Agave lechuguilla</i> raíz	467 g
<i>Jatropha dioica</i> raíz	495 d
<i>Jatropha dioica</i> tallo	471 e
<i>Carya illinoensis</i>	494 d
<i>Lippia graveolens</i> hoja	660 a
<i>Lippia graveolens</i> tallo	469 f

Los resultados obtenidos difieren a los reportados por Hernández *et al.* (2010), quienes determinaron CI_{50} de 1930 $\mu\text{g/L}$ y 4340 $\mu\text{g/L}$ con extractos etanólicos de *L. graveolens* y *C. illinoensis* respectivamente sobre *R. solani*. En otro estudio de extractos etanólicos contra *Artemia salina* se obtuvieron valores de CI_{50} menor a 1000 ppm. El extracto de *J. dioica* mostro toxicidad en *A. salina* a ppm *P. pulchella* obtuvo una CI_{50} de 14.96, el extracto de *M. vulgare* mostro una CI_{50} de 38, *P. roseus* con CI_{50} de 158 y *D. bicolor* presentaron CI_{50} de 516. Cortés (2005). Como se puede apreciar en el estudio realizado y en los descritos anteriormente la CI_{50} son diferentes para cada extracto, existen varios factores que pueden influir tales como son: la composición y el método de obtención de cada extracto, ya que cada uno presenta diferentes componentes activos, esto también depende de la parte de la planta utilizada, así como la volatilidad, solubilidad y complejidad de los solventes utilizados. Dunford y Vázquez, (2005) mencionan que resultados pueden variar debido a las condiciones del proceso de extracción empleadas para la obtención de los productos vegetales (extractos, aceites y oleorresinas), ya que dependiendo de la polaridad de los solventes se extraen compuestos diferentes y aunado a esto se pueden obtener distintos rendimientos, concentraciones y distintos componentes activos.

Efecto de diferentes extractos etanólicos como tratamiento a la semilla para el control de *Fusarium oxysporum* en *Picea mexicana*

Incidencia

La incidencia observada con los diferentes tratamientos (Figura 5), es significativa con respecto al testigo. La menor incidencia de la pudrición de la semilla en *Picea* se obtuvo con el extracto etanólico de *Agave lechuguilla* hoja con un 35 %; la incidencia obtenida con *Agave lechuguilla* raíz y el tratamiento a base de la mezcla de extractos es estadísticamente similar estos alcanzan 45 % de semillas con *F. oxysporum*. Los extractos que permitieron mayor incidencia del patógeno fueron los derivados de *Larrea tridentata* y *Lippia graveolens* tallo con 62 y 75 %, sin embargo, todos los tratamientos a base de

extractos tienen una incidencia menor que la obtenida con el fungicida benomilo que alcanza el 85 % de semillas afectadas, y el testigo absoluto el 100 por ciento. El extracto de *Agave lechuguilla* contiene fitoquímicos como las saponinas estereoidales que forman complejos con esteroides, proteínas y fosfolípidos de las membranas citoplasmicas, afectando la actividad del hongo y disminuyendo el desarrollo de la enfermedad (De Rodríguez *et al.*, 2011), Montejo *et al.*(2009) y Hernández *et al.*(2011) mencionan la presencia de algunos metabolitos secundarios como; alcaloides, taninos, flavonoides, quinonas y lactonas, en los extractos vegetales los cuales son un grupo de compuestos con actividad antifúngica. Los flavonoides por la presencia en su estructura de hidroxilos fenólicos que penetran la membrana celular, se combinan y precipitan las proteínas protoplasmáticas desnaturalizándolas y actúan como venenos protoplasmáticos (Ruiton, 1998). Los taninos forman complejos con enzimas y otras proteínas provocando la inhibición de sus funciones, por lo que pueden inhibir el transporte de electrones a través de las membranas, y alterar iones como el hierro y el cobre inhibiendo la actividad de algunas enzimas que son esenciales para la vida de los microorganismos (Scalbert and Williamson, 2000).

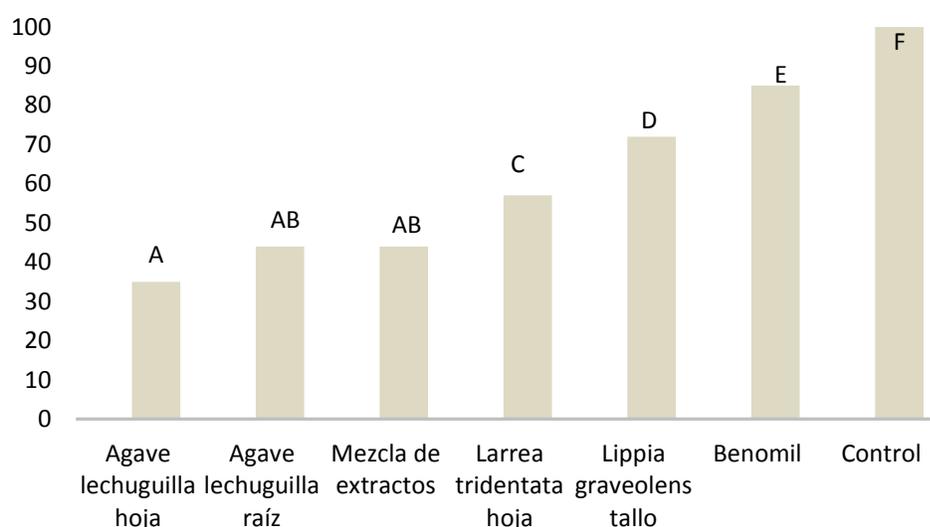


Figura 5. Incidencia de *Fusarium oxysporum* en semillas de *Picea mexicana* tratados con diferentes extractos vegetales.

Germinación

El porcentaje de germinación de las semillas de *Picea* es estadísticamente diferente en los tratamientos de extractos vegetales con respecto al testigo. El mejor efecto se observa en el extracto de *Agave lechuguilla* hoja con un 67% en germinación de las semillas, la germinación obtenida con *Agave lechuguilla* raíz y el tratamiento a base de la mezcla de extractos es estadísticamente similar con un 56 % de semillas germinadas en ambos tratamientos. Los extractos donde se obtuvo menor porcentaje de germinación fue con los de *Larrea tridentata* y *Lippia graveolens* tallo con 43y 28 % respectivamente. Todos los tratamientos con extractos tienen mayor porcentaje de germinación que la obtenida con el fungicida benomilo con 15% y el testigo con 0 %. Una de las causas de la falta de germinación y pudrición en semilla es el daño ocasionado por *Fusarium oxysporum* Roldan (2008), señala que cuanto mayor es la infección de las semillas por hongos, menor es el porcentaje de semillas germinadas en *Pinus sylvestris*, *Larix sibirica*, *Picea abies* y *Abies sibirica*. En otro estudio se menciona que en las pruebas de germinación realizadas, para evaluar la viabilidad de las semillas en pinos el 90 % de ellas son viables, aunque solo germinan el 31 % y al realizar las pruebas de patogenicidad en las semillas no germinadas indican la presencia de *Fusarium solani* Martínez, (2000). En esta investigación se observó que los extractos vegetales disminuyen la incidencia del patógeno e incrementan la germinación de la semilla, ya que menor incidencia, la semilla tiene mayor posibilidad de germinar. El bajo porcentaje de germinación de semilla de *Picea* con el químico benomilo, pudiera deberse a un bajo control de la enfermedad o que este tenga un efecto fitotóxico sobre la semilla como ya se ha documentado que algunas semillas de pináceas presentan daños con tratamientos químicos y responde con un bajo porcentaje en la germinación de semillas y mala calidad de plántulas. Kozlowski (1986), reporta que el Captán a concentraciones de hasta 2500 ppm no afecta la germinación de semillas de *Pinus resinosa*; sin embargo, a concentraciones de 500 ppm o mayores se observan daños a las raíces, tallos y cotiledones dentro de 13 días. De igual forma Hüberli, *et al.* (2002) hicieron observaciones

muy similares, a las observadas con el fungicida aplicado a las semillas en esta investigación.

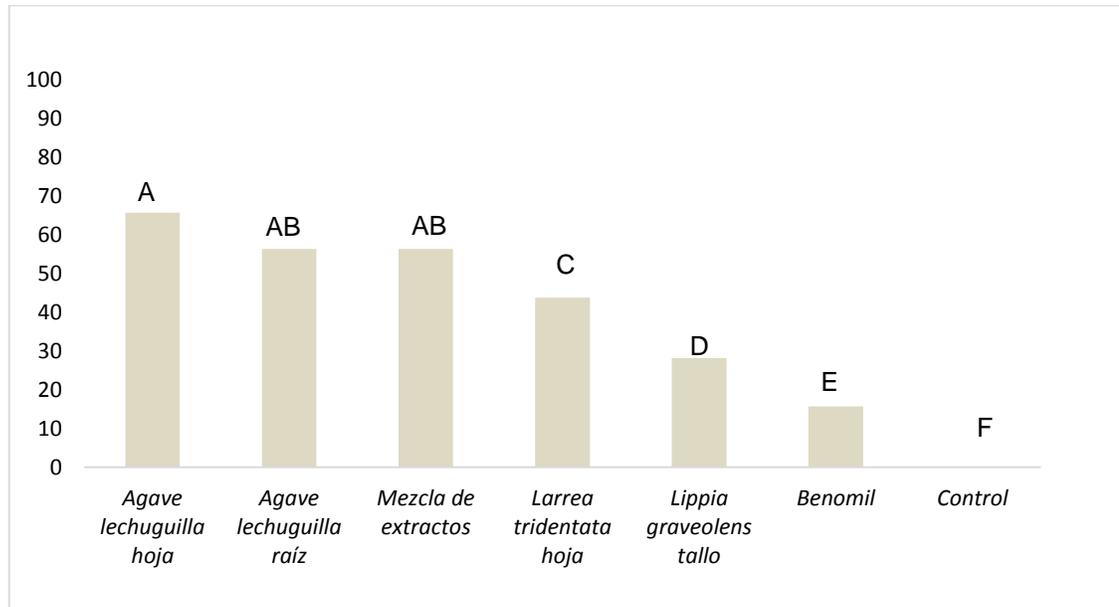


Figura 6. Porcentaje de germinación de semillas de *Picea mexicana* con influencia de los extractos vegetales

CONCLUSIONES

Ningún extracto vegetal acuoso presenta actividad antifúngica sobre *Fusarium oxysporum*

Todos los extractos vegetales etanólicos crudos y resuspendidos tienen potencial para inhibir el crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum*

Los extractos vegetales de *Agave lechuguilla* hoja y raíz disminuyen la incidencia del patógeno en la semilla de *Picea mexicana* y favorecen la germinación ya que a menor incidencia mayor número de semillas germinadas.

El método de microdilución en placa permite medir la actividad antifúngica de varios tratamientos y concentraciones, con menor tiempo y menor cantidad de recursos.

REFERENCIAS

- Abdul M.M, koshy y Muniandy. 2013. Synergy of antimicrobial and antioxidant activities from crude extracts and peptides of selected plant mixture. *Complementary y alternative medicina*
- Castillo-Reyes, F., Hernández-Castillo, F. D., Gallegos-Morales, G., Flores-Olivas, A., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2015). Efectividad in vitro de Bacillus y polifenoles de plantas nativas de México sobre Rhizoctonia-Solani. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(3), 549-562.
- Cibrián T. D. 2001. Manual para la identificación de plagas y enfermedades forestales en el estado de Jalisco. fiprodefo. Publicación especial 140 p.
- Clemente, J.A., (2010). Actividad antifungica in vitro de extractos vegetales del Semidesierto de Coahuila obtenidos en solventes Año 2, No. 9 Julio-Agosto 2014 orgánicos contra *Phytophthora cinnamomi* Rands. Tesis de nivel Licenciatura. División de Agronomía, Departamento Parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, Mexico. p. 62.
- Conner D.E., Beuchat L.R. (2006). "Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts". *J Food Sci.* 49 (2); 2006, pp. 429-424.
- Dunford N.T., Silva-Vazquez R. (2005). "Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacrol concentrations in Mexican oregano grown under controlled conditions". *J Appl Hort.* 7 (1); 2005, pp. 20–22.
- Jasso de Rodríguez, D. J., García, R. R., Castillo, F. H., González, C. A., Galindo, A. S., Quintanilla, J. V., abd Zuccolotto, L. M. 2011. *In vitro* antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 960-966.
- De Rodríguez, D. J., Trejo-González, F. A., Rodríguez-García, R., Díaz-Jimenez, M. L. V., Sáenz-Galindo, A., Hernández-Castillo, F. D., & Pena-Ramos, F. M. (2015). Antifungal activity in vitro of *Rhus muelleri* against

- Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Industrial Crops and Products*, 75, 150-158.
- Don Juan M.B. 2006. Efectividad de *Trichoderma* spp. Contra hongos causantes de Damping-off en viveros forestales. Tesis de Maestro en Ciencias, en Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales. Chapingo, México.67.p.
- Eloff, J. N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta medica*, 64(08), 711-713
- FAOSTAT. Food and agriculture organization of the united nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. consultado 16/005/17
- Flores L., C., J. López-Upton y J.J. Vargas-Hernández (2005). Indicadores reproductivos en poblaciones naturales de *Picea mexicana* Martínez. *Agrociencia*. 39 (1): 117-126 pp.
- Flores L.C. (2004). Indicadores reproductivos en tres poblaciones de *Picea mexicana* Martínez de México. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México. 49 p.
- Gamboa, A. R. 1997. Evaluación de extractos vegetales sobre la pudrición de la raíz y corona (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) y los efectos fisiológicos en tomate (*Lycopersicon esculentum*). Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México. 93 p
- García D. S. E.(2007) Damping-off y Pudrición de raíz por *Fusarium*/Damping-off and root rot by *Fusarium*. *Fusarium oxysporum* Schltdl. (Moniliales, Moniliaceae) 502-505 p.
- García-Camarillo, E. A., Quezada-Viay, Y., Moreno-Lara, J., Sánchez-Hernández, G., Moreno-Martínez, E. y Pérez-Reyes, M. C. J. (2006) "Actividad Antifúngica de Aceites Esenciales de Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y Orégano (*Origanum vulgare* L.) y su Efecto sobre la Producción de Aflatoxinas en Nuez Pecanera [*Carya illinoensis* (F.A.

- Wangenh) K. Koch". *Revista Mexicana de Fitopatología*. 24 (1); January-June 2006, pp. 8-12,
- Gabrielson, J., Hart, M., Jarelöv, A., Kühn, I., McKenzie, D., and Möllby, R., 2002. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *Journal of Microbiological Methods*, 50(1), 63-73
- Güereca, M. C. G., Hernández, M. S., Kite, G., and Vázquez, M. M., 2007. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(1), 43-49.
- Hüberli, D., Tommerup, I. C., Colquhoun, I. J. and Hardy†, G. E. ST J., 2002. Evaluation of resistance to *Phytophthora cinnamomi* in seed-grown trees and clonal lines of *Eucalyptus marginata* inoculated in lateral branches and roots. *Plant pathology* (2002) 51, 435 – 442 pp.
- Hernández, L.A., Bautista,B.S., y Velázquez,D.M.G. (2007). Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas [versión electrónica].*Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(02): 119-123.
- Hernández-Castillo, F.D., Castillo-Reyes, F., Gallegos-Morales, G., Rodríguez-Herrera, R., and Aguilar-González, C. N. 2010. *Lippia graveolens* and *Carya illinoensis* organic extracts and there *in vitro* effect against *Rhizoctonia solani* Kuhn. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 5(3), 380-384.
- Hernández-Castillo, F.D., Castillo-Reyes, F., Gallegos-Morales, G., Rodríguez - Herrera, R. and Aguilar, C. 2011. Plant Extracts from Mexican Native Species: An Alternative for Control of Plant Pathogens. In: R. Nokkoul, ed., *RESEARCH IN ORGANIC FARMING*, 1st ed. Croacia: Raumjit Nokkoul, pp.139-156.

- Leslie, J. F., Zeller, K. A., and Summerell, B. A. 2001. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59(3), 107-117.
- Ledig, F. Thomas, Hodgskiss, Paul D., Jacob-Cervantes, Virginia (2002). Genetic diversity, mating system, and conservation of a s Mexican subalpine relict, *Picea mexicana* Martínez. *Conservation Genetics* 3:113-122 pp.
- Luis V. C., Peters J., González Rodríguez A. M., Jiménez M. S. & Morales D. (2004). Testing nursery plant quality of Canary Island Pine seedlings grown under different cultivation methods. *Phyton*, 44(2): 231-244 pp.
- Martínez, M. (1961). Una nueva especie de *Picea* en México. *Anales del Instituto de Biología*. 32: 137-142 p.
- Martínez, M. (1963). Las pináceas mexicanas. 3ª Ed. Instituto de Biología. UNAM. México, D. F. 401 p.
- Martínez, N., Vázquez-Alvarado, P., Figueroa, A., Zúñiga, C., Almaguer, G., y Hernández-Ceruelos, A., 2014. Análisis fitoquímico de *Jatropha dioica* y determinación de su efecto antioxidante y quimio protector sobre el potencial genotóxico deciclofosfamida, daunorrubicina y metil metanosulfonato evaluado mediante el ensayo cometa TT - Phytochemical analysis of Jatr. *Bol. Latinoam. Caribe Plantas Med. Aromát*, 13(5), 437–457
- Martínez, R. A. 2000. *Fusarium oxysporum* Schl. Como agente causal del estrangulamiento de tallo de *Pseudotsuga macrolepis* Flous y *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* Shaw. en plantas de vivero. Tesis de Licenciatura. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. México. 89 p.
- Masoko, P., Picard, J., & Eloff, J. N. (2005). Antifungal activities of six south African *Terminalia* species (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 99(2), 301-308.

- Motsei, M. L., Lindsey, K. L., Van Staden, J., & Jäger, A. K. (2003). Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. *Journal of ethnopharmacology*, 86(2), 235-241.
- Moreno-Limón, S., González-Solís, L. N., Salcedo-Martínez, S. M., Cárdenas-Ávila, M. L., & Perales-Ramírez, A. (2011). Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica*, (32), 193-205.
- Pereira, G.; Herrera, J.; Machuca, A. & Sánchez, M. (2007). Efecto del pH sobre el crecimiento en *Pinus radiata*. *Bosque*. 28(3):215-219 pp.
- Pérez, M.E., (2010). Actividad antifúngica in vitro de extractos de plantas del sureste de Coahuila en diferentes solventes contra *Rhizoctonia solani* Kuhn. Tesis de nivel Licenciatura. División de Agronomía, Departamento Parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. p. 74.
- Ramírez, A., Stella, L., & Marín Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal.
- Rzedowski, J. 1983. Vegetación de México. Limusa. México. 432 p
- Reyes, S. R., Casanova, E. V., Gaona, M. C., & Saldarriaga, C. E. (2015). Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morinda citrifolia* L. "noni" y cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales. *UCV-SCIENTIA*, 2(2), 11-22.
- Rivera-Castañeda G., Martínez-Tellez M.A., Rivero-Espejel I. (2005). "Antifungal lignans from the creosote Bush (*Larrea tridentata*)". *Ind Crop Prod*. 22: pp.101-107.
- Roldan C. Ma. A. 2008. Control biológico de *Fusarium oxysporum* en dos especies de pino. Tesis de Maestro en Ciencias, en Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales. Chapingo, México. 115

- Rodríguez-Gonzales, C. A. 2013. Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en tomate (*solanum lycopersicum*) variedad Santa Clara, aislados de residuos lignocelulósicos de higerilla (*Ricinus communis*) Universidad Católica de Manizales. Tesis de Licenciatura. 61pp.
- Ruitón, C. M. F., Alcarraz, M. R., y Vidalón, M. T. 1998. Flavonoides y alcaloides de *Lupinus ballianus* CC Smith con actividad antibacteriana y antifúngica. Ciencia e Investigación, 1(2), 71-80.
- Shami, A.M.M., Philip, K. and Muniady, S. 2013. Synergy of antibacterial and antioxidant activities from crude extracts and peptides of selected plant mixture. BMC Complementary & Alternative medicine 13, 360.
- SEMARNAT. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. http://www.Profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT_2010.pdf
- Scalbert, A., Williamson, G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. J. Nutr. 130, 2073–2085.
- Sahgal, G., Ramanathan, S., Sasidharan, S., Mordi, M.N., Ismail, S. and Mansor, S.M. 2009. Phytochemical and antimicrobial activity of *Swietenia mahagoni* crude methanolic seed extract. Tropical Biomedicine 26(3), 274-279.
- Sidana, J., Singh, B., & Sharma, O. P., 2016. Saponins of Agave: Chemistry and bioactivity. Phytochemistry
- Tequida-Meneses, M., Cortez-Rocha, M., Rosas-Burgos, E. C., López-Sandoval, S., & Corrales-Maldonado, C. (2002). Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium*

- expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Revista iberoamericana de micología*, 19, 84-88.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction: a review. *Internationale pharmaceutica sciencia*, 1(1), 98-106.
- Trejo-Márquez, M. A., Vargas-Martínez, M. G., Sánchez-Soto, A., Vargas, A. A. L., Pascual-Bustamante, S., López, G. G., & González, A. G. V. (2015). Extracción de compuestos bioactivos de plantas del desierto mexicano para su aplicación en envases activos PARA ZARZAMORA. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16(1), 101-107.
- Usman, H., Abdulrahman, F.I. and Usman, A. 2009. Qualitative phytochemical screening and in vitro antimicrobial effects of methanol stem bark extract of *Ficusthonningii* (Moraceae). *Afr. J. Trad. 6(3)*, 289-295.
- Villacencio-Gutierrez, E. E., Cano-Pineda, A. y Garcia-Cuevas, X. 2010. Metodología para determinar las existencias de orégano (*Lippia graveolens* H.B.K.) en rodales naturales de Parras de la Fuente, Coahuila [Folleto]. Saltillo, México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
- Xiang-ming, C. H. E. N., 2010. Study on Extraction and Separation Conditions of Quinone from *Carya cathayensis* Peel [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 5, 137