

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCION DE POSTGRADO



ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE *Juglans* spp. Y *Carya* sp.
CONTRA HONGOS FITOPATÓGENOS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*
L.) *in vitro* Y EN INVERNADERO.

Tesis

Que presenta NUBIA ARELI GAYTÁN SÁNCHEZ
Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

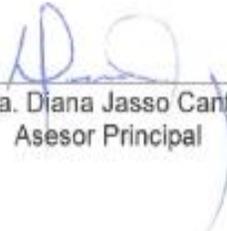
Saltillo, Coahuila

Diciembre 2017

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE *Juglans* spp. Y *Carya* sp.
CONTRA HONGOS FITOPATÓGENOS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*
L.) *in vitro* Y EN INVERNADERO.

Tesis

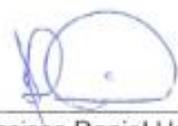
Elaborada por NUBIA ARELI GAYTÁN SÁNCHEZ como requisito parcial para
obtener el grado de Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola con la
supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



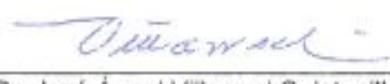
Dra. Diana Jasso Cantú
Asesor Principal



Dr. Raúl Rodríguez García
Asesor



Dr. Francisco Daniel Hernández
Castillo
Asesor



Dr. José Ángel Villarreal Quintanilla
Asesor



Dra. María de Lourdes Virginia Díaz
Jiménez
Asesor



Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal

Subdirectora de Postgrado

UAAAN

Saltillo, Coahuila

Diciembre 2017

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a mi padre Dios todopoderoso quien me dio la oportunidad y las fuerzas para terminar este trabajo.

Quisiera también expresar mi gratitud hacia las personas que me ayudaron de una manera u otra a cumplir una meta más en mi vida.

En especial a mis asesores, grandes investigadores: **Dra. Diana Jasso Cantú**, **Dr. Raúl Rodríguez García**; por todo su apoyo y paciencia, y sobre todo creer en mi. Gracias por inspirar a seguir adelante por el camino de la investigación. **Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo**; por transmitir sus conocimientos y el fascinante mundo de los hongos, es un gran profesor. **Dr. José Ángel Villarreal Quintanilla** y **Dra. María de Lourdes Virginia Díaz Jiménez**; muchas gracias por la aportación de sus conocimientos, facilitación de instalaciones y colecta de material vegetal. Agradezco también al **M.C. Fidel Peña Ramos** por su ayuda en el análisis e interpretación de datos y por todos los consejos.

A la **Dra. Aidé Sáenz Galindo** y la **Dra. Susana González Morales**, les agradezco el apoyo brindado para la realización de pruebas claves de esta investigación, su amabilidad y confianza incondicional. Al **Dr. Antonio Juárez Maldonado**, por el apoyo en el manejo del cultivo y disponibilidad para la evaluación final del cultivo.

Y con mucho cariño y admiración a la **Dra. Desiré Dávila Medina**, gracias por tu ayuda y consejos, pero sobre todo tu amistad.

Agradezco al equipo de trabajo del Laboratorio de Fitoquímica de la UAAAN a la **T.A. María Guadalupe Moreno Esquivel**, **T.A. Ma. Leticia Rodríguez González**, **T.A. Olga Leticia Solís Hernández**, **T.A. Edith E. Charles Colunga**, **Lorenzo Villa Sandoval** y **Juan Fco. Urrea Aguilar**, **Juan José Valenzuela Cabrera**, por su apoyo para la realización de esta investigación.

A todos mis compañeros de generación fue genial compartir con ustedes esta etapa de mi vida, por todas las ocasiones buenas y malas que nos brindamos una mano de apoyo, amistad y cariño a **Elizabeth Martínez Hdz., Osvaldo Aguilar Ramírez, Patricia Fernández, M.C. Esperanza Salas M., M.C. Fabiola Garrido, Alejandro Reyes Sebastián, Eduardo Santiago (changuito) y Yesenia Galindo, grandes amigos.**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**), por la beca otorgada (711190) para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mi padre Dios, ya que contigo todo lo puedo y sin ti nada, te dedico mi esfuerzo, cansancio y todo el trabajo realizado.

*Con mucho cariño y respeto a mis queridos padres **Juanita de la Cruz Sánchez García** y **Pedro Gaytán Moreno** que son los mejores papás del mundo que Dios me pudo prestar. Por estar siempre en los momentos que más los necesito, por su apoyo incondicional para cuidar a mis niños mientras que yo me dedicaba a la escuela.*

*Con todo mi corazón a mis hijos **Alexa Regina** y **Diego Nicolás**, que son el motor de mi vida, les dedico este trabajo con todo mi amor, ya que a veces sacrificaba tiempo de estar con ustedes por estar en la escuela y aun así ustedes siempre me recibían con besos y abrazos. Los amo hijos míos.*

*A mi esposo **Emir I. González Ruiz** por ser paciente y apoyarme en todo momento, fue especial pasar esta etapa de mi vida a tu lado.*

*A mis hermanas, con todo mi aprecio y admiración, ya que para ustedes no hay imposibles. Gracias por los buenos consejos y porras, ustedes siempre saben de qué manera resolver los problemas. Fueron de gran apoyo para mí durante la maestría, estando en todo momento, por sus palabras de aliento, las quiero mucho manas **Lic. Xóchitl Gaytán Sánchez**, **Lic. Rocío Betsaida Gaytán Sánchez** e **Ing. Maria Cristal Gaytán Sánchez**.*

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|------|
| AGRADECIMIENTOS..... | iii |
| DEDICATORIA | v |
| LISTA DE CUADROS | viii |
| LISTA DE FIGURAS | x |
| RESUMEN..... | xii |
| ABSTRACT..... | xv |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| Objetivo General..... | 2 |
| Objetivos Específicos..... | 2 |
| Hipótesis | 3 |
| REVISIÓN DE LITERATURA..... | 4 |
| Origen del Tomate..... | 4 |
| Producción de Tomate en México | 4 |
| Enfermedades del Tomate | 4 |
| Marchitez causada por <i>Fusarium oxysporum</i> | 5 |
| Cáncer de tallo y moho negro causado por <i>Alternaria alternata</i> | 7 |
| Control de Enfermedades del Tomate por Extractos Vegetales..... | 9 |
| Extractos de Nogalillos con Actividad Biológica | 10 |
| <i>Juglans</i> spp. y <i>Carya</i> sp. | 11 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 15 |
| Colecta de Plantas | 15 |
| Elaboración de Extractos de Etanol y Acuosa..... | 15 |
| Cuantificación de Fenoles Totales y Actividad Antioxidante | 15 |
| Contenido de fenoles totales | 16 |
| Actividad antioxidante..... | 16 |
| Análisis de Composición Química de <i>Juglans</i> spp. y <i>Carya</i> sp. por Cromatografía de Gases–Espectrometría de Masas (GC–MS) | 17 |
| Evaluación de extractos contra <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Alternaria alternata in vitro</i> | 18 |
| Aislamiento de hongos fitopatógenos..... | 18 |

| | |
|--|----|
| Identificación de <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Alternaria alternata</i> por PCR..... | 18 |
| Bioensayo de actividad antifúngica de extractos de nogalillos | 19 |
| Análisis estadísticos del bioensayo <i>in vitro</i> | 19 |
| Evaluación de extractos contra <i>Fusarium oxysporum</i> en Invernadero | 20 |
| Preparación de solución madre de extractos e inóculo | 20 |
| Inoculación de plantas y trasplante..... | 21 |
| Variables evaluadas durante el experimento en invernadero | 22 |
| Variables evaluadas a la cosecha | 22 |
| Variables de calidad externas e internas evaluadas en los frutos | 23 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 25 |
| Contenido Total de Fenoles | 25 |
| Actividad Antioxidante | 27 |
| Composición Química de Extractos | 28 |
| <i>Juglans mollis</i> | 29 |
| <i>Juglans microcarpa</i> | 33 |
| <i>Carya ovata</i> | 37 |
| Actividad Antifúngica de Extractos | 42 |
| Identificación de patógenos | 42 |
| Efecto antifúngico de los extractos de nogalillos contra <i>Fusarium oxysporum</i> | 42 |
| Análisis Probit..... | 47 |
| Efecto antifúngico de los extractos de nogalillos contra <i>Alternaria alternata</i> | 48 |
| Análisis Probit..... | 53 |
| Efecto de Extractos en Etanol Contra <i>Fusarium oxysporum</i> en Invernadero | 54 |
| Incidencia y Severidad..... | 54 |
| Altura de planta y diámetro de tallo | 58 |
| Peso fresco y seco de hojas, tallos y raíces | 61 |
| Análisis de calidad a frutos después de la cosecha..... | 65 |
| CONCLUSIONES | 69 |
| REFERENCIAS | 70 |

LISTA DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Contenido total de fenoles y capacidad antioxidante | 27 |
| Cuadro 2. Compuestos químicos identificados en extracto de hojas y ramas en etanol de <i>Juglans mollis</i> | 29 |
| Cuadro 3. Compuestos químicos identificados en extracto de hojas y ramas en agua de <i>Juglans mollis</i> | 32 |
| Cuadro 4. Compuestos químicos identificados en extracto de hojas en etanol de <i>Juglans microcarpa</i> | 34 |
| Cuadro 5. Compuestos químicos identificados en extracto de hojas y ramas en agua de <i>Juglans microcarpa</i> | 36 |
| Cuadro 6. Compuestos químicos identificados en extracto de hojas y ramas en etanol de <i>Carya ovata</i> | 38 |
| Cuadro 7. Compuestos químicos identificados en extractos de hojas y ramas en agua de <i>Carya ovata</i> | 40 |
| Cuadro 8. Valores medios de porcentaje de inhibición de <i>Fusarium oxysporum</i> , evaluado con extractos de <i>Juglans mollis</i> | 44 |
| Cuadro 9. Valores medios de porcentaje de inhibición de <i>Fusarium oxysporum</i> , evaluado con extractos de <i>Juglans microcarpa</i> | 45 |
| Cuadro 10. Valores medios de porcentaje de inhibición de <i>Fusarium oxysporum</i> , evaluado con extractos de <i>Carya ovata</i> | 46 |
| Cuadro 11. Concentración MIC ₅₀ y MIC ₉₀ , de extractos para inhibir el crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> a las 168 horas..... | 47 |
| Cuadro 12. Valores medios de porcentaje de inhibición de <i>Alternaria alternata</i> , evaluado con extractos de <i>Juglans mollis</i> | 50 |
| Cuadro 13. Valores medios de porcentaje de inhibición de <i>Alternaria alternata</i> , evaluado con extractos de <i>Juglans microcarpa</i> | 51 |
| Cuadro 14. Valores medios de porcentaje de inhibición de <i>Alternaria alternata</i> , evaluado con extractos de <i>Carya ovata</i> | 52 |

| | |
|--|----|
| Cuadro 15. Concentración MIC ₅₀ y MIC ₉₀ de extractos para inhibir el crecimiento micelial de <i>Alternaria alternata</i> a las 168 horas. | 54 |
| Cuadro 16. Valores promedio de severidad e incidencia evaluadas en plantas de tomate a causa de <i>F. oxysporum</i> | 55 |
| Cuadro 17. Comparación de medias de altura de la planta (cm) | 59 |
| Cuadro 18. Comparación de medias de diámetro de tallo (mm) | 60 |
| Cuadro 19. Comparación de medias de las variables peso fresco y seco de hoja, tallo, raíz y longitud de raíz | 61 |
| Cuadro 20. Comparación de medias, número de hojas, frutos, flores, y rendimiento total por planta..... | 64 |
| Cuadro 21. Análisis de calidad en frutos de tomate | 66 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Fiálides, microconidias y macroconidias de <i>Fusarium oxysporum</i> | 6 |
| Figura 2. Conidias con septos de <i>Alternaria alternata</i> | 8 |
| Figura 3. Especies de A) <i>J. mollis</i> , B) <i>J. microcarpa</i> , C) <i>C. ovata</i> , <i>in situ</i> | 11 |
| Figura 4. <i>Juglans mollis</i> Engelm.. .. | 13 |
| Figura 5. <i>Carya Ovata</i> Mill. | 14 |
| Figura 6. Inoculación de raíces de plantas de tomate con <i>F. oxysporum</i> | 21 |
| Figura 7. Aplicación de extractos vegetales a plantas de tomate..... | 22 |
| Figura 8. Corte de frutos maduros del primer racimo..... | 23 |
| Figura 9. Extracción de licopeno | 25 |
| Figura 10. GC-MS. Cromatografía de extracto de hojas en etanol de <i>Juglans mollis</i> y estructura de Hexilenglicol. | 31 |
| Figura 11. GC-MS. Cromatografía de extracto de ramas en etanol de <i>Juglans mollis</i> y estructura de 4-O-. α -D-glucopiranosilo- D-Glucosa | 31 |
| Figura 12. GC-MS. Cromatografía de extracto de ramas en agua de <i>Juglans mollis</i> y estructura de N-Hexilmetilamina | 32 |
| Figura 13. GC-MS. Cromatografía de extracto de hojas en etanol de <i>Juglans microcarpa</i> y estructura de Vitamina E acetato..... | 33 |
| Figura 14. GC-MS. Cromatografía de extracto de ramas en etanol de <i>Juglans microcarpa</i> y estructura de 2,2,4-Trimetil-3-(3,8,12,16-tetrametil-heptadeca-3,7,11,15-tetraenil)-ciclohexanol..... | 35 |
| Figura 15. GC-MS. Cromatografía de extracto de hojas en agua de <i>Juglans microcarpa</i> y estructura de Oxima-, metoxi-fenil-..... | 36 |
| Figura 16. GC-MS. Cromatografía de extracto de ramas en agua de <i>Juglans microcarpa</i> y estructura de 5-(2-Aminopropil)-2-metilo fenol | 37 |
| Figura 17. GC-MS. Cromatografía de extracto de hojas en etanol de <i>Carya ovata</i> y estructura de Ácido linolénico, éster etílico | 39 |
| Figura 18. GC-MS. Cromatografía de extracto de ramas en etanol de <i>Carya ovata</i> y estructura de Ácido 9,12-Octadecadienoico, éster etílico..... | 39 |

| | |
|--|----|
| Figura 19. GC-MS. Cromatografía de extracto de hojas en agua de <i>Carya ovata</i> y estructura de [R,R]-2,3-Butanodiol..... | 41 |
| Figura 20. GC-MS. Cromatografía de extracto de ramas en agua de <i>Carya ovata</i> y estructura de Isoproturón. | 41 |
| Figura 21. Identificación de <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Alternaria alternata</i> , mediante PCR en gel de agarosa al 2%. | 42 |
| Figura 22. Efecto de extractos de <i>Juglans mollis</i> sobre el crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> a 168 horas..... | 44 |
| Figura 23. Efecto de extractos de <i>Juglans microcarpa</i> sobre el crecimiento de <i>F. oxysporum</i> a 168 horas. | 45 |
| Figura 24. Efecto de extractos de <i>Carya ovata</i> sobre el crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> a 168 horas..... | 46 |
| Figura 25. Efecto de extractos de <i>Juglans mollis</i> sobre el crecimiento de <i>Alternaria alternata</i> a 168 horas..... | 50 |
| Figura 26. Efecto de extractos de <i>Juglans microcarpa</i> sobre el crecimiento de <i>Alternaria alternata</i> a 168 horas..... | 51 |
| Figura 27. Efecto de extractos de <i>Carya ovata</i> sobre el crecimiento de <i>Alternaria alternata</i> a 168 horas..... | 52 |
| Figura 28. Síntomas ocasionados por <i>Fusarium oxysporum</i> | 57 |
| Figura 29. Efecto de <i>Fusarium oxysporum</i> en raíces de plantas de tomate | 63 |

RESUMEN

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE *Juglans* spp. Y *Carya* sp.
CONTRA HONGOS FITOPATÓGENOS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*
L.) *in vitro* Y EN INVERNADERO.

POR

NUBIA ARELI GAYTÁN SÁNCHEZ

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARÍA ANTONIO NARRO

DRA. DIANA JASSO CANTÚ- ASESOR

Saltillo, Coahuila. Diciembre 2017

En México el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las principales hortalizas cultivadas, debido a la superficie sembrada y los niveles de producción, sin embargo es susceptible al ataque de hongos como *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*, los cuales son patógenos importantes que causan enfermedades destructivas en el cultivo, como la marchitez vascular y moho negro, disminuyendo hasta en un 60% la producción. Por mucho tiempo estas enfermedades han sido tratadas con agroquímicos sintéticos logrando el control, sin embargo, existen nuevas alternativas como fungicidas a base de extractos vegetales que no causan daños al ambiente ni aumentan la resistencia de los patógenos, como son los extractos provenientes de plantas. Las especies de la familia Juglandaceae han sido usadas para inhibir el crecimiento de hongos, bacterias y nemátodos debido a los compuestos fenólicos que contienen. Los objetivos de esta investigación fueron: evaluar la actividad antifúngica de extractos de etanol y acuosos: de hojas y ramas de *Juglans mollis* Engelm, *Juglans microcarpa* Berl y *Carya ovata* Mill; y de los frutos de *J. mollis* contra *F. oxysporum* y *A. alternata in vitro*, y en invernadero contra *F. oxysporum*, y obtener información sobre la composición química de los extractos. El efecto inhibitorio de los extractos de etanol y acuosos de hojas, ramas y frutos se llevó a cabo por el método de dilución de agar y se prepararon concentraciones de 50 a 5000 mg/L. La composición química se determinó por Cromatografía de Gases acoplado a Masas (GC-MS). Para el bioensayo en invernadero se seleccionaron los extractos de etanol que presentaron mayor inhibición *in vitro*, los cuales se aplicaron en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) var. Río Grande contra el ataque de *F. oxysporum*. Se evaluaron las variables de incidencia, severidad, crecimiento de planta, rendimiento y calidad de fruto, y peso de raíz. Los extractos de etanol de *J. mollis*, *J. microcarpa* y *C. ovata*, mostraron en general, mayor efectividad que los extractos acuosos en la inhibición *in vitro* de *F. oxysporum* y *A. alternata*. Además, los extractos de etanol de las tres especies presentaron un mayor efecto de inhibición micelial sobre *A. alternata* que en *F. oxysporum*. Los extractos de etanol de los frutos de *J. mollis* presentaron los valores de MIC 50

y 90 más bajos (1963 mg/L y 8229 mg/L, respectivamente), para inhibir a *F. oxysporum*. Por otra parte, los extractos de etanol de las hojas de *C. ovata* presentaron los valores de MIC₉₀ más bajos (2935 mg/L) para inhibir a *A. alternata*. Los compuestos químicos identificados en los extractos de etanol de hojas y ramas fueron: 11 y 13 compuestos en *J. mollis*, respectivamente; 12 y 9 compuestos en *J. microcarpa*, respectivamente; y 9 y 6 compuestos en *C. ovata*, respectivamente. Los resultados de los análisis de varianza incidencia y severidad en invernadero, mostraron diferencia estadística entre tratamientos. Los extractos de *J. mollis* y *J. microcarpa* a 5000 mg/L protegieron a las plantas de tomate del ataque de *F. oxysporum*, disminuyendo la enfermedad a 37.5%. Los extractos de etanol de *J. mollis* y *J. microcarpa* presentaron actividad antifúngica contra *F. oxysporum* y *A. alternata*, *in vitro* y en invernadero. El efecto de inhibición producido por los extractos se puede atribuir a los compuestos químicos identificados, de los cuales los compuestos mayoritarios se han reportado que poseen actividad antifúngica y antioxidante, principalmente. Por lo anterior, estas especies pueden ser la base para elaborar productos biofungicidas.

Palabras clave: *Juglans mollis*; *Juglans microcarpa*; *Carya ovata*; *Fusarium oxysporum*; *Alternaria alternata*; Actividad antifúngica *in vitro* y en invernadero; Composición química; Contenido de Fenoles Totales; Actividad Antioxidante; Incidencia; Severidad.

ABSTRACT

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF EXTRACTS OF *JUGLANS* spp. AND *CARYA* sp.
AGAINST TOMATO FITOPATHOGENS (*Solanum lycopersicum* L.) *IN VITRO*
AND GREENHOUSE.

BY

NUBIA ARELI GAYTÁN SÁNCHEZ

MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARÍA ANTONIO NARRO

PhD. DIANA JASSO CANTÚ- ADVISOR

Saltillo, Coahuila. December 2017

In Mexico, tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the main vegetables cropped, due to the sown area and the production levels, however, this crop is susceptible to fungi attack, such as *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*, which are important pathogens that cause destructive diseases in the crops, such as vascular wilt and black mold, decreasing until 60% the production. For a long time, these diseases have been treated with synthetic agrochemicals, achieving the control of the disease, however, there are new alternative, such as plant-based fungicides that do not cause damage to the environment, nor increase the resistance of the pathogens. The Juglandaceae species have been used to inhibit the fungi, bacteria and nematodes grow, due to the phenolic compounds that the plants contain. The aims of this research were: to evaluate the antifungal activity of the ethanol and aqueous extracts of leaves and branches of *Juglans mollis* Engelm, *Juglans microcarpa* Berl and *Carya ovata* Mill; and the fruits extracts of *J. mollis* against *F. oxysporum* and *A. alternata*, *in vitro*, and in greenhouse against *F. oxysporum*, as well as to obtain information about the chemical composition of the extracts. The inhibitory effect of the ethanol and aqueous extracts of leaves, branches and fruits was carried out by the agar dilution method, and concentration from 50 to 5000 mg/L were prepared. The chemical composition was determined by Gas Chromatography coupled to mass (GC–MS). For the bioassay in greenhouse, were selected the ethanol extracts that presented the highest inhibition *in vitro*, which were applied to the tomato var. Río Grande crop, against *F. oxysporum*. The variables incidence, severity, plant grow, yield and fruit quality, and root weight were evaluated. The *J. mollis*, *J. microcarpa* and *C. ovata* ethanol extracts, showed in general, higher effectiveness than the aqueous extracts, in the *F. oxysporum* and *A. alternata* inhibition. Besides, the ethanol extracts of the three species, presented a higher effect of the mycelial inhibition on *A. alternata* than on *F. oxysporum*. The ethanol extracts of the *J. mollis* fruits, presented lower values of MIC₅₀ and MIC₉₀ (1963 mg/L and 8229 mg/L, respectively), to inhibit *F. oxysporum*. On the other hand, the ethanol extracts of *C. ovata* leaves, showed the lowest MIC₉₀ values (2935 mg/L) to inhibit *A. alternata*. The chemical

compounds identified in the leaves and branches ethanol extracts were: 11 and 13 compounds in *J. mollis*, respectively; 12 and 9 compounds in *J. microcarpa*, respectively; and 9 and 6 compounds in *C. ovata*, respectively. The analysis of variance results of incidence and severity, showed statistical differences between treatments. The *J. mollis* and *J. microcarpa* extracts at 5000 mg/L protected the tomato plants from *F. oxysporum* attack, decreasing the disease to 37%. The ethanol extracts of *J. mollis* and *J. microcarpa* presented antifungal activity against *F. oxysporum* and *A. alternata*, *in vitro* and in greenhouse. The inhibition effect produced by the extracts can be attributed to the chemical compounds identified, from which the majoritarian compounds has been reported with antifungal and antioxidant activities, mainly. By the above, these species can be the base to elaborate biofungicides products.

Keywords: Extracts from *Juglans mollis*, *Juglans microcarpa* and *Carya ovata*; *In vitro* and *in vivo* antifungal activity; Total Content of Phenols, Antioxidant Activity, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, Incidence and Severity, Vascular wilt

INTRODUCCIÓN

El tomate es una de las principales hortalizas producidas en México, ya que es ampliamente consumido y ocupa el primer lugar en exportación, principalmente hacia los Estados Unidos de América. México produce aproximadamente tres millones de toneladas anuales (SIAP, 2016). Sin embargo, en este cultivo se producen pérdidas hasta del 60 por ciento (Martínez et al., 2016; González et al., 2012), por enfermedades ocasionadas por *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*, como marchitez vascular, cáncer de tallos y pudrición de frutos (Burketová et al., 2015; El-Khallal, 2007; Martínez et al., 2016). Las esporas de estos hongos se pueden encontrar en restos de cultivo, suelo, semillas, aire y herramientas de trabajo, las cuales pueden llegar a dispersarse por medio del agua de riego, viento y lluvia (Blancard et al., 2011; Martínez et al., 2016) y así, bajo condiciones climáticas favorables, desarrollar la infección. Para controlar enfermedades ocasionadas por estos hongos, se han usado productos químicos sintéticos que logran controlar a estos patógenos, sin embargo, se ha hecho un uso excesivo e indiscriminado que ha ocasionado daños al medio ambiente (Yavuz y Arslan, 2013), acumulación de residuos tóxicos en productos agrícolas (Silva et al., 2002), además de la resistencia que han desarrollado los microorganismos a los químicos sintéticos (Schillberg et al., 2001). En la búsqueda de nuevas alternativas amigables con el medio ambiente, se ha realizado investigación con extractos vegetales (Migliori et al., 2017; Schinzoumka et al., 2016; Wianowska et al., 2016; Yavuz y Arslan, 2013; Muthuraman et al., 2012), los cuales han presentado actividad antifúngica, siendo un importante área de oportunidad ya que son biodegradables y su uso evita la contaminación del medio ambiente. Especies de la familia Juglandaceae (nogalillos) han reportado actividades antifúngicas, antibacterial, nematicida e insecticida (Garrido et al., 2014; Cruz et al., 2008; Harun y Labosky, 1985), lo cual se atribuye al contenido de polifenoles y a los metabolitos secundarios que contienen. En los estados de Coahuila y Nuevo León, crecen de forma silvestre plantas de nogalillos: *Juglans mollis*, *J. microcarpa* y *Carya ovata*. De *J. mollis* se ha reportado información de que las hojas se han utilizado de manera

tradicional para aliviar los malestares de reumatismo y cicatrización de heridas (Casas et al., 1994). Sin embargo, existe escasa información acerca de la composición química y actividad biológica de las especies mencionadas anteriormente. Por lo anterior y en la búsqueda de la identificación y evaluación de extractos de las zonas áridas y semiáridas que presenten actividad biológica contra los hongos fitopatógenos que merman la producción de los cultivos de importancia económica, es que se propone la presente investigación.

Objetivo General

Evaluar la actividad antifúngica de extractos de etanol y agua: de hojas y ramas de *Juglans mollis* Engelm, *Juglans microcarpa* Berl y *Carya ovata* Mill; y de los frutos de *J. mollis* contra *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*, *in vitro*, y en invernadero en plantas de tomate var. Rio Grande contra *F. oxysporum*, así como obtener información sobre la composición química de los extractos.

Objetivos Específicos

Cuantificar el contenido de polifenoles y actividad antioxidante de los extractos de nogalillos.

Determinar la composición química de los extractos.

Evaluar *in vitro* la actividad antifúngica de los extractos de hojas, ramas y frutos en etanol y agua de *Juglans mollis*, *Juglans microcarpa* y *Carya ovata* contra *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*.

Determinar el efecto antifúngico en invernadero de los extractos de etanol de *J. mollis*, *J. microcarpa* y *C. ovata* contra *F. oxysporum* en plantas de tomate.

Hipótesis

Los extractos de *Juglans mollis*, *Juglans microcarpa* y *Carya ovata* poseen compuestos bioactivos que inhiben el desarrollo micelial de *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*, *in vitro* y en invernadero en plantas de tomate.

REVISIÓN DE LITERATURA

Origen del Tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) tiene origen en América del sur y fue domesticado en México, aproximadamente en el año 500 a. C. y cultivado por los Aztecas, su nombre proviene de “*tomatl*” en lengua náhuatl (Blancard et al., 2011; Morris y Taylor, 2017). El tomate pertenece a la familia de las Solanáceas, siendo una especie diploide autógena (Morris y Taylor, 2017).

El tomate es la segunda hortaliza más consumida a nivel mundial (McGovern, 2015), en fresco por ser fuente de compuestos antioxidantes, vitamina C, licopeno y minerales, o procesados a base del fruto (Nuez, 2001; Morris y Taylor, 2017). Genera importantes entradas de divisas, por la creación de empleos, consumo de materia prima para la producción, mano de obra y comercialización (Sandoval, 2004).

Producción de Tomate en México

En México la producción de tomate más importante se presenta en los meses de Febrero, Marzo y Noviembre con una cosecha promedio de 11.2 t/ha (SIAP, 2016). Entre el 2006 al 2016 la producción creció una tasa promedio anual de 4.8 por ciento, resultando una cosecha de 3.3 millones de toneladas, siendo Sinaloa, San Luis Potosí, Michoacán y Baja California, los principales estados con mayor producción (FIRA, 2017). México es el décimo productor de esta hortaliza a nivel mundial y el principal proveedor de Estados Unidos con el 90.7 por ciento de las exportaciones, generando así \$1,939.1 millones de dólares en el año 2015-2016 (SIAP, 2016).

Enfermedades del Tomate

El cultivo de tomate se ve afectado por diferentes enfermedades que ocasionan una baja calidad en los frutos, además de pérdidas económicas importantes (Burketová et al., 2015; El-Khallal, 2007). En México la producción de tomate se ve afectada principalmente por enfermedades y plagas causadas por hongos,

bacterias, fitoplasmas, virus, insectos y nemátodos, que disminuyen el rendimiento hasta un 60 por ciento (Martínez et al., 2016; González et al., 2012). Entre los principales hongos que causan enfermedades en el cultivo de tomate, se encuentran *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata* (Blancard et al., 2011; González et al., 2012; Martínez et al., 2016), los cuales ocasionan marchitez vascular, cáncer de tallos y pudrición de frutos en variedades susceptibles y bajo condiciones climáticas favorables, en sistema abierto o invernadero (Ramaiah y Garampalli, 2015; Ascencio et al., 2008; Carrillo et al., 2003; Pane et al., 2016).

Marchitez causada por *Fusarium oxysporum*

En el tomate, el agente causal de la marchitez vascular es *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, anamorfo de *Giberella*, hongo que se encuentra distribuido en todo el mundo en climas cálidos, sobrevive en suelos y restos de cultivos hasta 80 centímetros de profundidad de un ciclo a otro, durante más de 10 años a través de esporas de resistencia de paredes gruesas llamadas clamidosporas (Blancard et al., 2011; Cai et al., 2003). Los daños que ocasiona se asocian a la raza y la variedad cultivada, y hasta el momento se conocen tres razas (Blancard et al., 2011; González et al., 2011; Ma et al., 2013).

Características morfológicas

Es un ascomiceto filamentoso con micelio bien desarrollado septado y conidióforos característicos (García et al., 2007). Produce tres tipos de esporas asexuales (Figura 1) en el cultivo como: microconidias que son rectas o curvadas, hialinas, unicelulares, de forma oval a elipsoidal, miden de 5-12 μ por 2.2-3.5 μ y son producidas en fiálidas; macroconidias son hialinas de 3 a 5 septos en forma curvada (“canao”), miden aproximadamente entre 27-60 μ por 3-5 μ ; clamidiosporas son estructuras de sobrevivencia en forma redonda y de pared delgada, se producen solas o en pares de forma intercalada o ramificada (Martínez et al., 2016; Leslie y Summerell, 2006).

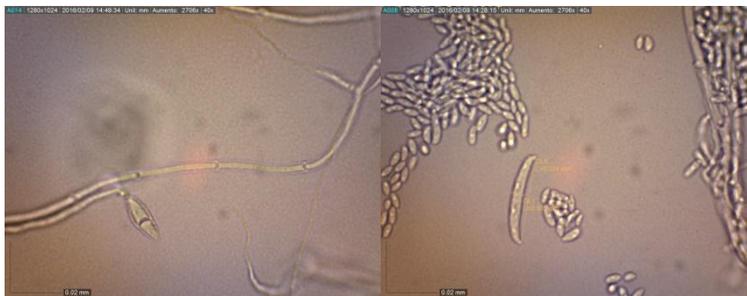


Figura 1. Fiálides, microconidias y macroconidias de *Fusarium oxysporum*

Infección y síntomas

Las especies de *Fusarium* que causan marchitamiento siguen una forma similar de infección, comienza por el contacto con la superficie del hospedero a través de heridas en las raíces (Blancard et al., 2011; González et al., 2012), descomposición de las barreras físicas por enzimas hidrolíticas como quitinasas, celulasas y proteasas, que actúan sobre celulosa y pectina que son fuente de alimento para poder crecer y reproducirse, combate a los componentes antifúngicos del anfitrión y segregación de micotoxinas que inactivan y matan las células del huésped para llegar hasta los vasos del xilema e invadirlo, como el ácido fusárico, ácido deshidrofusárico, licomarasmina y vasinfuscarina (Singh et al., 2017; Villa et al., 2015; Agrios, 2005), los cuales son los responsables de los síntomas de la enfermedad como el amarillamiento y la necrosis. La colonización se restringe a la región de entrada inicial, ya que geles y exudados formados en los vasos bloquean y/o atrapan a las conidias y así evita que se invada a la célula. Esto puede ocurrir en cultivos resistentes y susceptibles (González et al 2012; Villa et al., 2015), sin embargo, este proceso contribuye a hacer que se marchite la planta. En plántulas se manifiesta escaso desarrollo, las hojas pierden turgencia y presentan flacidez y epinastia, tornándose amarillas debido a que las toxinas producidas por el hongo sintetizan una reducción de clorofila a lo largo de las venas y esto a su vez reduce la fotosíntesis y alteran la permeabilidad de las membranas de las células foliares y su capacidad de controlar el agua pérdida a través de la transpiración (Singh et al., 2017; Gómez et al., 2011). En plantas adultas el amarillamiento es unilateral en momentos más calurosos del día, las hojas se

terminan de secar pero no se caen (Blancard et al., 2011). La marchitez avanza conforme al número y distribución de los vasos taponados, ya que el agua se distribuye a los vasos adyacentes produciendo un estrés hídrico. El tejido vascular se torna café oscuro y se ensancha la base del tallo originando la marchitez y por consecuencia, la muerte de la planta (Zhang et al., 2011; Gómez et al., 2011; Martínez et al., 2016). También se pueden formar raíces adventicias y en los frutos se pueden ver síntomas como podredumbres a causa de este hongo (Blancard et al., 2011).

Se puede diseminar por medio de semillas, plántulas infectadas, sustratos, agua y maquinaria, así como tutores y herramientas. Corrientes de aire y salpicaduras de agua diseminan las clamidosporas del suelo contaminado. Las condiciones ideales para su desarrollo son temperaturas elevadas (óptima de 28 °C), suelos arenosos con pH ácidos (este pH aumenta la virulencia), poca humedad del suelo e intensidad luminosa y huéspedes carentes de nitrógeno, fósforo y calcio así como alto en potasio (Martínez et al., 2016; Blancard et al., 2011).

Cáncer de tallo y moho negro causado por *Alternaria alternata*

El género *Alternaria* se encuentra en un extenso número de cultivos agrícolas, causando daños significativos en todo el mundo, ya sea en campo o en la cosecha. Es un organismo cosmopolita y la mayoría de las especies son saprófitas (Andersen et al., 2001), produce toxinas, ácidos orgánicos y enzimas de maceración celular o pectolíticas que degradan y disuelven sustancias pécticas de la lámina media de las células que constituyen la pared celular del hospedero (Andersen et al., 2001).

Características morfológicas

Alternaria alternata es un hongo Deuteromiceto, pertenece a la clase Hifomocetos, orden Moniliales, familia Dematiaceae (Barnett y Hunter 1998), produce conidios color café oscuro en largas cadenas de seis a catorce conidios de longitud (Pitt y Hocking, 2009), desarrolla abundantes cadenas

secundarias y en ocasiones terciarias de dos a ocho conidias de longitud. Los conidios miden entre 20-60 μm de largo por 9-18 μm de ancho, en forma ovalada, tienen picos cortos y pueden ser lisos o finamente ornamentados con septos transversales y longitudinales (Troncoso y Tizado, 2014; Pryor y Michailides, 2002; Andersen et al., 2001; Rotem, 1998)

Infección y síntomas

Se encuentra en el aire y suelo, sobrevive en residuos de plantas hospederas o cultivos susceptibles por más de un año, se desarrolla en ambientes con exceso de humedad y agua libre sobre los tejidos, ya que esto potencializa la penetración a través de las hojas, heridas en el follaje y salpicaduras de los suelos (Andersen et al., 2001). La temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 28 °C, pero también se puede desarrollar a temperaturas de almacenamiento en frío (10-14 °C), dependiendo de la madurez de los frutos. En los frutos los síntomas empiezan en la base del tomate y también las flores, con manchas pequeñas de color gris que se vuelven oscuras, se presenta una pudrición seca y hundida de color café a negro con anillos concéntricos, con la humedad presente en la superficie de las lesiones existe abundante producción de esporas. (Pane et al., 2016; Snowdon, 1991). En los tallos se forman canchales de color café oscuro con anillos concéntricos, se desarrolla una podredumbre café y seca (Sánchez, 2001), en este sitio produce una toxina que se traslada a la parte superior de la planta y causa muerte del tejido intravenoso de las hojas (Sánchez, 2001).



Figura 2. Conidias con septos de *Alternaria alternata*

Control de Enfermedades del Tomate por Extractos Vegetales

Para el control y eliminación de enfermedades a causa de estos hongos se han utilizado una gran variedad de agroquímicos sintéticos, los cuales tienen buen efecto, sin embargo, aumenta los costos de producción y afectan al medio ambiente (Yavuz y Arslan, 2013). Además el uso desmedido e indiscriminado de fungicidas sintéticos ha creado la resistencia de ciertos patógenos (Schillberg et al., 2001), por lo que se ha incrementado la dosis y la sobredosis aumenta los residuos tóxicos en alimentos, y la aparición de plagas secundarias (Silva et al., 2002). Una de las alternativas a los productos sintéticos para el control de hongos fitopatógenos es el empleo de extractos provenientes de plantas, ya que sintetizan una gran variedad de compuestos primarios y secundarios (Montes et al., 2000), como fenoles totales, que dependen de la localización de crecimiento y el tipo de planta para obtener altos contenidos (Blomhoff et al., 2006). Diversas investigaciones han estudiado más de 200 especies de plantas contra diferentes especies de hongos fitopatógenos demostrando que las plantas interactúan con los hongos, teniendo como respuesta una total inhibición o estimulación biológica, gracias a los compuestos de defensa como: las inhibitinas que conforman a la planta para detener la llegada de hongos y fitoalexinas las cuales son en respuesta a la infección (Montes et al., 2000).

Para el estudio y extracción de biocompuestos de las plantas, es necesario el uso de solventes como etanol, metanol, hexano, cloroformo, etc., para extraer la mayor cantidad de algunas sustancias químicas orgánicas como: ácidos grasos, esteroides, alcaloides, flavonoides, glucósidos, saponinas, taninos y terpenos (Rodríguez et al, 2012), ya que se han reportado que la mezcla de metabolitos secundarios han inhibido a hongos fitopatógenos. Jasso de Rodríguez et al. (2015), mostraron la eficacia del extracto de etanol de *Rhus muelleri* contra *F. oxysporum*, *in vitro*, logrando inhibir el crecimiento micelial desde 28.2-71.4 % con concentraciones de 2000 y 6000 ppm respectivamente. Sharma et al.

(2016), inhibieron con 99% el crecimiento micelial de *F. oxysporum* con aceite de clavo de olor *Syzygium aromaticum* a 500 ppm.

Extractos de Nogalillos con Actividad Biológica

Extractos de la familia Juglandaceae se han usado en la medicina tradicional para tratar enfermedades respiratorias. Además se ha reportado actividad antimicrobiana de extractos crudos de corteza y hojas en hexano y etanol de *J. mollis*, *J. regia* y *C. illinoensis* contra *Mycobacterium tuberculosis* con valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de 35, 50 y 100 µg/mL (Cruz et al., 2008). Yang et al. (2009), obtuvieron Juglona a partir de la *J. mandshurica* usando GC-MS, este compuesto se considerada como un pigmento natural que ha presentado actividad antifúngica contra *Aspergillus niger*, *Paecilomyces variotii*, *Trametes versicolor*, *Gloeophyllum trabeum* a concentraciones de 500 ppm hasta 8000 ppm. Harun y Labosky (1985) reportaron la actividad antifúngica y anti termita usando extractos de agua, acetona y hexano de *C. ovata* a una concentración de 10-100 mg/mL contra *Lenzites trabea* y 70 mg/mL contra *Reculitermes flavipes*. Se ha reportado actividad antifúngica de extractos de hojas en etanol de *J. regia* contra *F. culmorum*, *F. solani*, *Botrytis cinerea*, *Macrophomina phaseolina* y *Rhizoctonia solani*, con una inhibición del 38.8%, 25.2%, 41.3%, 40.2% y 60.6%, respectivamente, a una concentración de 10 % w/v con extractos en etanol (Yavuz y Arslan, 2013).

Ara et al. (2013), identificaron 11 compuestos en extractos de *J. regia*, los cuales fueron; cyclobutanol (91.7%), 4h-pyran-4-one,2,3-dihydro-3,-dihydroxy-6-methyl (89.8%), 1,3-dioxolane-4-methanol,2,2 dimethyl (88.6%), 1,6,3,4-dianhydro-2-deoxy-beta-d-lyxo-hexopyranose (87.5), cyclopropyl carbinol (84.5%), 2-heptanamine,5-methyl-(82.1%), pyrimidine-2,4(1h,3h)-dione,5-amino-6-nitroso (81.5%), alanine (80.9), butanenitrile,2,3-dioxo-,dioxime,o,o-diacetyl (80.7%), (r)-(-)-2-amino-1-propanol (80.5%) y benzaldehyde,4-ethoxy (80.3%).



Figura 3. Especies de A) *J. mollis*, B) *J. microcarpa*, C) *C. ovata*, *in situ*

***Juglans* spp. y *Carya* sp.**

La familia Juglandaceae consta de siete géneros y alrededor de 60 especies de árboles deciduos y monoicos con hojas alternas, pinnadas compuestas (MaGranahan y Leslie, 2012). Los géneros *Carya* y *Juglans* presentan una concentración de crecimiento en las zonas templadas del Norte de América y Asia; el género *Carya* se extiende hasta el sur del Estado de Veracruz en México; en cuanto al género *Juglans*, se presenta del Sur de Canadá hasta Argentina (Stone, 1997). Especies como *J. regia* y *C. illinoensis* son de importancia comercial y *J. nigra*, *J. mollis*, *J. californica*, *C. cordiformis*, *C. glabra*, *C. laciniosa* y *C. ovata* no se distribuyen para el consumo humano (Wang et al., 2014; Brezna y Kuchta, 2008).

Los miembros del género *Juglans* son árboles o grandes arbustos que poseen ramas cortas, grandes hojas compuestas aromáticas y amentos solitarios. La fruta sin ruzno es una drupa falsa que contiene una nuez grande con cáscara leñosa. Este género consta de 21 especies nativas aproximadamente (MaGranahan y Leslie, 2012). En México, se encuentran en forma silvestre las especies *J. mollis* Engelm, *J. microcarpa* Berl y *C. ovata* Mill (Figura 3), también llamados nogalillos, las cuales son una fuente importante de polifenoles (Salazar et al., 2008; Perez, 2001; Senter et al., 1983). *J. mollis* Engelm (Figura 4) comúnmente llamado nogal encarcelado, crece en forma silvestre cerca de ríos y arroyos, llega a medir 18 metros de altura, sus hojas compuestas de 5 a 9

hojuelas afelpadas y nueces de 3 a 4 cm en forma de limón, no comestibles (Manning, 1957) y *J. microcarpa* Berl comúnmente llamado nogal negro de Texas (Tirmenstein, 1990). Es un árbol pequeño a mediano con troncos simples o múltiples y ramas bajas, las hojas pueden medir de 9 a 23 cm de largo, florece en Mayo y el fruto aparece en Octubre de 2 a 3 piezas en la misma rama con forma globular 2.8 a 3.2 cm de diámetro con una delgada cáscara color marrón. Crece en barrancas y laderas secas y rocosas (Stephens, 1973), adyacentes a ríos o fondos de arroyos (USDA, NRCS, 2008). *C. ovata* Mill (Figura 5) también llamado nogal peludo, es un árbol de 6 a 12 metros de alto, hojas ligeramente ovaladas, florece de marzo a mayo, con frutos de color café rojizo, esféricos y envoltura áspera, nuez ovoide a elipsoide, cáscara dura, de color café claro (Manning, 1949). Se encuentran en estado silvestre al noreste y este de México en Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Puebla y Veracruz (Narave, 1983).

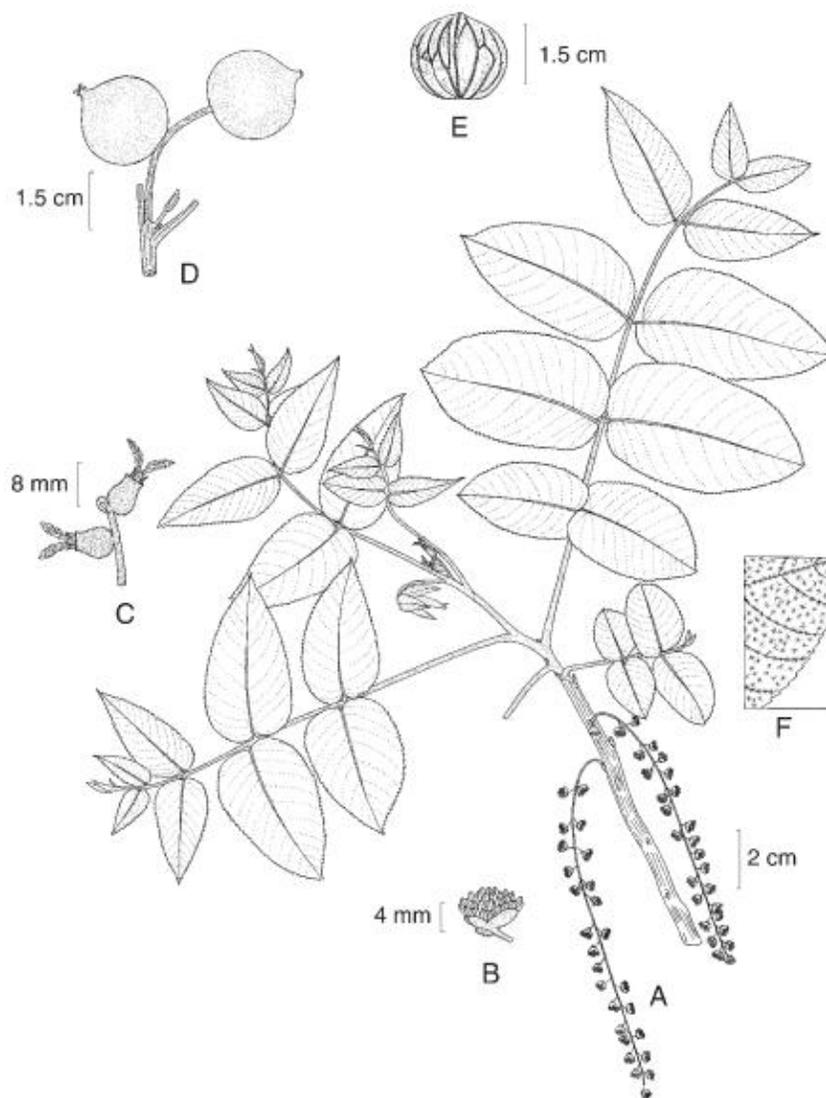


Figura 4. *Juglans mollis* Engelm. **A.** rama con hojas e inflorescencias masculinas y femeninas; **B.** flor masculina, vista lateral; **C.** inflorescencia femenina; **D.** infrutescencia; **E.** nuez; **F.** detalle del haz de la hoja. Ilustrado por Rogelio Cárdenas Soriano y reproducido del fascículo 96 de la Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes por Pérez (2001).

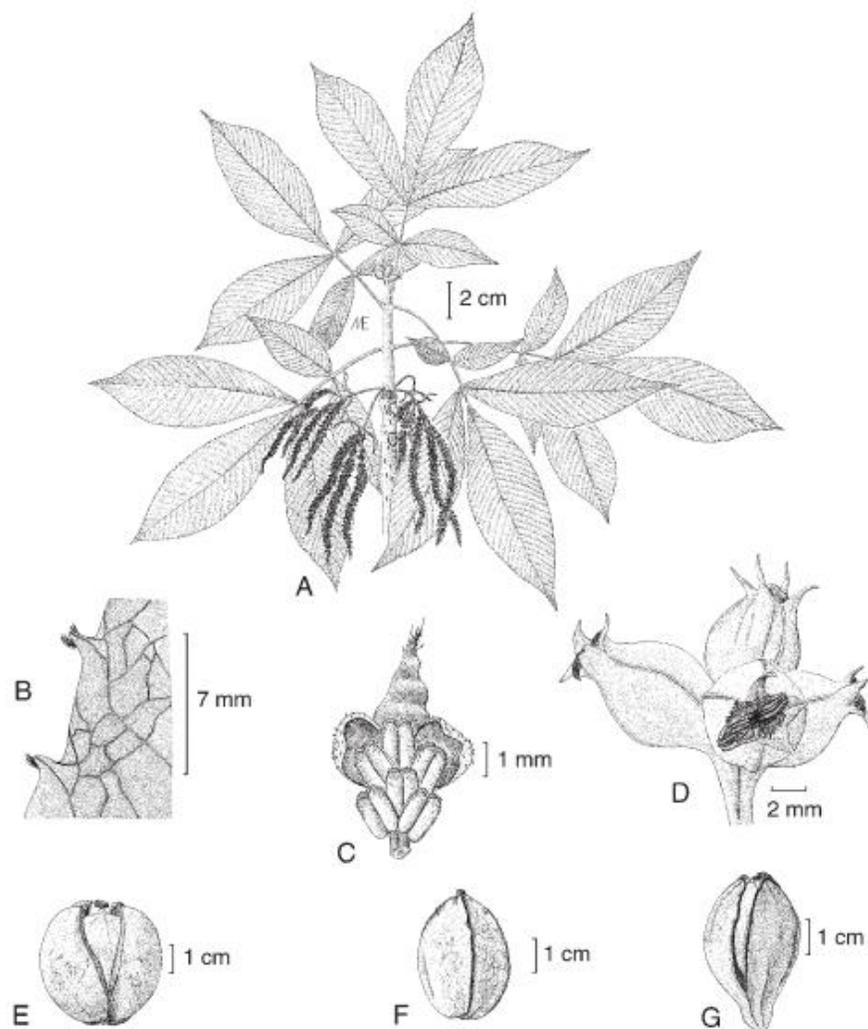


Figura 5. *Carya Ovata* Mill. **A.** rama con hojas e inflorescencias masculinas y femeninas; **B.** margen del foliolo; **C.** flor masculina, vista adaxial; **D.** inflorescencia femenina; **E.** fruto; **F.** fruto de *C. illinoensis*; **G.** fruto de *C. palmeri*. Ilustrado por Manuel Escamilla y reproducido del fascículo 31 de la Flora de Veracruz por Narave (1983).

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de Plantas

Ramas con hojas y frutos de *J. mollis*, y ramas con hojas de *J. microcarpa* y *C. ovata* fueron colectadas al azar de 15 árboles por especie, en diferentes sitios silvestres al sur del estado de Coahuila en el verano del 2015. Las muestras fueron identificadas *in situ* por el Dr. José Ángel Villarreal Quintanilla, y fueron colocados en el Herbario ANSM de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). Las muestras fueron transportadas en bolsas de plástico al Laboratorio de Fitoquímica (UAAAN). Inmediatamente se separaron las hojas de ramas y se colocaron en una estufa Mapsa a 60 °C por 48 horas. A continuación las hojas y ramas se molieron por separado en un molino de cuchillas marca Thomas Wiley, con un tamiz de 2 mm de diámetro y se conservaron en un sitio seco hasta su uso en la obtención de extractos.

Elaboración de Extractos de Etanol y Acuoso

Los extractos de hojas y ramas se elaboraron en extractor Soxhlet usando como solventes etanol grado reactivo al 100% y agua destilada. En un papel filtro Watman #1 se colocaron 14 gr de muestra molida (hojas y ramas separadamente) y se pusieron en extracción con 200 mL de los solventes durante 72 horas. Al final de la extracción los solventes fueron evaporados en un rotaevaporador (Buchii R-200) hasta sequedad. En seguida los matraces se colocaron en estufa de secado a 50 °C por 24 horas. Los extractos se colocaron en frascos color ámbar perfectamente cubierto y colocados en un desecador hasta su uso en los bioensayos.

Cuantificación de Fenoles Totales y Actividad Antioxidante

Los solventes fueron grado reactivo analítico. 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), carbonato de sodio (Na_2CO_3), etanol, ácido acético glacial, trolox (6-Hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico), TPTZ (2, 4,6-tri (2-piridil)-s-triazina) y Folin-Ciocalteu, adquiridos en Sigma (USA).

Para la cuantificación total de fenoles y la capacidad antioxidante se hidrolizaron 20 mg de tejido vegetal seco y molido de hojas, ramas y frutos de *J. mollis*, y hojas y ramas de *J. microcarpa* y *C. ovata*, con 2 mL de ácido sulfúrico concentrado previamente enfriado, durante 3 horas en agitación constante y al final se aforó a 25 mL con agua destilada. Los extractos se solubilizaron con 15 mL del solvente extraído para poder ser aforados a 25 mL con agua destilada.

Contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales del tejido vegetal de los nogalillos y los extractos acuosos y de etanol de hojas y ramas se evaluó con el reactivo Folin-Ciocalteu siguiendo la metodología descrita por Wong y colaboradores (2015). Se colocaron 20 μ L de muestra en los pocillos de la microplaca y se mezcló con 20 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu, dejando reposar por 5 minutos, después se le adicionaron 120 μ L de la solución de carbonato de sodio y se dejó reaccionar por 5 minutos a 50 °C. Finalmente se adicionó 125 μ L de agua destilada y se leyó a una absorbancia de 790 nm usando un espectrofotómetro (Epoch, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE.UU). Se preparó una curva de calibración usando ácido gálico a diferentes concentraciones (100, 200, 400, 600, 800 mg/L, $R^2= 0.9919$). La prueba se realizó por triplicado. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG/g muestra).

Actividad antioxidante

DPPH

La actividad antioxidante del tejido vegetal y los extractos se evaluó por medio de la capacidad de la muestra para captar el radical DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidracil), siguiendo el método de Rodríguez-Jasso, (2014). Se preparó el radical DPPH a una concentración de 60 mM en etanol. Se colocaron en microplaca por triplicado 7 μ L de muestra y 193 μ L de la solución DPPH dejando reaccionar por 30 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Para el blanco se usó el solvente empleado en las muestras sin la solución DPPH, finalmente se leyó a una absorbancia de 517 nm. La curva de

calibración se realizó con Trolox. Los valores fueron reportados como porcentaje de inhibición, calculado con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \left| \frac{1 - \text{Abs}_{\text{muestra}}}{1 - \text{Abs}_{\text{control}}} \right| \times 100$$

FRAP

La capacidad de reducción de tejidos, extractos de etanol y acuosos fueron determinados por el ensayo FRAP, como lo describe Li (2006), usando 10 mM TPTZ en 40 mM de HCl, y 20 mM FeCl₃ en una relación 10:1:1 (v/v/v) a pH de 3.6. Se tomaron 10 µL de muestra y se colocaron en una microplaca con 290 µL del reactivo FRAP, incubando a 37 °C por 15 minutos. La absorbancia se leyó a 593 nm. La curva de calibración se preparó con Trolox a diferentes concentraciones desde 250 mg/L a 1000 mg/L y se usó agua destilada como blanco. La capacidad antioxidante se reportó como microgramo de Hierro II por 100 miligramos de muestra (µgFeII/100 mg muestra).

Análisis de Composición Química de *Juglans* spp. y *Carya* sp. por Cromatografía de Gases–Espectrometría de Masas (GC–MS)

El análisis de GC–MS fue llevado a cabo en un equipo Agilent Technologies 6580 GC unido a un 5975 B MSD usando una columna HP-5MS (30 x 0,25 mm 1D X 0,25) y un sistema de ionización con energía de 70 eV. Se utilizó un flujo constante a 1.1 mL/ min y un volumen de inyección de 1 µL, la temperatura de inyección fue de 250 °C. El programa de calentamiento del horno fue isotérmico durante 5 min a 60°C seguido de un calentamiento de 5°C/min hasta 100°C/min (2 min) y de 10°C/min hasta 250°C/min (5 min). La interpretación de los espectros de masas de los compuestos se realizó utilizando la biblioteca del NIST (National Institute of Standard and Technology).

Evaluación de extractos contra *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata* *in vitro*

Aislamiento de hongos fitopatógenos

Los hongos fitopatógenos usados en el presente estudio se obtuvieron de frutos y raíces de plantas de tomate con síntomas de enfermedades causadas por *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*, tomando tejido sano y enfermo, los cuales se desinfectaron siguiendo la metodología de Ascencio et al. (2008). El tejido fue puesto en una solución de hipoclorito al 1 % por 3 minutos y se enjuagó con agua destilada estéril por 5 minutos, se secó en papel estéril y se sembró en cajas Petri con medio agar papa dextrosa (PDA). Las cajas se incubaron a 28 ± 2 °C. Para obtener cepas puras se usó la técnica de cultivo monospórico descrita por Anguiz (1989) y los patógenos se identificaron a nivel morfológico con la ayuda de claves taxonómicas de Leslie y Summerell (2006) para *Fusarium*; y de Barnett y Hunter (1998) para *Alternaria*.

Identificación de *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata* por PCR

Para la identificación molecular, se seleccionaron hongos aislados, purificados e identificados morfológicamente, posteriormente se extrajo ADN de las cepas y se realizaron pruebas moleculares con la técnica de PCR en tiempo final siguiendo el método de González et al. (2011). Se utilizaron los primers CNL12 (5'-C TGAACGC CTCTAAGTCAG- 3') y CNS 1 (5'-GAGACAAGCATATGACTACTG-3') que codifican para un fragmento de la región intergénica ribosomal (IGS) ubicada entre la subunidad pequeña y la subunidad grande. La temperatura de desnaturalización fue de 94°C por 1 min, seguida de la temperatura de anillamiento de 54 °C por 1 min y la temperatura de extensión a 72 °C por 2 min (Hyun et al., 2001). Los productos de PCR obtenidos (2.6 kb) fueron visualizados en un gel de agarosa al 2%. Se enviaron a secuenciar a MacroGen (USA) y por medio del GenBank se identificó a nivel de especie.

Bioensayo de actividad antifúngica de extractos de nogalillos

Los bioensayos con los dos patógenos se realizaron mediante la técnica de dilución en agar siguiendo el método de Zabka et al. (2011). A partir de una solución madre a 10,000 mg/L. Los extractos de etanol se diluyeron con 10% de etanol y se filtraron con filtros Whatman No. 1 y se esterilizaron bajo un sistema de vacío para retener bacterias. Se usaron concentraciones 50, 250, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 y 5000 mg/L de extractos de etanol y acuosos de hojas, ramas y frutos de *Juglans mollis*, y hojas y ramas de *Juglans microcarpa* y *Carya ovata*. Se usó un control absoluto (solo PDA) para ambos hongos.

Se preparó medio PDA y se le adicionaron los extractos a las diferentes concentraciones y una vez solidificado se inoculó un disco de 4mm de diámetro con el hongo a una temperatura de 28 ± 2 °C, por cuadruplicado. Se midió la cinética de crecimiento cada 24 horas a siete tiempos con vernier digital Stainless Hardened (mm) midiendo en forma de cruz dos puntos hasta que el control absoluto llenara la caja por completo. El porcentaje de inhibición del hongo con los extractos se calculó con la siguiente fórmula tomando como referencia el control absoluto:

$$\% \text{ Inhibición} = \left[\frac{DC-DT}{DC} \right] \times 100$$

Donde DC es el diámetro del control y DT es el diámetro del tratamiento de las diferentes concentraciones evaluadas.

Análisis estadísticos del bioensayo *in vitro*

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con 4 repeticiones. Los resultados se evaluaron con análisis de varianza (ANVA) y con pruebas de comparación de medias por Tukey ($p=0.05$). El análisis Probit se aplicó para calcular la concentración mínima inhibitoria 50 y 90 de extractos, resultando una inhibición del 50 % y 90 % del crecimiento del patógeno en

comparación con el control absoluto (CMI₅₀ y CMI₉₀). Los datos se analizaron usando el software SAS versión 9.0.

Evaluación de extractos contra *Fusarium oxysporum* en Invernadero

El experimento se llevó a cabo en el invernadero del departamento de Forestal ubicado en la UAAAN, localizada al sur de la ciudad de Saltillo, Coahuila, con latitud de 25°21'9.73"N, longitud 101°1'37.72"O y altitud de 1,781 msnm, durante el ciclo de Primavera-Verano del 2017.

Se preparó una mezcla de peat moss, perlita y zeolita en una relación 5:5:1 y se llenaron macetas con capacidad de cuatro galones. Se emplearon plántulas de tomate Saladette var. Rio Grande, ciclo determinado con cinco o seis hojas verdaderas.

Preparación de solución madre de extractos e inóculo

Se pesaron 40 g de extractos de *Juglans microcarpa*, *Juglans mollis* y *Carya ovata* y se les agregó 10% etanol. Los extractos se colocaron en un homogeneizador ultrasónico (Branson 3510) durante 30 minutos y finalmente se aforaron 2000 mL para obtener una solución madre de 10,000 mg/L de extractos de etanol de hojas y ramas para preparar las concentraciones a usar en el bioensayo en el invernadero.

El inóculo se obtuvo mediante arrastre de esporas de cultivos de *Fusarium oxysporum* de 12 días de crecimiento a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ en medio de cultivo PDA, se añadieron 10 mL de agua estéril a cada caja y con ayuda de una varilla de vidrio se frotó para obtener las esporas. Posteriormente se realizó un conteo de esporas por medio de una Cámara de Neubauer (hematocímetro) para obtener una concentración de 6.2×10^7 esporas en 3000 mL de agua estéril.

Diseño experimental en invernadero

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con 9 tratamientos (6 extractos de etanol y 3 testigos): T1, Testigo Absoluto; T2,

Testigo Químico (Benomilo); T3, Testigo Inoculado; T4, *J. microcarpa* hojas 5000 mg/L; T5, *J. microcarpa* hojas 4000 mg/L; T6, *J. microcarpa* tallos 5000 mg/L; T7, *C. ovata* tallos 5000 mg/L; T8, *J. mollis* hojas 5000 mg/L; T9, *J. mollis* hojas 4000 mg/L).

Inoculación de plantas y trasplante

Se utilizaron plantas de tomate de cinco semanas de edad, se sacaron del almácigo, se les hicieron heridas en las raíces por medio de un despunte con tijeras estéril y se inocularon por inmersión de raíces (Figura 6) a una concentración de esporas de 6.2×10^7 esporas/3L, durante 20 minutos y se trasplantaron en macetas con sustrato húmedo el día 29 de Marzo del 2017.



Figura 6. Inoculación de raíces de plantas de tomate con *F. oxysporum*

Efectuado el trasplante, se aplicaron 100 mL de los extractos, directo al tallo de la planta (Figura 7) para que penetrara en las raíces. Después se realizaron tres aplicaciones más a los 10, 20 y 40 días después del trasplante (DDT); empleando 100, 300 y 300 mL de extracto, respectivamente. Las plantas de tomate se mantuvieron 125 días en invernadero a una temperatura promedio de 25°C, con una máxima de 35°C y una mínima de 20°C.



Figura 7. Aplicación de extractos vegetales a plantas de tomate

Variables evaluadas durante el experimento en invernadero

Severidad

Se definió de acuerdo a la escala propuesta por Diener y Ausubel (2005), donde se establece una escala de 0 a 5, relacionada con síntomas de clorosis vascular, necrosis en hojas, daños en peciolo, hojas mal desarrolladas y muerte de las plantas.

Incidencia

De acuerdo a la presencia de los síntomas de la enfermedad, la incidencia se estima evaluando las plantas por tratamiento con criterio visual y dando un valor numérico, de acuerdo con la severidad que se presenta por planta. En seguida se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Incidencia} = \frac{\text{No. plantas enfermas}}{\text{Total plantas}} \times 100$$

Altura de planta y diámetro de tallo

Las lecturas fueron tomadas del total de las repeticiones de los nueve tratamientos a partir de los 13 DDT y cada siete días durante el ciclo del cultivo. La altura se midió con cinta métrica, en centímetros, desde la base del tallo al brote principal y el diámetro se midió en milímetros con Vernier digital en la base del tallo.

Variables evaluadas a la cosecha

Peso fresco

Se evaluaron variables al final del ciclo del cultivo (125 DDT) como: peso fresco de hojas, tallos y raíces. Se cortaron las hojas de los tallos y se pesaron por

separado, así como también los tallos (se cortaron en trozos de cinco cm). Se usó una balanza semianalítica Scout pro SP con capacidad de 6000 g (OHAUS).

Peso seco

El tejido vegetal que anteriormente se pesó en fresco, se introdujo en bolsa de papel con orificios y se colocó en una estufa de secado (MAPSA, HDT-18) a una temperatura de 60°C aproximadamente por 48 horas, transcurrido el tiempo se sacó de la estufa y a temperatura ambiente se midió el peso seco en gramos.

Variables de calidad externas e internas evaluadas en los frutos

Peso fresco, diámetro polar y ecuatorial de frutos

Los frutos se obtuvieron del primer racimo y con coloración roja (Figura 8), con cortes manuales. Se contabilizó el número de frutos por planta y se pesaron los frutos de forma individual y planta, en una báscula Scout Pro de capacidad de 6000 g (OHAUS) para determinar el rendimiento total por planta y tratamiento. Diámetro Polar se midió la distancia entre el pedúnculo y el ápice con vernier digital (mm). Para el Diámetro Ecuatorial, los frutos se midieron tomando la distancia central (longitud transversal en mm).



Figura 8. Corte de frutos maduros del primer racimo

Firmeza de frutos

Se tomó una muestra de 5 tomates por tratamiento cortados del primer racimo y se perforó la corteza del tomate hasta llegar a la pulpa sosteniendo firmemente con la ayuda de un penetrómetro con puntilla de 8 mm, los resultados se expresaron en kilogramo • Fuerza (kg • F).

Potencial de hidrógeno (pH) y Conductividad eléctrica

El pH mide la cantidad de iones hidrógeno presentes en una solución, usando una escala de 1-14 con la ayuda de un potenciómetro marca pHep HANNA, calibrado y la Conductividad eléctrica está relacionada a la calidad del fruto; los resultados se expresaron en $\mu\text{S}/\text{cm}$. Para tomar las lecturas de pH y conductividad eléctrica se molió la muestra de tomate en licuadora (Oster) por un minuto y el producto se vació a un frasco y a una temperatura de 27°C se tomaron las lecturas con un conductivímetro (YSI model 32).

Sólidos solubles totales (SST)

Los sólidos solubles totales se midieron con un refractómetro (ATAGO), en el cual se colocó una muestra de tomate y se tomó la lectura para determinar el cociente total de sacarosa, se expresaron como grados Brix (°Brix).

Determinación de Vitamina C y licopeno

Se tomó una muestra de tomate molido para su cuantificación en cromatógrafo de líquidos (HPLC). Para Vitamina C se preparó una solución de ácido fosfórico al 0.05 N y se le adicionaron 25 mL a 6 g de tomate, se homogenizó y se agitó por 30 minutos, después se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se filtró por medio de un acrodisco de 0.22 μm y se mantuvo en viales a 4 °C hasta su análisis en HPLC. Los resultados se expresaron en miligramos de Vitamina C por 100 gramos de tomate (mg Vitamina C/100 g tomate). Para licopeno se tomó una muestra de tomate molido (0.25g), homogenizado con 15 mL de una mezcla de hexano-acetona 3:2, se agitó durante 30 minutos para la extracción (Figura 9). Posteriormente se agregó agua destilada para separar los compuestos polares de la extracción, se mezcló, filtró y se tomó una alícuota de la parte orgánica para el análisis en HPLC. Este análisis se realizó a temperatura ambiente haciendo inyecciones de 5 μL en un equipo HPLC, marca

Agilent 1200 de bomba cuaternaria, automuestreador y columna analítica Zorbax Eclipse XDB-C18, 4.6 X 150mm, 5 μ . La detección se hizo con luz visible a una longitud de onda de 472 nm, la fase móvil fue isocrática, 30% de etanol y 70% de metanol, a una velocidad de flujo de 1mL/min. Los resultados se expresaron en miligramos de licopeno por gramo de tomate (mg licopeno/g tomate).



Figura 9. Extracción de licopeno

Análisis estadístico

El análisis de los datos de las variables: incidencia, peso fresco y seco de raíz, altura de planta y diámetro de tallo, peso y rendimiento de frutos, diámetro polar, diámetro ecuatorial, firmeza, sólidos solubles totales, pH, conductividad eléctrica, licopeno y vitamina C, se llevaron a cabo por ANVAs y pruebas de comparación de medias por el método de DMS ($p=0.05$), usando el programa SAS-PC System Versión 9.1.3 para Windows. Para el análisis de los resultados de severidad se realizaron por la vía no paramétrica utilizando la prueba de Kruskal-Wallis ($p<0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido Total de Fenoles

Los resultados del análisis estadístico de contenido fenoles totales (CFT) obtenidos de tejidos y extractos de nogalillos se muestran en el Cuadro 1. Se

presentaron diferencias significativas entre los extractos ($p < 0.05$). Los extractos de etanol presentaron los valores más elevados de CFT en relación a los extractos acuosos. Además los extractos presentaron mayor contenido de fenoles que los tejidos de las plantas. Los extractos de etanol de las ramas de *Juglans mollis* y *Juglans microcarpa* y de los frutos de *J. microcarpa* presentaron los valores más elevados con 359.7 mg EAG/g, 321.2 mg EAG/g y 308.5 mg EAG/g muestra, respectivamente. Las diferencias en concentraciones de los compuestos polifenólicos entre los dos solventes de extracción utilizados (etanol y agua), puede ser debido a que siendo el extracto una mezcla de diferentes clases de fenoles, estos pueden ser solubles selectivamente en los solventes (Koffi et al., 2010). En esta investigación, los componentes de las especies tuvieron mayor afinidad por el etanol. Salazar et al. (2008) determinaron CFT en extractos de metanol de hojas, fruto y corteza de *J. mollis* con contenidos de 223 mg catecol/g muestra, 68 ± 3.6 mg catecol/g muestra y 230 mg catecol/g muestra, respectivamente. En nuestra investigación, las ramas presentaron mayor contenido de fenoles que la corteza analizada por los autores mencionados, en cuanto a las hojas, los resultados de Salazar et al. (2008) son superiores. Almeida et al. (2008) determinaron el CFT de extractos hidroalcohólicos de hojas de *J. regia*, obteniendo como resultado 270 mg EAG/g extracto. En el presente estudio, el extracto de etanol de las hojas de *J. microcarpa* presentó mayor contenido de fenoles (286.9 mg EAG/g muestra). De la Rosa et al. (2014), mostraron las diferencias obtenidas de fenoles totales en extractos acetónicos provenientes de la cáscara dura de la nuez *C. illinoensis* de diferentes áreas geográficas; norte, centro y sur del estado de Chihuahua; 27.73 mg EAG/g muestra, 34.50 mg EAG/g muestra y 54.29 mg EAG/g, respectivamente. En el presente estudio, los extractos de frutos de *J. microcarpa* en etanol y acuoso, así como el tejido del fruto, presentan valores muy elevados en relación a los reportados por los autores, para el fruto de *C. illinoensis* de Chihuahua. Li et al. (2006) reportaron el contenido de ácidos fenólicos libres de *J. regia* y *J. ailanthifolia* con resultados de 10.42 y 2.48 mg

EAG/g de muestra, respectivamente, los cuales en general, son inferiores a los reportados en este estudio para las tres especies.

Cuadro 1. Contenido total de fenoles y capacidad antioxidante

| Muestra | CTF | | Actividad antioxidante | | | |
|---------|--------------------|---------------|------------------------|----------------|---------------------------|--------------|
| | (mg EAG/g muestra) | | DPPH (%) | | FRAP(μ gFeII/100 mg) | |
| JmiEHE | 286.9 | \pm 3.78c | 89.67 | \pm 1.05a | 69.43 | \pm 5.67a |
| JmiEFE | 308.5 | \pm 7.88b | 87.03 | \pm 6.16ab | 67.37 | \pm 8.28a |
| JmiERE | 321.2 | \pm 4.88b | 77.74 | \pm 6.97abc | 43.7 | \pm 4.43c |
| JmiEHA | 216.37 | \pm 5.33e | 75.13 | \pm 2.05bcd | 59.88 | \pm 0.51b |
| JmoEHE | 136.1 | \pm 5.41gh | 74.35 | \pm 3.86bcd | 36.09 | \pm 2.30de |
| CoEHE | 233.7 | \pm 3.98de | 65.84 | \pm 2.04cde | 31.41 | \pm 1.46ef |
| CoERE | 247.5 | \pm 11.92d | 64.47 | \pm 3.59de | 31.02 | \pm 1.31ef |
| JmoEHA | 224.7 | \pm 6.89e | 57.49 | \pm 0.56ef | 28.6 | \pm 0.38ef |
| JmiERA | 191.4 | \pm 9.32f | 56.1 | \pm 13.87ef | 16.79 | \pm 0.56g |
| CoERA | 134.43 | \pm 1.64ghi | 54.66 | \pm 3.04ef | 11.81 | \pm 0.39gh |
| CoEHA | 185.38 | \pm 6.01f | 53.26 | \pm 5.79efg | 26.48 | \pm 1.26f |
| JmoERE | 359.7 | \pm 7.8a | 50.11 | \pm 4.39fgh | 42.70 | \pm 5.78cd |
| JmiH | 228.8 | \pm 8.04de | 49.93 | \pm 2.35fgh | 8.67 | \pm 0.38hi |
| JmoH | 181.4 | \pm 5.42f | 48.56 | \pm 1.15fgh | 5.94 | \pm 1.26hi |
| JmiEFA | 272.8 | \pm 5.62c | 48.17 | \pm 5.28fgh | 42.33 | \pm 2.60cd |
| JmiF | 152.8 | \pm 1.18g | 46.82 | \pm 3.51fghi | 3.31 | \pm 0.12i |
| JmoR | 121.9 | \pm 5.4hij | 45.31 | \pm 7.22fghi | 1.37 | \pm 0.47i |
| JmiR | 131.2 | \pm 3.48hij | 40.63 | \pm 0.63ghij | 2.07 | \pm 0.17i |
| CoH | 114 | \pm 1.74j | 37.38 | \pm 3.79hij | 1.73 | \pm 0.17i |
| CoR | 114.2 | \pm 1.43ij | 34.68 | \pm 0.71ij | 1.32 | \pm 0.12i |
| JmoERA | 230.1 | \pm 13.17de | 29.27 | \pm 6.57i | 27.57 | \pm 0.31f |

Jmo: *J. mollis*; Jmi: *J. microcarpa*; Co: *C. ovata*; H: hojas; R: ramas; F: frutos; EHE: extracto hojas etanol; EHA: extracto hojas agua; ERE: extracto ramas etanol; ERA: extracto ramas agua; EFE: extracto fruto etanol; EFA: extracto fruto agua. Los datos representan los promedios \pm SD de tres determinaciones. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias estadísticas entre las especies de nogalillos ($p < 0.05$).

Actividad Antioxidante

Los resultados del ANVA de la capacidad antioxidante de los extractos y tejidos de nogalillos se muestran también en el Cuadro 1. Se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre extractos y tejidos. Los extractos de etanol de hojas, frutos y ramas de *Juglans microcarpa* presentaron la más alta inhibición de DPPH, con valores de 89.67%, 87.03% y 77.74%, respectivamente; y en el

ensayo por el método de FRAP se determinaron valores de actividad antioxidante de 69.43, 67.37 y 43.7 $\mu\text{gFell}/100\text{ mg}$, respectivamente. En cuanto a los tejidos de las tres especies los resultados de actividad antioxidante, por los dos métodos, fueron inferiores a los de los extractos: para DPPH inferiores al 50% y para FRAP inferiores a 10 $\mu\text{gFell}/100\text{ mg}$.

El resultado de actividad antioxidante por el método DPPH (Cuadro 1) obtenido en esta investigación para el fruto de *J. microcarpa* es similar al reportado por Gu et al. (2015) en harina de nogal desengrasada proveniente de la extracción de aceite de nuez de *J. sigillata* (87.79%). Salazar et al. (2008) reportaron actividad antioxidante por DPPH del extracto de metanol de hojas de *J. mollis* obteniendo un porcentaje de inhibición de 77.6%, resultado similar al obtenido en la presente investigación en el extracto de etanol de las hojas de *J. mollis*. Robbins et al. (2015) reportaron resultados por el método FRAP para cultivo de *C. illinoensis* cv Georgia, en un rango de 14.7 EqFell/100g nuez a 20.7 EqFell/100g nuez, los valores son similares a los reportados en el presente trabajo por el mismo método, para los extractos acuosos de: ramas y hojas de *C. ovata*, así como para las ramas de *J. microcarpa* y hojas de *J. mollis*, cuyos valores se encuentran en el rango de 11.81 a 28.6 $\mu\text{gFell}/100\text{ mg}$ muestra.

Las diferencias de los resultados obtenidos en las mismas especie y en especies diferentes de nogalillos, podría atribuirse a los diferentes sitios en los cuales se desarrollaron, así como a la época de colecta de las plantas y a los solventes utilizados en la extracción (Kang et al., 2003; Robbins et al., 2015; Mehrabian et al., 2000).

Composición Química de Extractos

Los resultados de la composición química de extractos de nogalillos analizados por GC-MS se presentan en los cuadros del 2 al 7. Se muestra información de tiempo de retención (RT), nombre del compuesto, fórmula molecular, peso molecular (MW) y concentración (% área).

Juglans mollis

Para los extractos de etanol de *J. mollis*, se identificaron 11 y 13 compuestos en hojas y ramas, respectivamente (Cuadro 2). En las hojas, los tres compuestos mayoritarios y en orden de abundancia fueron: hexilenglicol (Figura 10), un polioliol con actividad antifúngica (Kinnunen y Koskela, 1991); ácido hexanedioico, éster dioctílico y ácido hexanedioico, éster etílico, ambos de naturaleza éster de ácido graso, con actividades antifúngica, antioxidante, nematocida y antibacterial (Agoramoorthy et al., 2007; Rajeswari et al., 2012). En el extracto de ramas en etanol (Cuadro 2), los compuestos mayoritarios fueron: D-Glucosa, 4-O- α -D-glucopiranosilo- (Figura 11) de naturaleza carbazona reportado como antioxidante (Thanh y Hoai, 2012), seguido del hexilenglicol y juglona, compuesto derivado de la naftalina, reportado como antimicrobial y antioxidante (Clark et al., 1990; Chobot y Hadacek, 2009)

Cuadro 2. Compuestos químicos identificados en extracto de hojas y ramas en etanol de *Juglans mollis*

| No | RT (min) | Compuestos | Fórmula molecular | MW | Área (%) |
|--------------|----------|-----------------------|--|-----|----------|
| Hojas | | | | | |
| 1 | 6.02 | Hexilen glicol | C ₆ H ₁₄ O ₂ | 118 | 25.80 |
| 2 | 8.31 | 2-hydroxi-Propanamida | C ₃ H ₇ NO ₂ | 89 | 2.22 |
| 3 | 12.20 | 2-Nonanol | C ₉ H ₂₀ O | 144 | 1.55 |
| 4 | 16.97 | Ácido hidrastinínico | C ₁₁ H ₉ NO ₆ | 251 | 0.97 |

| | | | | | |
|--------------|-------|--|----------------------|-----|-------|
| 5 | 20.90 | 1-Metoxi-3-(2-hidroietil)nonano | $C_{12}H_{26}O_2$ | 202 | 3.21 |
| 6 | 21.90 | 2,4-Bis(hidroxilamino)-5-nitropirimidina | $C_4H_5N_5O_4$ | 187 | 2.66 |
| 7 | 22.29 | Ácido hexanedioico, éster etílico | $C_{18}H_{36}O_2$ | 284 | 11.19 |
| 8 | 23.43 | Pterin-6-ácido carboxílico | $C_7H_5N_5O_3$ | 207 | 3.95 |
| 9 | 23.81 | Metilo(Z)-5,11,14,17-eicosatetraenoato | $C_{21}H_{34}O_2$ | 318 | 7.55 |
| 10 | 24.08 | Bencenoetanamina, 2,5-difluoro-.β.,3,4-trihidroxi-N-metil- | $C_9H_{11}F_2NO_3$ | 219 | 4.48 |
| 11 | 25.86 | Ácido hexanedioico, éster dioctílico | $C_{22}H_{42}O_4$ | 370 | 16.46 |
| Ramas | | | | | |
| 1 | 6.01 | Hexilenglicol | $C_6H_{14}O_2$ | 118 | 14.76 |
| 2 | 8.30 | 2-hidroxi-Propanamida | $C_3H_7NO_2$ | 89 | 0.99 |
| 3 | 15.53 | 4-O-.α.-D-glucopiranosilo- D-Glucosa | $C_{12}H_{22}O_{11}$ | 342 | 18.15 |
| 4 | 16.04 | 4-O-.β.-D-galactopiranosilo-.β.-D-Glucopiranososa | $C_{12}H_{22}O_{11}$ | 342 | 7.24 |
| 5 | 16.45 | Juglona | $C_{10}H_6O_3$ | 174 | 9.50 |
| 6 | 17.29 | 3H-1,4-Benzodiazepin-2,5(1H,4H)-diona | $C_9H_8N_2O_2$ | 176 | 4.84 |
| 7 | 18.35 | Bencenometanol, 2-(2-aminopropoxi)-3-metil- | $C_{11}H_{17}NO_2$ | 195 | 1.17 |
| 8 | 21.90 | Bencenoetanamina, 2,5-difluoro-.β.,3,4-trihidroxi-N-metil- | $C_9H_{11}F_2NO_3$ | 219 | 0.78 |
| 9 | 22.23 | Ácido hexadecanoico, éster etílico | $C_{18}H_{36}O_2$ | 284 | 1.97 |
| 10 | 23.79 | Ácido linoleico, éster etílico | $C_{20}H_{36}O_2$ | 308 | 2.85 |
| 11 | 25.81 | Pterin-6-ácido carboxílico | $C_7H_5N_5O_3$ | 207 | 4.93 |
| 12 | 26.16 | 2-Hexadecanol | $C_{16}H_{34}O$ | 242 | 3.90 |
| 13 | 26.93 | Fenol, 2,2'-metilenobis[6-(1,1-dimetil etilo)-4-etil- | $C_{25}H_{36}N_5O_2$ | 368 | 7.91 |

RT: Tiempo de retención; MW: Peso molecular

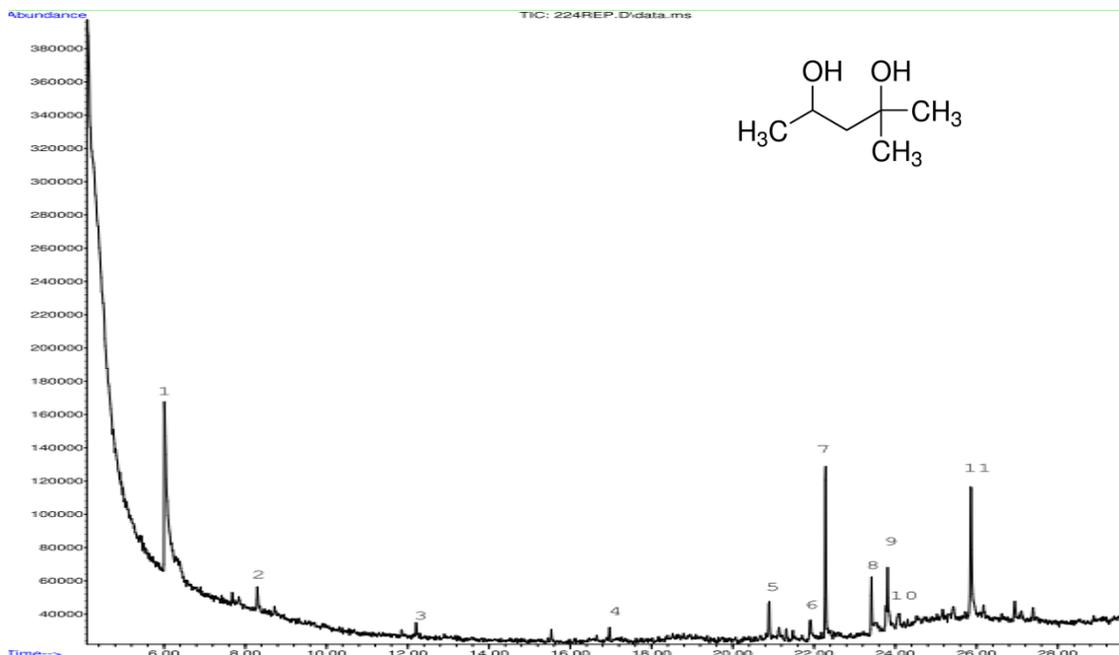


Figura 10. GC-MS. Cromatografía de extracto de hojas en etanol de *Juglans mollis* y estructura de Hexilenglicol.

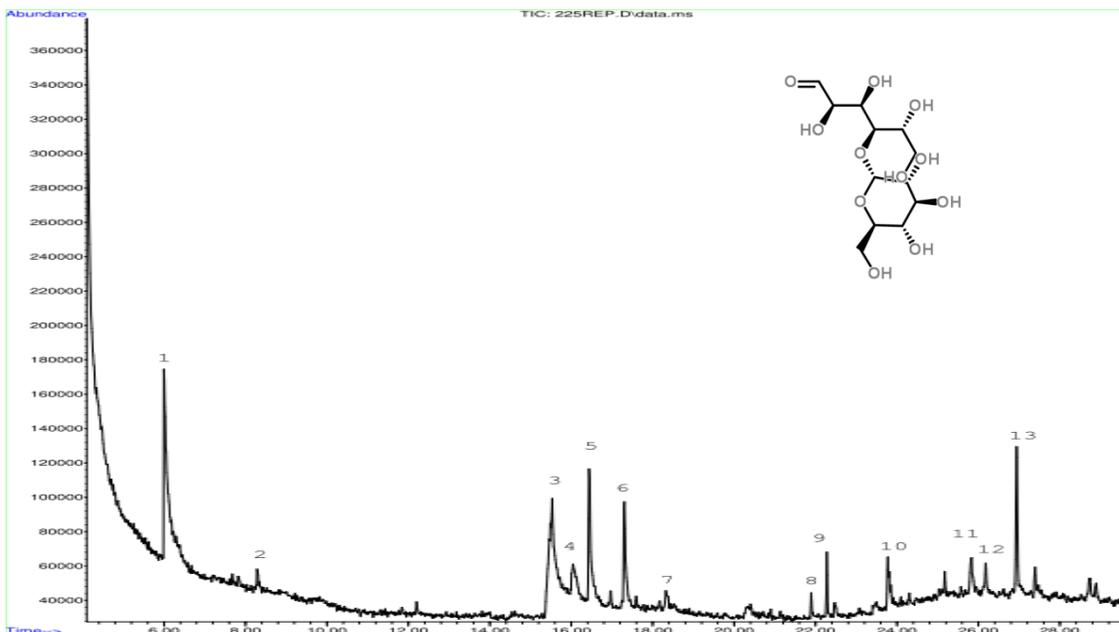


Figura 11. GC-MS. Cromatografía de extracto de ramas en etanol de *Juglans mollis* y estructura de 4-O-α-D-glucopiranosilo- D-Glucosa

En los extractos acuosos de hojas y ramas de *J. mollis*, se identificaron 2 y 4 compuestos, respectivamente (Cuadro 3). Para el extracto de las hojas, los

compuestos mayoritarios fueron: bencenoetanamina, 2-fluoro, de naturaleza benzamina, y con actividad anticancerígena (Muthuraman et al., 2012) y metoxi-fenil-oxima-, de naturaleza oxima, reportado como antioxidante y antimicrobial (Al-Tameme et al., 2015). En el extracto de las ramas, los compuestos identificados fueron: n-hexilmetilamina (Figura 12) de naturaleza trialimida, del cual no se ha reportado actividad biológica, 2- propanamina de clase amina, sin actividad biológica reportada, y 2-Amino-1-(o-hidroxifenil) propano, de naturaleza benzamina, reportado como antibacterial y antifúngico (Mabkhot et al., 2014).

Cuadro 3. Compuestos químicos identificados en extracto de hojas y ramas en agua de *Juglans mollis*

| No | RT (min) | Compuestos | Fórmula molecular | MW | Área (%) |
|--------------|----------|------------------------------------|-------------------|-----|----------|
| Hojas | | | | | |
| 1 | 4.31 | Bencenoetanamina, 2-fluoro | $C_9H_{12}FNO_2$ | 185 | |
| 2 | 6.08 | Metoxi-fenil-oxima | $C_8H_9NO_2$ | 151 | |
| Ramas | | | | | |
| 1 | 5.87 | 2-Amino-1-(o-hidroxifenil) propano | $C_9H_{13}NO$ | 151 | 9.40 |
| 2 | 11.85 | 2- propanamina | C_3H_9N | 59 | 11.87 |
| 3 | 14.82 | N-Metiltaurina | $C_3H_9NO_3S$ | 139 | 4.80 |
| 4 | 25.01 | N- Hexilmetilamina | $C_7H_{17}N$ | 115 | 64.10 |

RT: Tiempo de retención; MW: Peso molecular

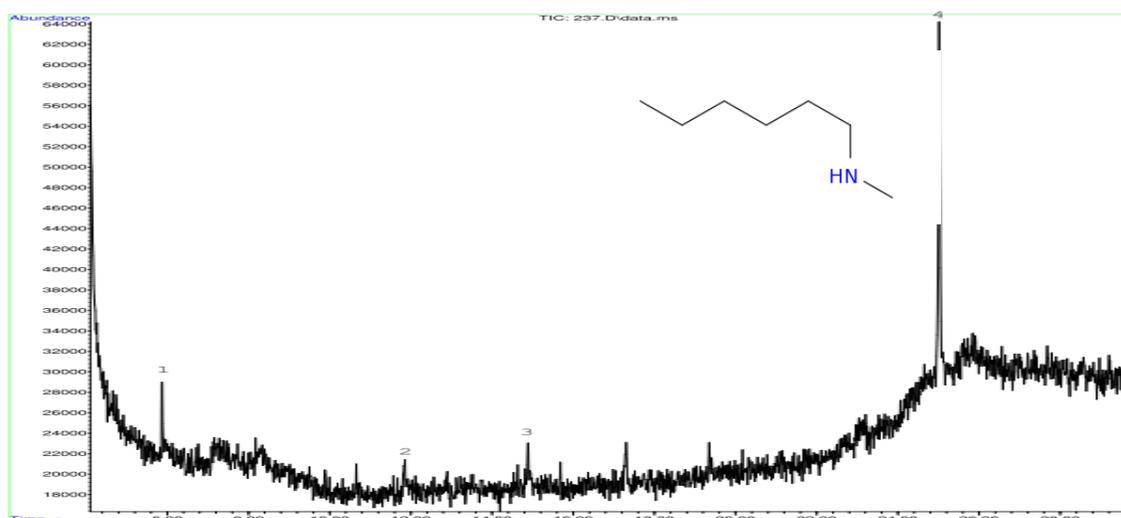


Figura 12. GC-MS. Cromatografía de extracto de ramas en agua de *Juglans mollis* y estructura de N-Hexilmetilamina

Juglans microcarpa

Los compuestos identificados en los extractos de etanol de las hojas y ramas de *J. microcarpa* fueron 9 y 12, respectivamente (Cuadro 4). En el extracto de las hojas, los compuestos mayoritarios fueron: hexilenglicol, acetato de vitamina E (Figura 13), un polifenol con actividad antioxidante (Berton et al., 1998) y el Fitol, un diterpeno reportado con actividad antibacterial (Inoue et al., 2005). En el extracto de ramas, los compuestos mayoritarios fueron: hexilenglicol; 2,2,4-Trimetil-3-(3,8,12,16-tetrametil-heptadeca-3,7,11,15-tetraenil)-ciclohexanol (Figura14) un poliol, del cual no se ha reportado actividad y Linoleato de etilo de naturaleza éster de ácido graso reportado como antibacterial y antifúngico (Agoramoorthy et al., 2007; Rajeswari et al., 2012).

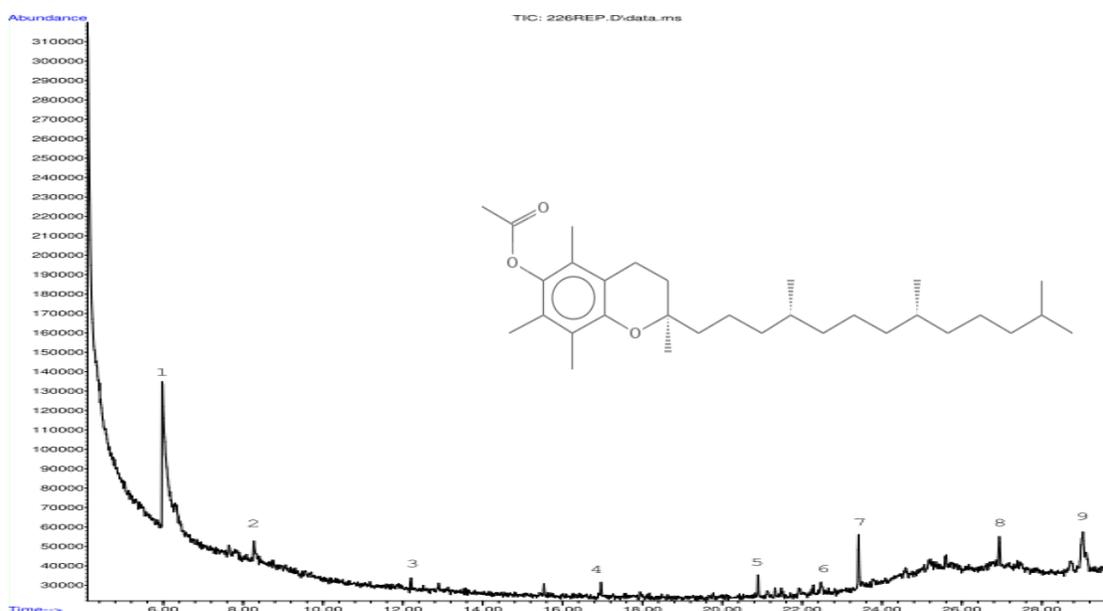


Figura 13. GC-MS. Cromatografía de extracto de hojas en etanol de *Juglans microcarpa* y estructura de Vitamina E acetato.

Cuadro 4. Compuestos químicos identificados en extracto de hojas en etanol de *Juglans microcarpa*

| No | RT (min) | Compuestos | Fórmula molecular | MW | Área (%) |
|--------------|----------|---|---|-----|----------|
| Hojas | | | | | |
| 1 | 5.99 | Hexilenglicol | C ₆ H ₁₄ O ₂ | 118 | 49.98 |
| 2 | 8.27 | 2-hidroxi-Propanamida | C ₃ H ₇ NO ₂ | 89 | 2.37 |
| 3 | 12.21 | 2-Formilhistamina | C ₆ H ₉ N ₃ O | 139 | 1.67 |
| 4 | 16.96 | Ácido hidrastinínico | C ₁₁ H ₉ NO ₆ | 251 | 1.25 |
| 5 | 20.90 | Bencenoetanamina, 2-fluoro-.β.,3-dihidroxi-N-metil- | C ₉ H ₁₁ F ₂ NO ₃ | 219 | 2.04 |
| 6 | 22.49 | Bencenoetanamina, 2,5-difluoro-.β.,3,4-trihidroxi-N-metil- | C ₉ H ₁₁ F ₂ NO ₃ | 219 | 1.77 |
| 7 | 23.40 | Fitol | C ₂₀ H ₄₀ O | 296 | 4.71 |
| 8 | 26.93 | Fenol, 2,2'-metileno bis[6-(1,1-dimetiletil)-4-etil- | C ₂₅ H ₃₆ O ₂ | 368 | 3.25 |
| 9 | 29.03 | Acetato de Vitamina E | C ₃₁ H ₅₂ O ₃ | 472 | 13.55 |
| Ramas | | | | | |
| 1 | 5.99 | Hexilenglicol | C ₆ H ₁₄ O ₂ | 118 | 63.57 |
| 2 | 16.40 | Juglona | C ₁₀ H ₆ O ₃ | 174 | 1.04 |
| 3 | 18.06 | Viridiflorol | C ₁₅ H ₂₆ O | 222 | 1.55 |
| 4 | 18.38 | Spathulenol | C ₁₅ H ₂₄ O | 220 | 0.46 |
| 5 | 18.76 | 3,6,9,12-Tetraoxatetradecan-1-ol, 14-[4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenoxi]- | C ₂₄ H ₄₂ O ₆ | 426 | 0.71 |
| 6 | 20.86 | 14-Octadecenal | C ₁₈ H ₃₄ O | 266 | 0.45 |
| 7 | 21.85 | n-Ácido hexadecanoico | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | 256 | 1.06 |
| 8 | 22.25 | Ácido hexadecanoico, éster etílico | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | 284 | 3.01 |
| 9 | 23.43 | 13-Heptadecyn-1-ol | C ₁₇ H ₃₂ O | 252 | 1.24 |
| 10 | 23.75 | Linoleato de etilo | C ₂₀ H ₃₆ O ₂ | 308 | 4.31 |
| 11 | 25.72 | 2,2,4-Trimetil-3-(3,8,12,16-tetrametilheptadeca-3,7,11,15-tetraenil)-ciclohexanol | C ₃₀ H ₅₂ O | 426 | 4.45 |
| 12 | 26.52 | Estigmastan-3-ol, 5-cloro-, acetato, (3.β, 5.α.)- | C ₃₁ H ₅₃ ClO ₂ | 492 | 2.73 |

RT: Tiempo de retención; MW: Peso molecular

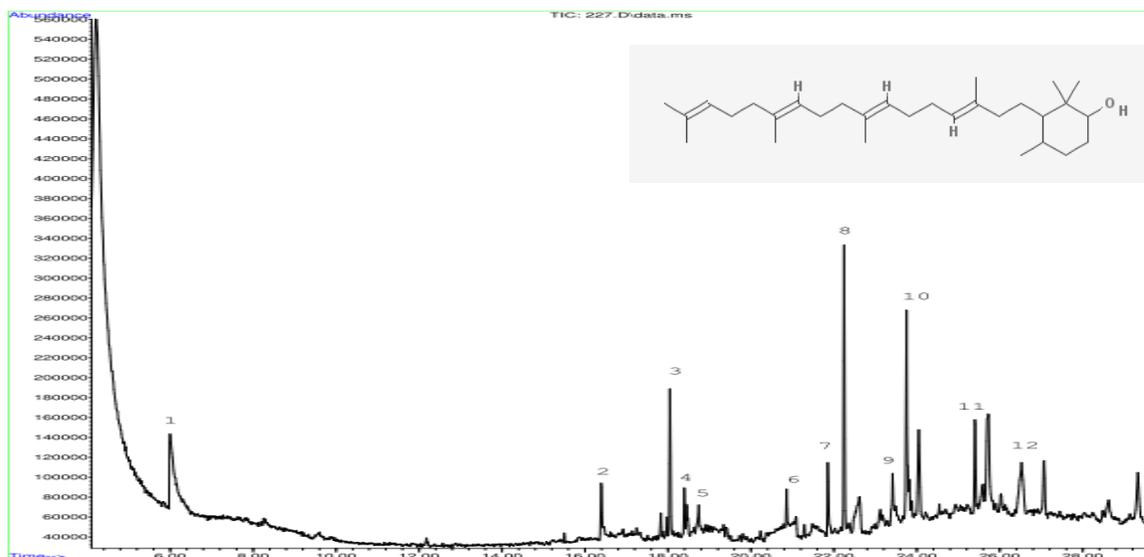


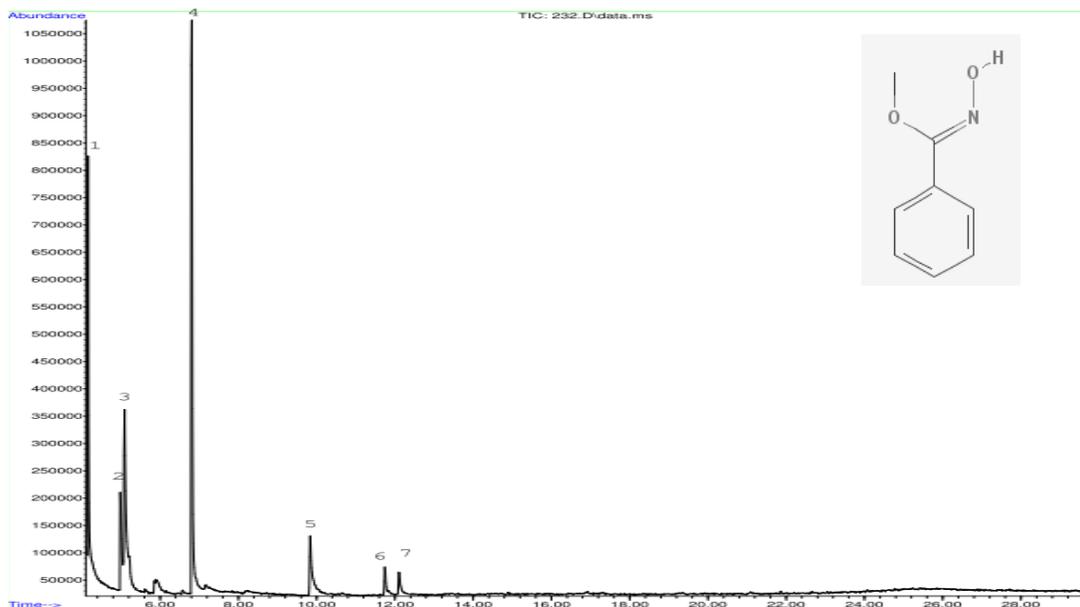
Figura 14. GC-MS. Cromatografía de extracto de ramas en etanol de *Juglans microcarpa* y estructura de 2,2,4-Trimetil-3-(3,8,12,16-tetrametil-heptadeca-3,7,11,15-tetraenil)-ciclohexanol

En los extractos de hojas y ramas de *J. microcarpa* en agua se identificaron 7 y 4 compuestos, respectivamente (Cuadro 5). En el extracto de las hojas, los compuestos mayoritarios fueron: metoxi-fenil-oxima-, compuesto también identificado en ramas; 2-Butanol, 3-metil-, de naturaleza alcohol reportado con actividad antimicrobial (Mitchell et al., 2010) y el Isoproturón, sustituto de urea reportado como herbicida (Badr y Elkington, 1982). Los compuestos mayoritarios identificados en el extracto de las ramas fueron: metoxi-fenil-oxima- (Figura 15); Bencenoetanamina, 2-fluoro- β .,3-dihidroxi-N-metil- y el 5-(2-Aminopropil)-2-metilo fenol (Figura 16), de naturaleza benzamina, reportado con actividad antibacterial y antifúngica (Vaishnavi et al., 2015).

Cuadro 5. Compuestos químicos identificados en extracto de hojas y ramas en agua de *Juglans microcarpa*

| No | RT (min) | Compuestos | Fórmula molecular | MW | Área (%) |
|--------------|----------|---|--|-----|----------|
| Hojas | | | | | |
| 1 | 4.16 | Propano, 2-cloro-2-nitro- | C ₃ H ₆ ClNO ₂ | 123 | 8.97 |
| 2 | 4.98 | 2,3-Butanodiol | C ₄ H ₁₀ O ₂ | 90 | 9.47 |
| 3 | 5.09 | 2-Butanol, 3-metil- | C ₅ H ₁₂ O | 88 | 27.25 |
| 4 | 6.81 | Oxima-, metoxi-fenil- | C ₈ H ₉ NO ₂ | 151 | 39.50 |
| 5 | 9.84 | Isoproturón | C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O | 206 | 10.33 |
| 6 | 11.74 | 3-(3-Carboxi-4-hidroxifenil)-D-alanina | C ₁₀ H ₁₁ NO ₅ | 225 | 1.78 |
| 7 | 12.10 | 4-Ácido etilbenzoico, 2-pentil etil éster | C ₁₄ H ₂₀ O ₂ | 220 | 2.69 |
| Ramas | | | | | |
| 1 | 6.01 | Oxima-, metoxi-fenil- | C ₈ H ₉ NO ₂ | 151 | 37.72 |
| 2 | 14.33 | Bencenoetanamina, 2-fluoro-.β.,3-dihidroxi-N-metil- | C ₉ H ₁₂ FNO ₂ | 185 | 17.19 |
| 3 | 14.90 | Octodrina | C ₈ H ₁₉ N | 129 | 7.07 |
| 4 | 18.26 | 5-(2-Aminopropil)-2-metilo fenol | C ₁₀ H ₁₅ NO | 165 | 11.38 |

RT: Tiempo de retención; MW: Peso molecular

**Figura 15.** GC-MS. Cromatografía de extracto de hojas en agua de *Juglans microcarpa* y estructura de Oxima-, metoxi-fenil-.

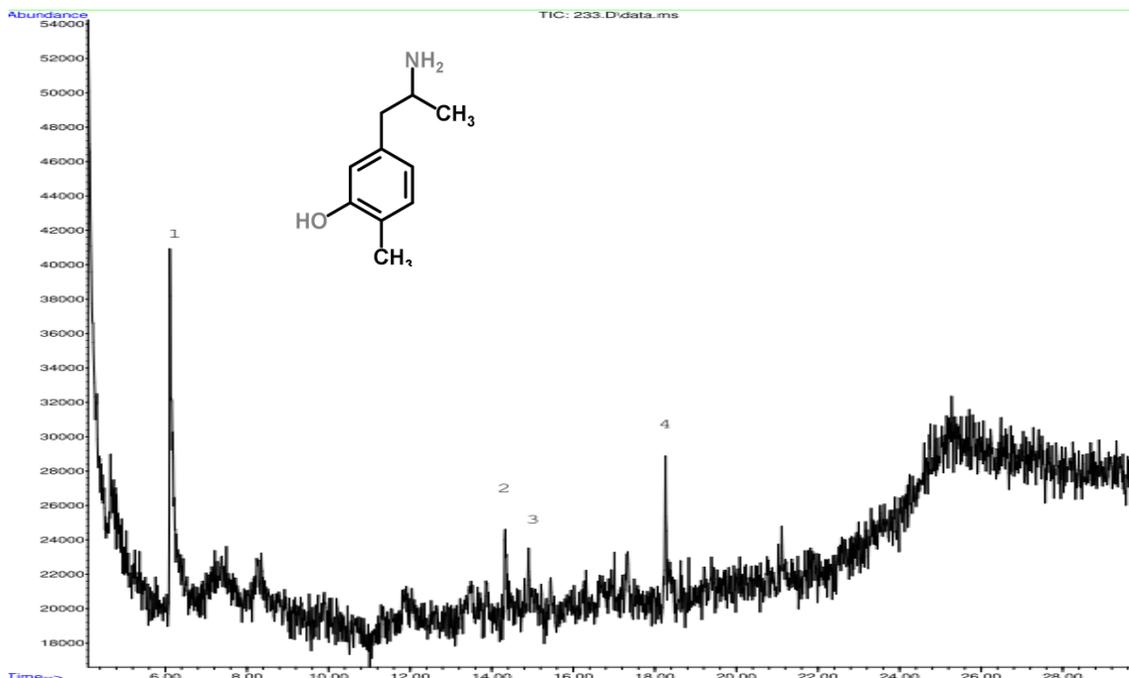


Figura 16. GC-MS. Cromatografía de extracto de ramas en agua de *Juglans microcarpa* y estructura de 5-(2-Aminopropil)-2-metilo fenol

Carya ovata

Los compuestos identificados en los extractos de etanol de hojas y ramas de *C. ovata* fueron 9 y 6, respectivamente (Cuadro 6). Los compuestos mayoritarios en el extracto de hojas fueron: Ácido linolénico, éster etílico (Figura 17), de naturaleza éster ácido graso, reportados como antibacterial y antifúngico (Agoramoorthy et al., 2007; Rajeswari et al., 2012); hexilenglicol y el acetato de Vitamina E. Para el extracto de las ramas, los compuestos identificados fueron: ácido 9,12-octadecadienoico, éster etílico (figura 18) de naturaleza éster de ácido graso; hexilenglicol y Oletato de etilo, ácido graso con actividad antibacterial y antifúngica (Agoramoorthy et al., 2007; Rajeswari et al., 2012).

Cuadro 6. Compuestos químicos identificados en extracto de hojas y ramas en etanol de *Carya ovata*

| No | RT (min) | Compuestos | Fórmula molecular | MW | Área (%) |
|--------------|----------|---|---|-----|----------|
| Hojas | | | | | |
| 1 | 6.02 | Hexilenglicol | C ₆ H ₁₄ O ₂ | 118 | 17.72 |
| 2 | 20.87 | 3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadeceno-1-ol | C ₂₀ H ₄₀ O | 296 | 8.74 |
| 3 | 21.09 | Imidazol, 2-amino-5-[(2-carboxi)vinilo]- | C ₆ H ₇ N ₃ O ₂ | 153 | 2.19 |
| 4 | 21.29 | 2(1H)-Naftalenona, octahidro-4a-metil-7-(1-metiletil)-(4a.α.,7.β.,8a.β.)- | C ₁₄ H ₂₄ O | 208 | 2.45 |
| 5 | 21.86 | N- Ácido hexadecanoico | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | 256 | 3.21 |
| 6 | 22.25 | Ácido hexadecanoico, éster etílico | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | 284 | 9.24 |
| 7 | 23.39 | Fitol | C ₂₀ H ₄₀ O | 296 | 6.28 |
| 8 | 23.79 | Ácido linolénico, éster etílico | C ₂₀ H ₃₄ O ₂ | 306 | 18.84 |
| 9 | 28.89 | Acetato de Vitamina E | C ₃₁ H ₅₂ O ₃ | 473 | 15.97 |
| Ramas | | | | | |
| 1 | 6.02 | Hexilenglicol | C ₆ H ₁₄ O ₂ | 118 | 30.62 |
| 2 | 16.39 | Juglona | C ₁₀ H ₆ O ₃ | 174 | 2.79 |
| 3 | 16.45 | 2-Trifluoro aceto dodecano | C ₁₇ H ₃₁ F ₃ O ₂ | 324 | 4.24 |
| 4 | 22.25 | Ácido hexadecanoico, éster etílico | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | 284 | 10.33 |
| 5 | 23.75 | Ácido 9,12-Octadecadienoico, éster etílico | C ₂₀ H ₃₆ O ₂ | 308 | 31.86 |
| 6 | 23.83 | Oleato de etilo | C ₂₀ H ₃₈ O ₂ | 310 | 11.32 |

RT: Tiempo de retención; MW: Peso molecular

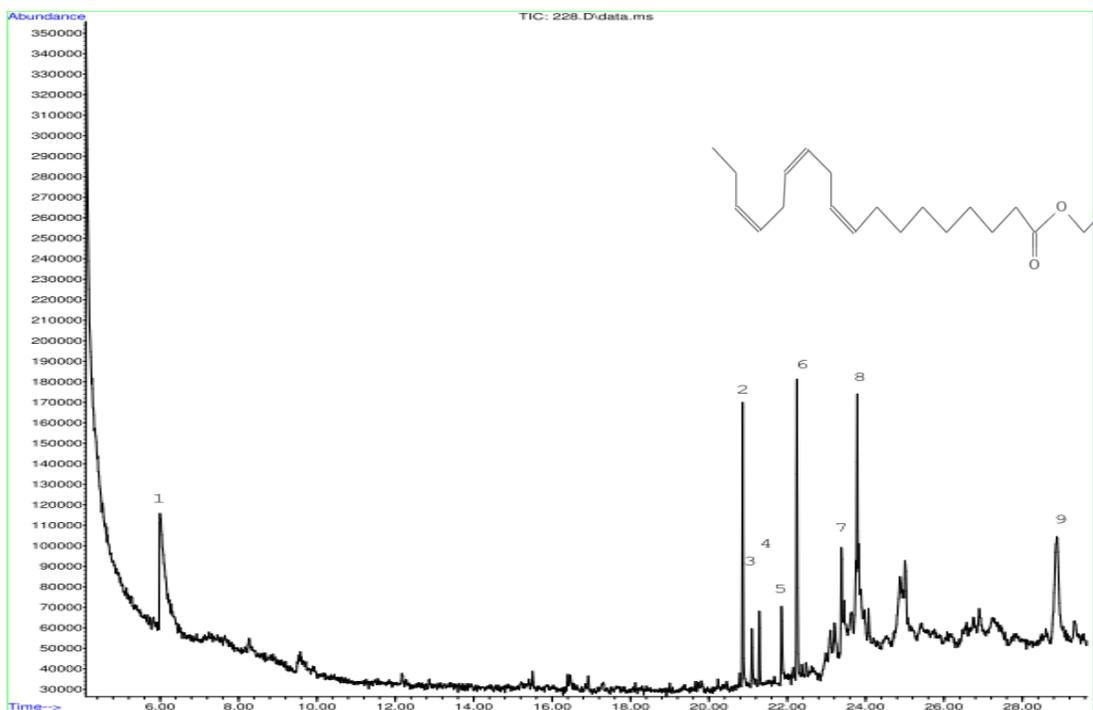


Figura 17. GC-MS. Cromatografía de extracto de hojas en etanol de *Carya ovata* y estructura de Ácido linolénico, éster etílico

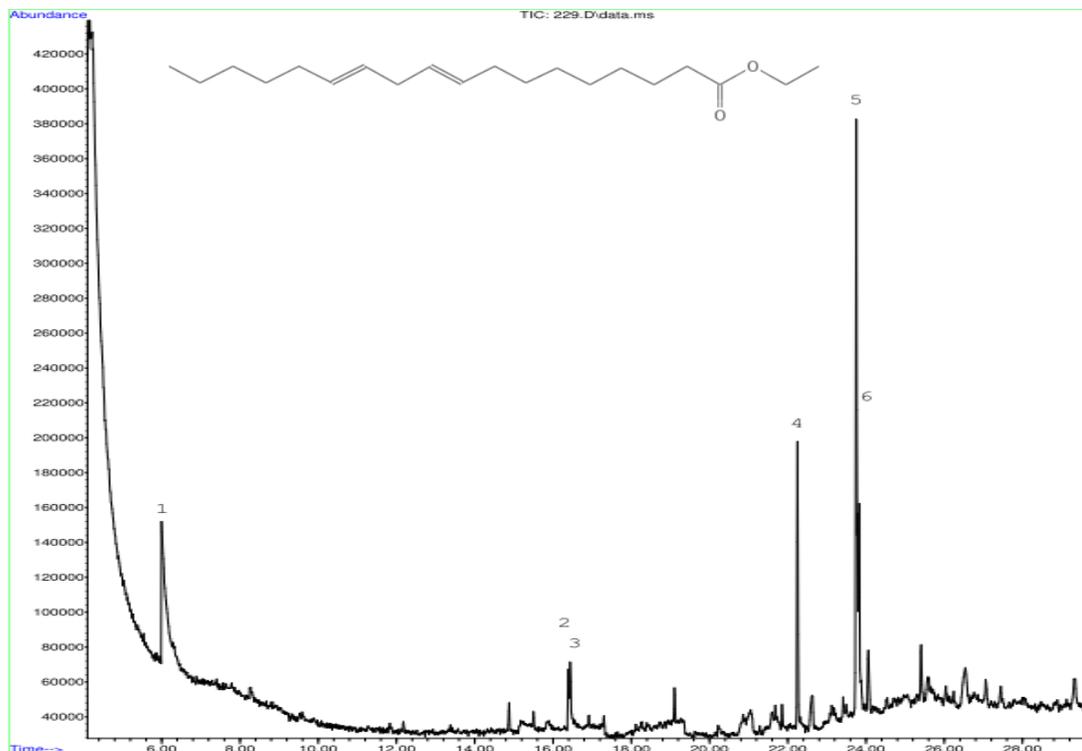


Figura 18. GC-MS. Cromatografía de extracto de ramas en etanol de *Carya ovata* y estructura de Ácido 9,12-Octadecadienoico, éster etílico.

En los extractos de hojas y ramas de *C. ovata* en agua se identificaron 4 y 7, respectivamente (Cuadro 7). Los compuestos mayoritarios identificados en el extracto de hojas fueron: [R,R]-2,3-butanodiol (Figura 19), de naturaleza alcohol, con actividad antimicrobial (Mitchell et al., 2010); metoxi-fenil-Oxima-, y propano, 2-cloro-2-nitro-, actividad no reportada. En el extracto de las ramas, los compuestos mayoritarios fueron: 2,3- Butanodiol, de naturaleza alcohol con actividad antimicrobiana (Mitchell et al., 2010), isoprotúron (Figura 20) y la imipramina, una dibenzazepina con actividades antioxidante (Réus et al., 2010).

Cuadro 7. Compuestos químicos identificados en extractos de hojas y ramas en agua de *Carya ovata*

| No | RT (min) | Compuestos | Fórmula molecular | MW | Área (%) |
|--------------|----------|--|--------------------|-----|----------|
| Hojas | | | | | |
| 1 | 4.51 | Propano, 2-cloro-2-nitro- | $C_3H_6ClNO_2$ | 123 | 12.44 |
| 2 | 5.38 | [R,R]-2,3-Butanodiol | $C_4H_{10}O_2$ | 90 | 42.91 |
| 3 | 6.96 | Oxima-, metoxi-fenil- | $C_8H_9NO_2$ | 151 | 24.86 |
| 4 | 12.13 | 3-(3-Carboxi-4-hidroxifenil)-D-alanina | $C_{10}H_{11}NO_5$ | 225 | 3.59 |
| Ramas | | | | | |
| 1 | 4.64 | 2,3-Butanodiol | $C_4H_{10}O_2$ | 90 | 49.29 |
| 2 | 6.13 | 2-propoxi-etilamina | $C_5H_{13}NO$ | 103 | 3.72 |
| 3 | 6.61 | Oxima-, metoxi-fenil- | $C_8H_9NO_2$ | 151 | 6.90 |
| 4 | 6.67 | 4-Cloro-N-metilpiridina hidrocioruro | $C_6H_{12}ClN$ | 133 | 6.01 |
| 5 | 9.76 | Isoproturón | $C_{12}H_{18}N_2O$ | 206 | 22.47 |
| 6 | 14.35 | 2,6-dimethoxi-fenol | $C_8H_{10}O_3$ | 154 | 1.85 |
| 7 | 14.43 | Imipramina | $C_{19}H_{24}N_2$ | 280 | 7.79 |

RT: Tiempo de retención; MW: Peso molecular

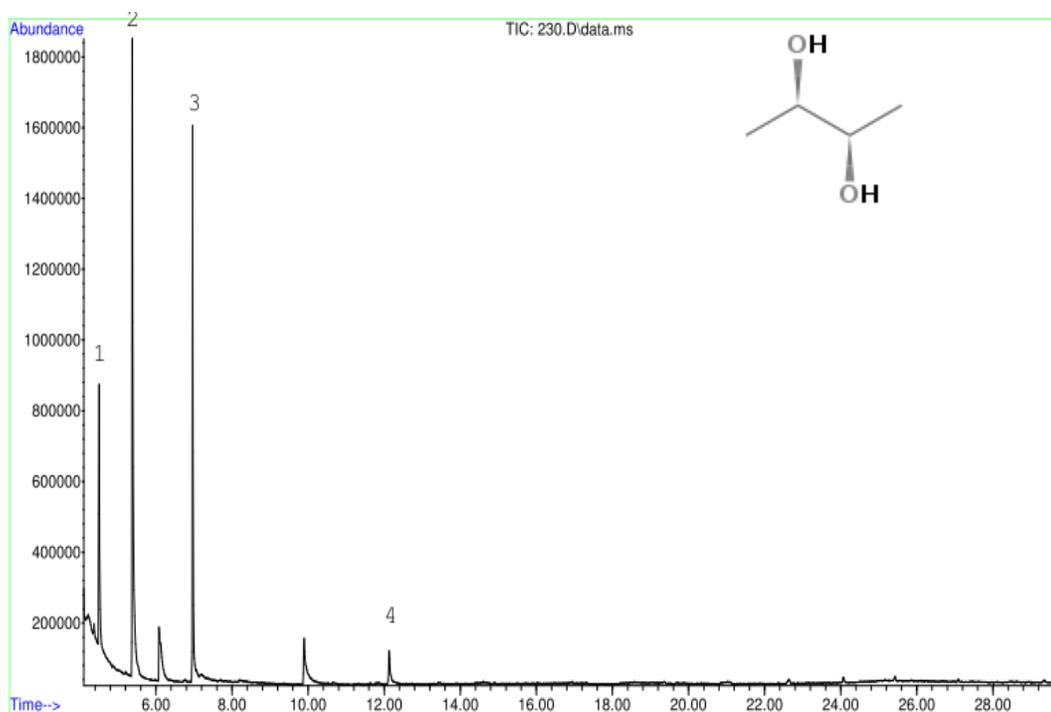


Figura 19. GC-MS. Cromatografía de extracto de hojas en agua de *Carya ovata* y estructura de [R,R]-2,3-Butanodiol.

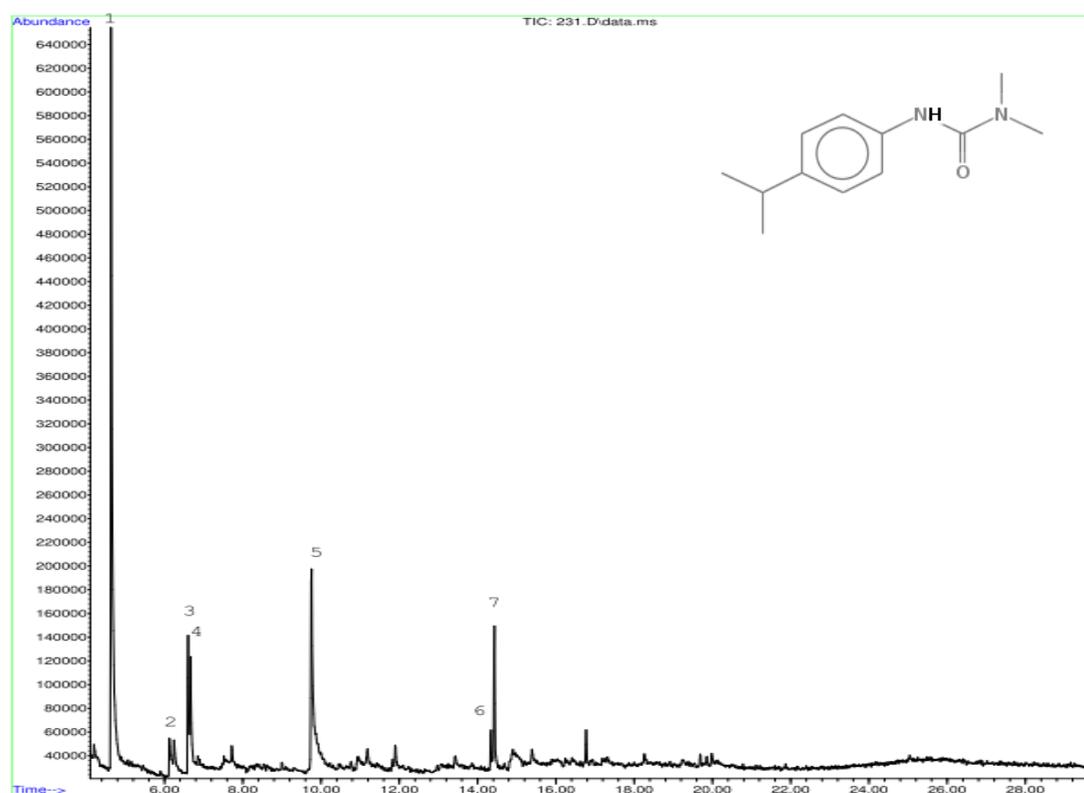


Figura 20. GC-MS. Cromatografía de extracto de ramas en agua de *Carya ovata* y estructura de Isoproturón.

Actividad Antifúngica de Extractos

Identificación de patógenos

Los resultados de la identificación por medio de amplificación por PCR, mostraron que hubo homología del 97% con *F. oxysporum* (1029 pb) con clave MF663655.1; y con *A. alternata* la homología fue del 95% (786 pb) con clave MG551266.1, de acuerdo al Genbank (Figura 21).

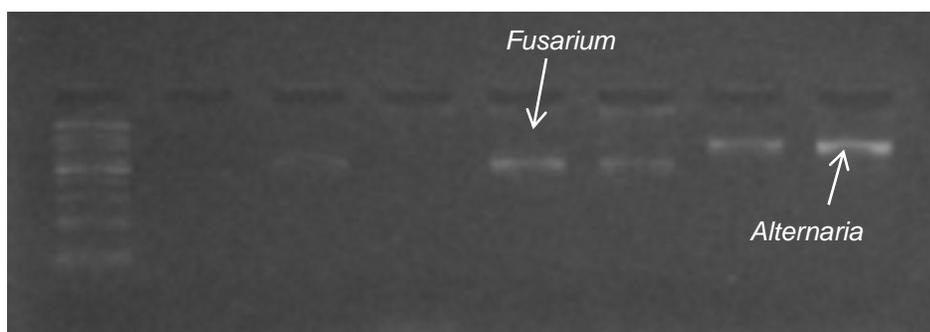


Figura 21. Identificación de *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*, mediante PCR en gel de agarosa al 2%.

Efecto antifúngico de los extractos de nogalillos contra *Fusarium oxysporum*

El ANOVA mostró que los extractos de etanol de *Juglans mollis*, *Juglans microcarpa* y *Carya ovata* presentaron actividad biológica altamente significativa ($p < 0.05$) contra *Fusarium oxysporum* (Figuras 22, 23 y 24, respectivamente), en comparación con los extractos acuosos. *J. mollis*: Los extractos de frutos y ramas a 5000 mg/L de *J. mollis* presentaron las más altas ($p < 0.05$) inhibiciones con 86.45% y 85.65%, respectivamente; seguidos del extracto de las hojas de *J. mollis* a 5000 mg/L, con 76.38 % de inhibición micelial (Cuadro 8). *J. microcarpa*: El extracto de etanol de las ramas de *J. microcarpa* a 5000 mg/L presentó la más alta ($p < 0.05$) inhibición con 87.19%, seguido de los extractos de etanol de hojas a 5000 mg/L y ramas a 4000 mg/L con 72.61% y 71.65%, respectivamente (Cuadro 9). *C. ovata*: El extracto de etanol de las ramas de *C. ovata* a 5000 mg/L presentó la más alta inhibición ($p < 0.05$) de *F. oxysporum* a las 168 h de incubación, con 85.38%, seguido de los extractos de etanol de las

ramas a 4000 mg/L y de las hojas a 5000 mg/L, con 68.76% y 67.13%, respectivamente (Cuadro 10). Es importante mencionar que en esta investigación se obtuvieron dentro de las más altas inhibiciones las de los extractos de las ramas en etanol (similares a las de las hojas) en *J. mollis* y en *J. microcarpa* y *C. ovata*, las ramas presentaron la más alta inhibición, estadísticamente más alta que la de las hojas contra *F. oxysporum*. Este resultado es muy interesante por la aplicación que se haga de los extractos de nogalillos.

Se observa que los mayores porcentajes de inhibición son dependientes de las más altas concentraciones (Jasso de Rodríguez et al., 2017). Los efectos de inhibición que los extractos de etanol de los nogalillos ejercen sobre *F. oxysporum* pueden ser atribuidos a los compuestos químicos mayoritarios, identificados en los extractos de etanol, principalmente el hexilenglicol, que se presentó tanto en hojas como en ramas de las tres especies, además se pueden atribuir a los elevados contenidos de fenoles cuantificados, así como a la actividad antioxidante. Estos resultados concuerdan con los reportados por Oliveira et al. (2008); Salazar et al. (2008); Osorio et al. (2010) y Castillo et al. (2010), quienes atribuyeron la actividad antifúngica de los géneros *Juglans* y *Carya* a la presencia de flavonoides y polifenoles.

También tomando en cuenta que se trata de un extracto crudo con una elevada cantidad de compuestos en su composición, podemos atribuir los efectos totales de los extractos a la sinergia promovida por el conjunto de compuestos que integran los extractos (Jasso de Rodríguez et al., 2015).

Cuadro 8. Valores medios de porcentaje de inhibición de *Fusarium oxysporum*, evaluado con extractos de *Juglans mollis*.

| Tratamientos mg/L | Tiempo (h) | | | |
|----------------------|------------|------------|-----------|------------|
| | 24 | 72 | 120 | 168 |
| JmoEFE5000 | 98.68 a | 64.37 b | 87.25 a | 86.45 a |
| JmoERE5000 | 99.81 a | 88.13 a | 84.41 ab | 85.65 a |
| JmoEHE5000 | 91.48 ab | 73.01 b | 79.28 b | 76.38 b |
| JmoEFE4000 | 76.47 bc | 65.65 b | 77.35 b | 75.21 bc |
| JmoERE4000 | 74.23 bcd | 72.37 b | 67.06 c | 66.75 cd |
| JmoEFE3000 | 65.44 cde | 49.08 d | 65.05 c | 61.59 d |
| JmoEHE4000 | 74.86 bcd | 62.13 bc | 66.43 c | 61.4 d |
| JmoERE3000 | 48.25 e | 51.8 cd | 45.42 d | 46.71 e |
| JmoEFE2000 | 17.12 fg | 50.97 cd | 41.72 de | 42.25 ef |
| JmoEHE3000 | 54.54 de | 46.28 de | 36.04 ef | 35.13 fg |
| JmoERE2000 | 24.37 f | 36.51 ef | 30.16 fg | 26.9 gh |
| JmoEFA5000 | -18.49 hij | 28.32 fghi | 24.73 ghi | 24.27 hi |
| JmoEFE1000 | -8.88 hij | 29.65 fgh | 24.81 ghi | 24.2 hi |
| JmoEFA2000 | -7.81 hij | 14.61 jk | 21.57 hij | 23.71 hi |
| JmoEFA4000 | -24.98 ij | 26.57 fghi | 25.87 gh | 23.48 hij |
| JmoEFA3000 | -4.65 ghi | 19.82 hijk | 21.89 hij | 23.16 hijk |

Jmo: *J. mollis*; EHE: extracto hojas etanol; ERE: extracto ramas etanol; EFE: extracto frutos etanol; EFA: extracto frutos agua. Los valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales ($p < 0.05$). Los valores menores a 20% no se incluyeron.

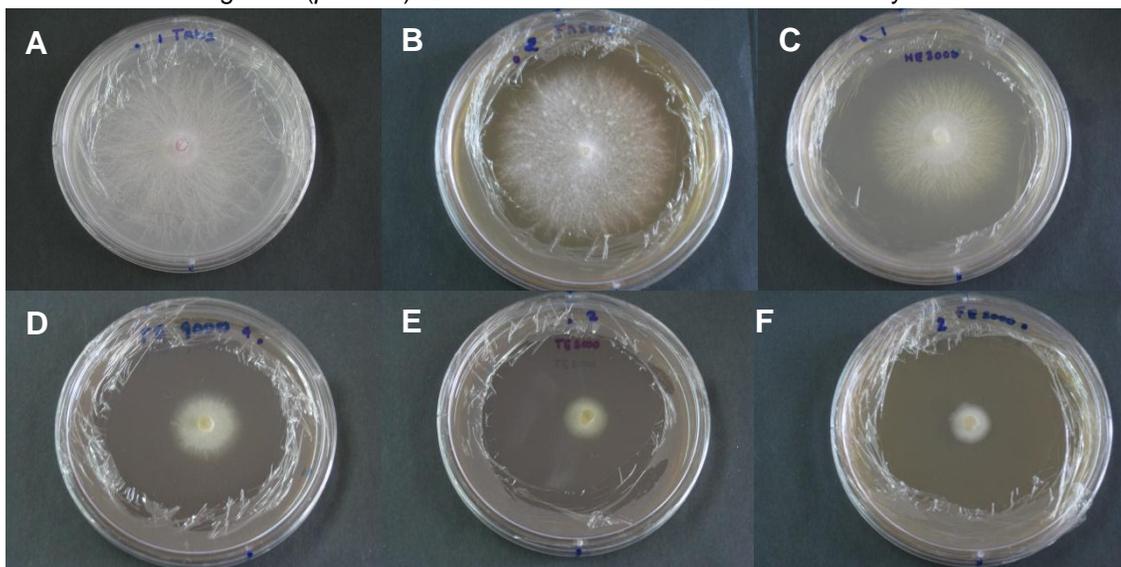


Figura 22. Efecto de extractos de *Juglans mollis* sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* a 168 horas. A: Testigo absoluto; B: Frutos agua 5000 mg/L; C: Hojas etanol 3000 mg/L; D: Ramas etanol 4000 mg/L; E: Ramas etanol 5000 mg/L; F: Frutos etanol 5000 mg/L.

Cuadro 9. Valores medios de porcentaje de inhibición de *Fusarium oxysporum*, evaluado con extractos de *Juglans microcarpa*

| Tratamientos mg/L | Tiempo (h) | | | |
|----------------------|------------|----------|----------|-----------|
| | 24 | 72 | 120 | 168 |
| JmiERE5000 | 91.87 a | 92.96 a | 89.92 a | 87.19 a |
| JmiEHE5000 | 76.53 ab | 72.5 bc | 74.23 b | 72.61 b |
| JmiERE4000 | 88.82 ab | 79.63 ab | 73.74 b | 71.65 b |
| JmiEHE4000 | 60.37 bc | 57.82 cd | 59.37 c | 53.51 c |
| JmiERE3000 | 69 ab | 64.73 bc | 52.37 cd | 45.82 cd |
| JmiEHA5000 | -12.19 fgh | 39.92 de | 41.53 e | 42.56 cde |
| JmiEHA4000 | 3.34 ef | 37.8 e | 42.9 de | 42.27 cde |
| JmiEHA3000 | -19.75 fgh | 33.12 e | 34.37 e | 33.48 de |
| JmiEHA2000 | 7.15 def | 39.97 de | 36.34 e | 33.32 de |
| JmiEHE3000 | 37.18 cd | 39.39 e | 40.52 e | 32.53 e |
| JmiERE2000 | 26.28 de | 42.02 de | 37.48 e | 32.27 e |

Jmi: *J. microcarpa*; EHE: extracto hojas etanol; ERE: extracto ramas etanol; EHA: extracto hojas agua. Los valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales ($p < 0.05$). Los valores menores a 20% no se incluyeron.

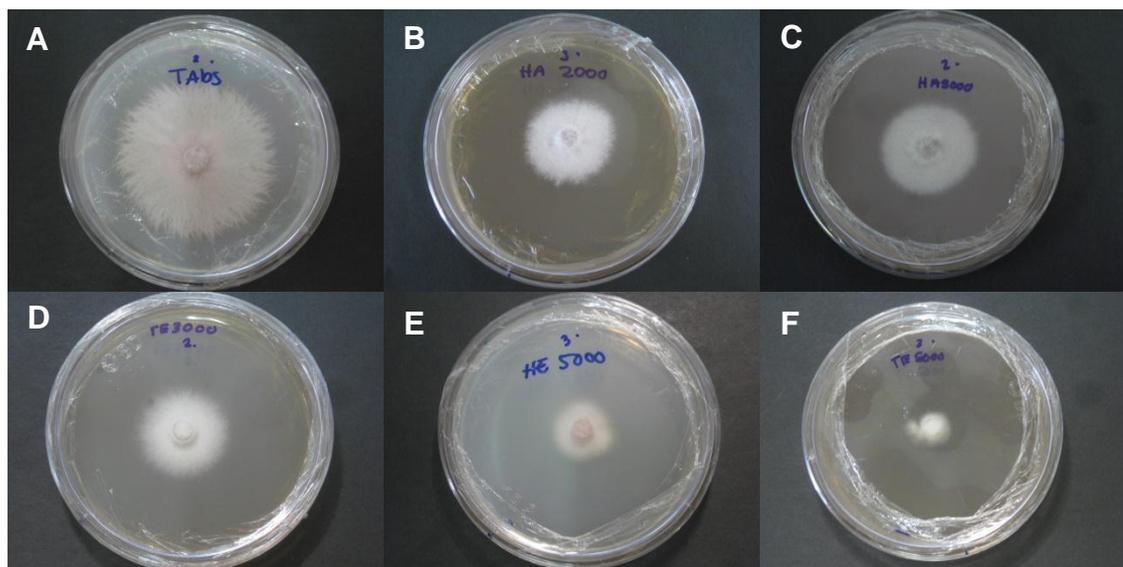


Figura 23. Efecto de extractos de *Juglans microcarpa* sobre el crecimiento de *F. oxysporum* a 168 horas. A: Testigo absoluto; B: Hojas agua 2000 mg/L; C: Hojas agua 5000 mg/L; D: Ramas etanol 3000 mg/L; E: Hojas etanol 5000 mg/L; F: Ramas etanol 5000 mg/L.

Cuadro 10. Valores medios de porcentaje de inhibición de *Fusarium oxysporum*, evaluado con extractos de *Carya ovata*.

| Tratamientos mg/L | Tiempo (h) | | | |
|----------------------|--------------|------------|----------|-----------|
| | 24 | 72 | 120 | 168 |
| CoERE5000 | 92.88 a | 85.48 a | 86.37 a | 85.38 a |
| CoERE4000 | 80.69 ab | 66.2 b | 69.32 b | 68.76 b |
| CoEHE5000 | 69.98 abc | 66.98 b | 68.53 b | 67.13 b |
| CoEHA5000 | 44.66 abcdef | 56.41 b | 54.67 c | 46.56 c |
| CoEHA4000 | 49.47 abcde | 57.98 b | 54.71 c | 45.97 c |
| CoEHE4000 | 70.25 abc | 53.67 bc | 48.43 c | 44.33 cd |
| CoERE3000 | 47.87 abcdef | 41.04 cd | 38.74 d | 35.96 de |
| CoEHE1000 | 12.67 cdefgh | 10.95 fghi | 24.61 ef | 33.2 ef |
| CoEHA3000 | 1.64 defghi | 37.71 d | 38.27 d | 33.04 ef |
| CoEHA2000 | 20.32 cdefgh | 40.02 cd | 35.87 d | 31.14 efg |
| CoERE2000 | 28.59 bcdefg | 22.34 ef | 25.77 e | 22.11 ghi |

Co: *C. ovata*; EHE: extracto hojas etanol; ERE: extracto ramas etanol; EHA: extracto hojas agua. Los valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales ($p < 0.05$). Los valores menores de 20% no se incluyeron.

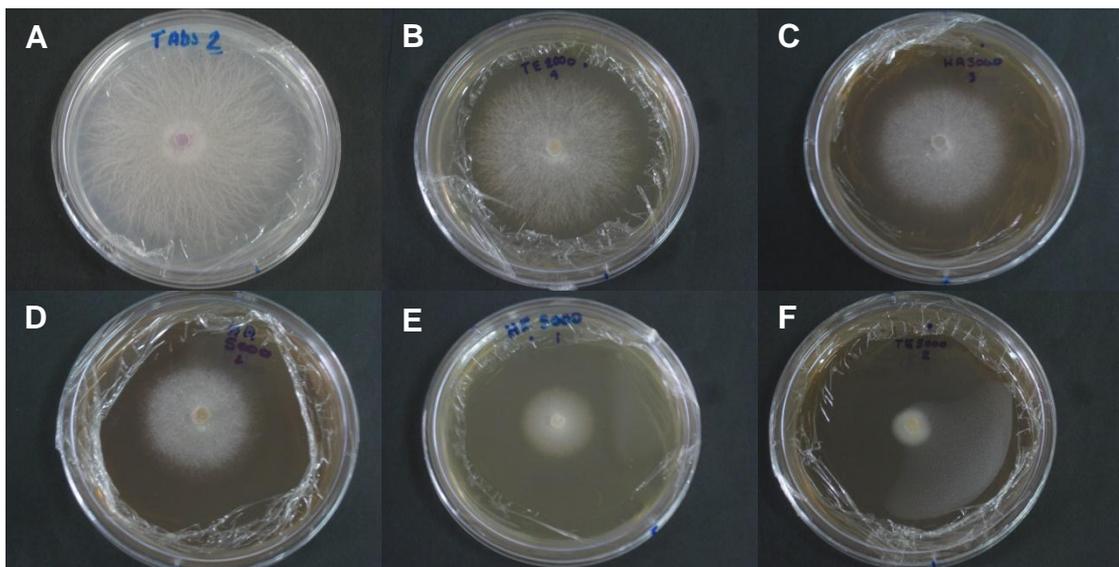


Figura 24. Efecto de extractos de *Carya ovata* sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* a 168 horas. A: Testigo absoluto; B: Ramas etanol 2000 mg/L; C: Hojas agua 3000 mg/L; D: Hojas agua 5000 mg/L; E: Hojas etanol 5000 mg/L; F: Ramas etanol 5000 mg/L.

Se observó que el efecto de los diferentes extractos de etanol de nogalillos contra *F. oxysporum* fue fungistático. La inhibición no alcanzó el 100% ya que ésta disminuyó al aumentar el tiempo de incubación del patógeno (Upadhyay et

al., 2010). Esto puede atribuirse a la volatilidad de algunos compuestos fenólicos (Sumalan et al., 2013).

Análisis Probit

Los resultados de la actividad antifúngica de los extractos de etanol de los nogalillos fueron reflejados en los valores obtenidos de las concentraciones mínimas requeridas para lograr inhibir al patógeno al 50% y 90% (CMI₅₀ y CMI₉₀). Al final de ensayo (168 h) la CMI₅₀ y CMI₉₀ del extracto de etanol de las hojas fueron: 3434 y 10794 mg/L para *J. mollis*; 3565 y 9094 mg/L para *J. microcarpa*; y 5374 y 97789 mg/L para *C. ovata*, respectivamente. En las ramas en etanol la CMI₅₀ y CMI₉₀ fueron: 2612 y 10904 mg/L para *J. mollis*; 2811 y 6131 mg/L para *J. microcarpa*; y 2929 y 9625 mg/L para *C. ovata*, respectivamente. En frutos en etanol de *J. mollis* la CMI₅₀ y CMI₉₀ fue: 1963 y 8229 mg/L (Cuadro 11).

Cuadro 11. Concentración MIC₅₀ y MIC₉₀, de extractos para inhibir el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* a las 168 horas

| Extracto | MIC ₅₀ mg/L | 95% Fiducial limits | | MIC ₉₀ mg/L | 95% Fiducial limits | | Chi ^a |
|----------|---------------------------|------------------------|--------|---------------------------|----------------------|-----------|------------------|
| | | Lower | Upper | | Lower | Upper | |
| JmoEHE | 3434 | 2836 | 4381 | 10794 | 7461 | 20967 | 11.8 |
| JmoERE | 2612 | 2224 | 3115 | 10904 | 7894 | 17783 | 6.13 |
| JmoEFE | 1963 | 1793 | 2144 | 8229 | 6952 | 10132 | 1.85 |
| JmoEFA | 54082 | 25696 | 204884 | 7034345 | 1135164 | 192251883 | 1.96 |
| JmiEHE | 3565 | 3270 | 3926 | 9094 | 7588 | 11676 | 3.19 |
| JmiERE | 2811 | 2607 | 3026 | 6131 | 5421 | 7203 | 3.24 |
| JmiEHA | 5376 | 4576 | 6700 | 31489 | 20490 | 59896 | 2.03 |
| JmiERA | 103.714 | 1.41E ⁻⁷ | 421.08 | 3.71 | 3.84E ⁻¹⁹ | 69.63 | 1.96 |
| CoEHE | 5374 | 3546 | 13160 | 97789 | 28578 | 2520464 | 7.64 |
| CoERE | 2929 | 2515 | 3476 | 9625 | 7200 | 15008 | 7.31 |
| CoEHA | 5094 | 4554 | 5842 | 33723 | 24594 | 50934 | 1.96 |
| CoERA | 110630459 | | | 1.26E ¹⁴ | | | 3.15 |

Jmo: *J. mollis*; Jmi: *J. microcarpa*; Co: *Carya ovata*; EHE: extracto hojas etanol; ERE: extracto ramas etanol; EFE: extracto frutos etanol; EHA: extracto hojas agua; ERA: extracto ramas agua; EFA: extracto frutos agua ^aChi-cuadrado significancia $p < 0.05$.

Jasso de Rodríguez et al. (2015) reportaron la inhibición de *F. oxysporum* con extractos de hojas en etanol de *Rhus muelleri* con una concentración CMI₅₀ 3363 ppm y CMI₉₀ 11793 ppm a las 168 horas. En la presente investigación, los extractos de etanol de las ramas de las tres especies presentaron CMI₅₀ menores que las de *R. muelleri*, y las CMI₉₀ también tuvieron valores inferiores en los extractos de etanol de las ramas, hojas y frutos de *J. mollis* y para las hojas y ramas de *J. microcarpa* y ramas de *C. ovata*, mostrando mayor efectividad que *R. muelleri*.

Efecto antifúngico de los extractos de nogalillos contra *Alternaria alternata*

El ANOVA mostró que los extractos de etanol de *J. mollis*, *J. microcarpa* y *C. ovata* presentaron actividad biológica altamente significativa ($p < 0.05$) contra *A. alternata* (Figuras 25, 26 y 27, respectivamente), en comparación con los extractos acuosos. Los extractos de frutos, ramas y hojas a 5000 mg/L y los de frutos y ramas a 4000 mg/L de *J. mollis* presentaron estadísticamente las más altas ($p < 0.05$) inhibiciones en un rango de 96.94% al 100%; seguidos del extracto de los frutos de *J. mollis* a 3000 mg/L, con 90.04% de inhibición micelial (Cuadro 12). Los extractos de etanol de hojas y ramas de *J. microcarpa* a 5000 mg/L y 4000 mg/L presentaron estadísticamente la más alta ($p < 0.05$) inhibición en un rango de 95.55% al 100%, seguido del extracto de etanol de hojas a 3000 mg/L con 83.67% de inhibición (Cuadro 13), resultado que estadísticamente es similar a la inhibición total que se alcanzó. Los extractos de etanol de hojas y ramas de *C. ovata* a 5000 mg/L y 4000 mg/L, presentaron estadísticamente la más alta inhibición ($p < 0.05$) de *A. alternata* en un 100%, a las 168 h de incubación. El extracto de las hojas a 3000 mg/L presentó 88.18% de inhibición sobre *A. alternata*, la cual estadísticamente es igual a las de los extractos a 4000 y 5000 mg/L (Cuadro 14). Es importante mencionar que en esta investigación se obtuvieron dentro de las más altas inhibiciones las de los extractos de etanol de las ramas y las hojas de las tres especies contra *A. alternata*. Estos resultados son muy importantes por la utilización que se haga de los extractos de los nogalillos evaluados en esta investigación.

Se observó que el efecto de los extractos en la inhibición de *A. alternata* es mayor que la que se presentó en *F. oxysporum*. También se constató que los mayores porcentajes de inhibición son dependientes de las más altas concentraciones (Jasso de Rodríguez et al., 2017). Los efectos de inhibición que los extractos de etanol de los nogalillos ejercen sobre *A. alternata* pueden ser atribuidos a los compuestos químicos mayoritarios, identificados en los extractos de etanol, principalmente el hexilenglicol, que se presentó tanto en hojas como en ramas de las tres especies, además se pueden atribuir a los elevados contenidos de fenoles cuantificados, así como a la actividad antioxidante. Estos resultados concuerdan con los reportados por Oliveira et al. (2008); Salazar et al. (2008); Osorio et al. (2010) y Castillo et al. (2010), quienes atribuyen la actividad antifúngica de los géneros *Juglans* y *Carya* a la presencia de flavonoides y polifenoles.

También el que sea un extracto crudo con una elevada cantidad de compuestos, se le puede atribuir los efectos totales de los extractos a la sinergia promovida por el conjunto de metabolitos que lo integran (Jasso de Rodríguez et al., 2015).

Se observó que el efecto de los diferentes extractos de etanol de nogalillos contra *A. alternata* fue fungicida, ya que se alcanzó el 100% de inhibición durante el desarrollo de la incubación y hasta las 168 h.

Cuadro 12. Valores medios de porcentaje de inhibición de *Alternaria alternata*, evaluado con extractos de *Juglans mollis*.

| Tratamientos mg/L | Tiempo (h) | | | |
|----------------------|------------|----------|----------|----------|
| | 24 h | 72 h | 120 h | 168 h |
| JmoEFE5000 | 100 a | 100 a | 100 a | 100 a |
| JmoEFE4000 | 100 a | 100 a | 100 a | 100 a |
| JmoERE5000 | 100 a | 100 a | 100 a | 100 a |
| JmoEHE5000 | 100 a | 100 a | 100 a | 98.14 a |
| JmoERE4000 | 100 a | 97.76 a | 97.5 ab | 96.94 a |
| JmoEFE3000 | 100 a | 87.33 ab | 88.96 bc | 90.04 ab |
| JmoEHE4000 | 100 a | 93.15 a | 88.28 bc | 83.38 bc |
| JmoERE3000 | 96.73 a | 78.97 bc | 80.16 c | 74.77 c |
| JmoEFE2000 | 33.53 bc | 48.28 d | 50.36 d | 54.24 d |
| JmoEHE3000 | 100 a | 66.32 c | 56.4 d | 50.51 d |
| JmoERE2000 | 19.45 cd | 45.56 d | 47.55 d | 47.34 d |

Jmo: *J. mollis*; EFE: extracto frutos etanol; EHE: extracto hojas etanol; ERE: extracto ramas etanol. Los valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales ($p < 0.05$). los valores menores a 20% no se incluyeron.

En la figura 27 se observa el crecimiento de *Aa* con diferentes extractos a diferentes concentraciones y el crecimiento del testigo absoluto (sin extracto).

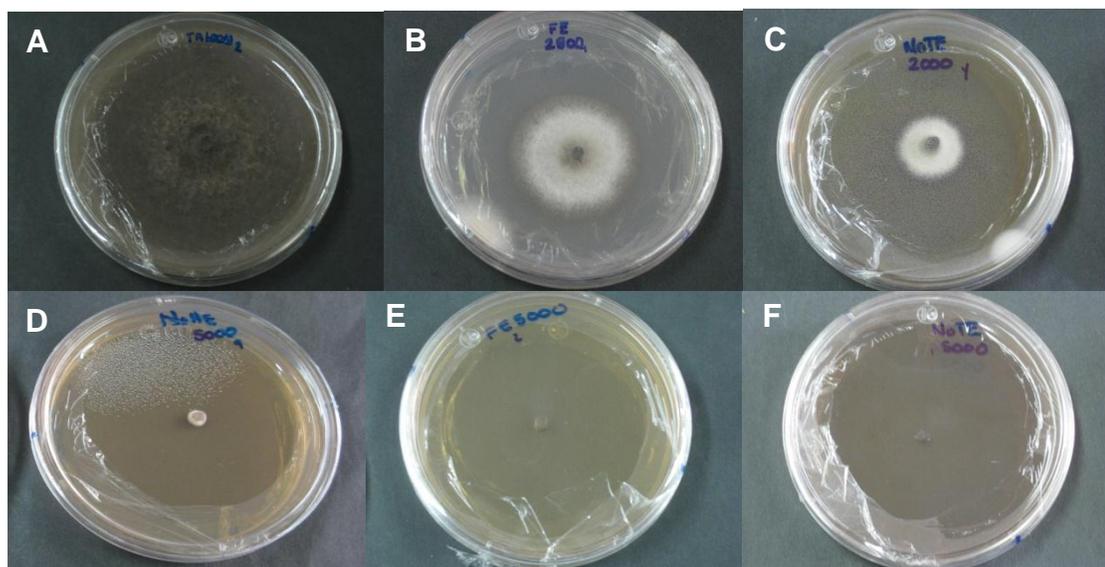


Figura 25. Efecto de extractos de *Juglans mollis* sobre el crecimiento de *Alternaria alternata* a 168 horas. A: Testigo absoluto; B: Ramas etanol 2000 mg/L; C: Frutos etanol 2000 mg/L; D: Hojas etanol 5000 mg/L; E: Frutos etanol 5000 mg/L; F: Ramas etanol 5000 mg/L.

Cuadro 13. Valores medios de porcentaje de inhibición de *Alternaria alternata*, evaluado con extractos de *Juglans microcarpa*.

| Tratamientos mg/L | Tiempo (h) | | | |
|----------------------|------------|----------|----------|----------|
| | 24 h | 72 h | 120 h | 168 h |
| JmiEHE5000 | 100 a | 100 a | 100 a | 100 a |
| JmiERE5000 | 100 a | 100 a | 100 a | 100 a |
| JmiEHE4000 | 100 a | 100 a | 100 a | 100 a |
| JmiERE4000 | 100 a | 100 a | 100 a | 95.55 a |
| JmiEHE3000 | 100 a | 93.13 ab | 91.38 ab | 83.67 ab |
| JmiERE3000 | 96.15 a | 86.75 b | 80.21 b | 71.9 b |
| JmiEHE2000 | 71.98 b | 53.82 c | 39.33 c | 27.13 c |
| JmiERE2000 | 63.27 b | 52.39 c | 36.89 c | 25.07 c |

Jmi: *J. microcarpa*; EHE: extracto hojas etanol; ERE: extracto ramas etanol. Los valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales ($p < 0.05$). Los valores menores de 20 % no se incluyeron.

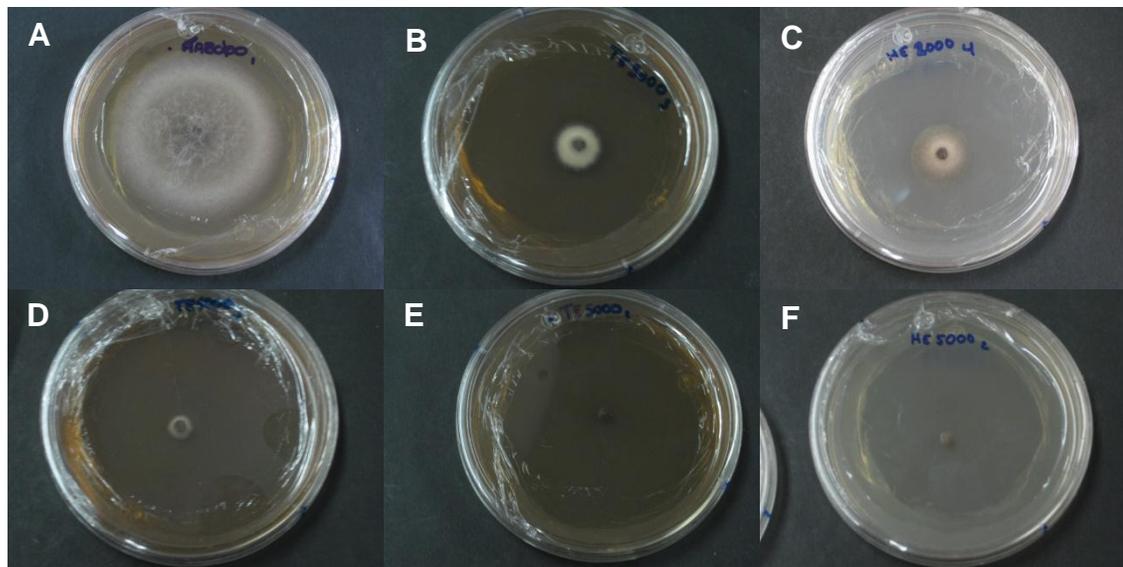


Figura 26. Efecto de extractos de *Juglans microcarpa* sobre el crecimiento de *Alternaria alternata* a 168 horas. A: Testigo absoluto; B: Ramas etanol 3000 mg/L; C: Hojas etanol 3000 mg/L; D: Ramas etanol 4000 mg/L; E: Ramas etanol 5000 mg/L; F: Hojas etanol 5000 mg/L.

Cuadro 14. Valores medios de porcentaje de inhibición de *Alternaria alternata*, evaluado con extractos de *Carya ovata*.

| Tratamientos mg/L | Tiempo (h) | | | |
|----------------------|-------------|------------|----------|----------|
| | 24 h | 72 h | 120 h | 168 h |
| CoEHE5000 | 100 a | 100 a | 100 a | 100 a |
| CoERE5000 | 100 a | 100 a | 100 a | 100 a |
| CoEHE4000 | 100 a | 100 a | 100 a | 100 a |
| CoERE4000 | 100 a | 100 a | 100 a | 100 a |
| CoEHE3000 | 88.1 ab | 89.1 a | 89.19 a | 88.18 a |
| CoERE3000 | 81.99 abc | 79.8 ab | 79 ab | 80.3 ab |
| CoEHE2000 | 58.56 bcde | 57.6 bc | 61.62 bc | 61.87 bc |
| CoERE2000 | 46.04 cdefg | 49.84 cd | 51.62 cd | 55.13 cd |
| CoEHA5000 | 73.84 abcd | 34.61 def | 33 def | 36.92 de |
| CoERA5000 | 43.71 defg | 38.51 cdef | 35.53 de | 31.05 ef |

Co: *C. ovata*; EHE: extracto hojas etanol; ERE: extracto ramas etanol; EHA: extracto hojas agua; ERA: extracto ramas agua. Los valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales ($p < 0.05$). Los valores menores a 20% no se incluyeron.

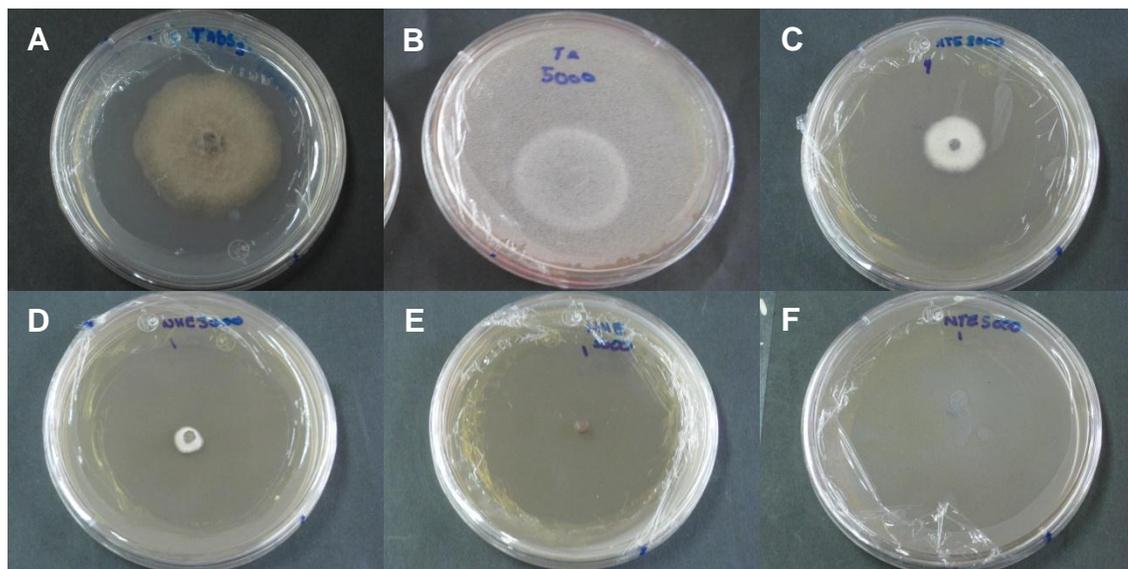


Figura 27. Efecto de extractos de *Carya ovata* sobre el crecimiento de *Alternaria alternata* a 168 horas. A: Testigo absoluto; B: Ramas agua 5000 mg/L; C: Ramas etanol 2000 mg/L; D: Hojas etanol 3000 mg/L; E: Ramas etanol 5000 mg/L; F: Hojas etanol 5000 mg/L.

Existen reportes de la inhibición de *A. alternata* por medio de extractos vegetales (Lira et al., 2014), y de sus compuestos químicos como la juglona, componente mayoritario de algunas especies de la familia Juglandaceae

(Wianowska et al., 2016). Los resultados de la presente investigación son superiores a los reportados por Pane et al. (2016), quienes presentaron un rango de inhibición del crecimiento micelial y de germinación de esporas de *A. alternata* de 43% a 82% y 40% a 53%, respectivamente, con extractos *Capsicum annuum*.

Análisis Probit

Los resultados de la actividad antifúngica de los extractos de etanol de los nogalillos fueron reflejados en los valores obtenidos de las concentraciones mínimas requeridas para lograr inhibir al patógeno al 50% y 90% (CMI₅₀ y CMI₉₀). Al final de ensayo (168 h) la CMI₅₀ y CMI₉₀ del extracto de etanol de las hojas fueron: 2961 y 4415 mg/L para *J. mollis*; 2121 y 3486 mg/L para *J. microcarpa*; 1647 y 2935 mg/L para *C. ovata*, respectivamente. En las ramas en etanol la CMI₅₀ y CMI₉₀ fueron: 1807 y 3937 mg/L para *J. mollis*; 2396 y 3712 mg/L para *J. microcarpa*; y 1637 y 3974 mg/L para *C. ovata*, respectivamente. En frutos en etanol de *J. mollis* la CMI₅₀ y CMI₉₀ fue: 1807 y 2999 mg/L (Cuadro 15). Los extractos de etanol de las tres especies de nogalillos presentaron bajas CMI₉₀ para inhibir a *A. alternata*. Estos resultados abren la posibilidad de plantear un programa para un uso razonable de estas especies con fines antifúngicos.

Cuadro 15. Concentración MIC₅₀ y MIC₉₀ de extractos para inhibir el crecimiento micelial de *Alternaria alternata* a las 168 horas.

| Extracto | MIC ₅₀ | 95% Fiducial limits | | MIC ₉₀ | 95% Fiducial limits | | Chi ^a |
|----------|-------------------|---------------------|-------|---------------------|---------------------|-------|------------------|
| | | Lower | Upper | | Lower | Upper | |
| JmoEHE | 2961 | | | 4415 | | | 2.14 |
| JmoERE | 1703 | 1501 | 1914 | 3937 | 3385 | 4787 | 6.86 |
| JmoEFE | 1807 | 1389 | 2151 | 2999 | 2505 | 4065 | 22.05 |
| JmiEHE | 2121 | | | 3486 | | | 2.11 |
| JmiERE | 2396 | | | 3712 | | | 2.13 |
| CoEHE | 1647 | 1559 | 1733 | 2935 | 2762 | 3145 | 1.7 |
| CoERE | 1637 | 1414 | 1871 | 3474 | 2954 | 4316 | 9.9 |
| CoEHA | 6388 | | | 16358 | | | 4.58 |
| CoERA | 1518817 | | | 1.59E ¹² | | | 6.22 |

Jmo: *J. mollis*; Jmi: *J. microcarpa*; Co: *Carya ovata*; EHE: extracto hojas etanol; ERE: extracto ramas etanol; EFE: extracto frutos etanol; EHA: extracto hojas agua; ERA: extracto ramas agua; EFA: extracto frutos agua. ^aChi-cuadrado significancia $p < 0.05$.

Efecto de Extractos en Etanol Contra *Fusarium oxysporum* en Invernadero

Incidencia y Severidad

Los resultados del ANOVA mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos para incidencia y severidad (Cuadro 16). El T4 y T8 redujeron el porcentaje de la enfermedad significativamente ($p < 0.05$) en comparación con el T3, ya que presentan el menor grado de severidad (0.37 y 0.5) y menor porcentaje de incidencia (37.5), estos extractos pudieron controlar el ataque de *F. oxysporum* en comparación con el tratamiento químico y el tratamiento inoculado que presentan la severidad más alta y una incidencia del 100%. El extracto de etanol que tuvo menos efecto sobre el patógeno en las plantas fue T6 ya que el grado de severidad fue 0.87 y una incidencia del 87.5 %.

Cuadro 16. Valores promedio de severidad e incidencia evaluadas en plantas de tomate a causa de *F. oxysporum*.

| Tratamiento | Severidad (grado) | Incidencia % |
|--|--|--------------|
| T1 T. Absoluto | 0.375 a | 37.5 b |
| T2 T. Químico | 1.25 bc | 100 a |
| T3 T. Inoculado | 2.375 c | 100 a |
| T4 <i>J. microcarpa</i> Hojas 5000 mg/L | 0.375 a | 37.5 b |
| T5 <i>J. microcarpa</i> Hojas 4000 mg/L | 0.875 ab | 62.5 ab |
| T6 <i>J. microcarpa</i> Tallos 5000 mg/L | 0.875 ab | 87.5 a |
| T7 <i>C. ovata</i> Tallos 5000 mg/L | 0.625 ab | 62.5 ab |
| T8 <i>J. mollis</i> Hojas 5000 mg/L | 0.5 a | 37.5 b |
| T9 <i>J. mollis</i> Hojas 4000 mg/L | 0.75 ab | 75 ab |
| Pruebas | Kruskal-Wallis ($p < 0.05$) DMS ($p < 0.05$) | |

Los resultados del presente trabajo son similares a los reportados por Sharma et al. (2016) quienes aplicaron una emulsión acuosa de aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) a plantas de tomate de 6 semanas de edad a una concentración de 5% y obtuvieron una reducción del daño de marchitez causado por *Fusarium oxysporum* de 0.78 y una incidencia del $13.09 \pm 1.7\%$. También Hanaa et al. (2011) en plantas de tomate de cuatro semanas de edad lograron reducir el porcentaje de incidencia de esta enfermedad en un 25.5% y 27.8% con extractos acuosos de neem (*Azadirachta indica*) y sauce (*Salix babylonica*) al 10%. Los tratamientos T4 y T8 (*J. microcarpa*, hojas 5000 mg/L y *J. mollis*, hojas 5000 mg/L) que tuvieron un mejor control del patógeno en este experimento, pertenecen a la familia *Juglandaceae*, que ha sido reportada con actividad antifúngica por Wianowska et al. (2016), quienes evaluaron los extractos de cáscaras verdes de *J. regia* y juglona contra los hongos, *Fusarium culmorum*, *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans* y *Ascosphaera Apis*. También Upadhyay et al. (2010)

reportan que los extractos de corteza de tallo de *J. regia* en diferentes solventes tuvieron actividad antifúngica contra *Fusarium solani*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, y *Trichoderma virens*, así mismo se ha comprobado actividad nematocida (Garrido et al., 2014) y acaricida (Wang et al., 2007). Esta acción es debido al contenido de fenoles (Osorio et al., 2010) presentes en los extractos así como la composición química (Ara et al., 2013).

Los compuesto químicos encontrados con mayor porcentaje en los extractos de las hojas de *J. microcarpa* y *J. mollis* (T4 y T8) tienen actividad antifúngica y antibacterial (Kinnunen y Koskela, 1991) como: Hexilenglicol que pertenece a la familia de los polialcoholes; Fitol que es un diterpeno con actividad antibacterial (Inoue et al., 2005); Acido hexadecanoico, éster etílico; Acido hexadecanoico, éster dioctílico; Metilo (Z)-5,11,14,17-eicosatetreonato son ésteres de ácido graso con actividad antifúngica y antibacterial (Agoramoorthy et al., 2007), nematocida, antioxidante e hipocolesterolémico (Rajeswari et al., 2012); acetato vitamina E con actividad antioxidante y anticancerígena (Berton et al., 1998), Fenol, 2,2'-metileno bis[6-(1,1-dimetiletil)-4-etil con actividad aun no reportada y que pertenecen a la familia de los polifenoles. En la Figura 28 se observa el efecto de *Fo* en plantas de tomate cv Rio Grande donde se encontraron síntomas específicos de la enfermedad causada por este hongo como: amarillamiento de folíolos, hojas secas unilaterales, necrosis (Cai et al., 2003) y reducción del crecimiento en plantas no tratadas con extractos, similar al reportado por Hanaa et al. (2011) con extractos acuosos de neem y sauce aplicados en contra de este mismo hongo.



Figura 28. Síntomas ocasionados por *Fusarium oxysporum*. A. Planta sana; B, C. Hojas secas unilateral; D, E. Amarillamiento de foliolos; F, G. Hojas secas adheridas a la planta; H. Corte de raíz con necrosis.

Altura de planta y diámetro de tallo

El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores medios de las variables altura de planta (Cuadro 17) y diámetro de tallo (Cuadro 18) en las 16 mediciones tomadas. A los 118 DDT el extracto de *J. mollis* hojas 4000 mg/L (T9) aplicado a las plantas de tomate promovió el crecimiento de la planta en comparación del T1 (control no inoculado) y T3 (control inoculado) con valores de 163.1 cm, 119.5 cm y 142.3 cm, cabe destacar que síntomas como el achaparramiento es característico de patógenos como *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Carrillo et al., 2003; Cai et al., 2003). Este mismo efecto fue reportado por Nefzi y colaboradores (2017) con extractos acuosos de hojas, tallos y frutos de *Lycium arabicum* aplicados en plántulas de tomate cv. Rio Grande infectadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL), ya que lograron disminuir la severidad de esta enfermedad y mejorar variables como altura de planta, longitud de raíz, peso fresco de partes aéreas, raíz y diámetro de tallo entre un 46 a 60%.

Para la variable diámetro de tallo se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$), el T9 fue el que tuvo mayor valor 14.5 mm que el control inoculado (14.4 mm), mas no para el control no inoculado (15.9 mm) que mostró mayor diámetro (cuadro 18). De acuerdo a Muñoz (2009), el tallo es un órgano que provee soporte y nutrientes a la planta e influye en el rendimiento, pues determina la productividad de los cultivos.

Cuadro 17. Comparación de medias de altura de la planta (cm)

| DDT | Tratamientos | | | | | | | | | CV | LSD |
|-----|--------------|----------|----------|---------|----------|----------|----------|----------|---------|------|------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 | T9 | | |
| 13 | 17.8a | 15.6bcd | 15.7bc | 15.6bcd | 15.2bcde | 15.8b | 13.7e | 14.1de | 14.2cde | 10.1 | 1.5 |
| 20 | 28.0a | 24.8b | 24.9b | 23.6b | 23.1b | 24.4b | 22.5b | 22.8b | 22.7b | 11.0 | 2.7 |
| 27 | 40.0a | 38.0ab | 39.1a | 36.6ab | 34.6b | 36.4ab | 35.5b | 35.1b | 36.4ab | 9.6 | 3.6 |
| 37 | 56.2ab | 60.0a | 57.3ab | 58.0ab | 54.1b | 56.8ab | 56.1ab | 57.3ab | 57.0ab | 8.4 | 4.8 |
| 41 | 77.2bc | 80.9abc | 82.1ab | 85.0a | 76.6bc | 74.1c | 75.6bc | 75.1bc | 78.3abc | 9.2 | 7.2 |
| 48 | 90.8ab | 98.3a | 97.0a | 98.8a | 92.0ab | 91.4ab | 95.0ab | 87.8b | 96.5ab | 9.5 | 8.9 |
| 55 | 94.1d | 109.3abc | 108.7abc | 114.3ab | 103.8bcd | 103.6bcd | 109.8abc | 102.7cd | 115.3a | 10.3 | 11.0 |
| 62 | 96.8c | 115.2ab | 121.1ab | 126.7a | 114.8ab | 117.4ab | 121.8ab | 112.1b | 127.5a | 12.9 | 13.8 |
| 69 | 100.6b | 117.4ab | 123.0ab | 131.1a | 120.4ab | 124.0ab | 123.4ab | 118.4abv | 138.1a | 13.5 | 26.5 |
| 76 | 102.5b | 122.5ab | 125.1ab | 135.0a | 126.5ab | 128.8ab | 130.1ab | 125.2ab | 144.5a | 15.0 | 30.5 |
| 83 | 104.7c | 124.0bc | 126.0b | 136.3ab | 127.8b | 131.5b | 131.5b | 126.3b | 151.8a | 15.0 | 19.4 |
| 90 | 105.2c | 125.3b | 127.1b | 137.6ab | 130.7b | 136.2ab | 133.6b | 129.5b | 154.5a | 14.2 | 18.6 |
| 97 | 107.2c | 128.8b | 130.6b | 140.0ab | 137.0b | 140.7ab | 135.1b | 132.8b | 156.2a | 13.7 | 18.3 |
| 104 | 110.0c | 134.0b | 134.5b | 143.2ab | 143.2ab | 144.3ab | 136.3b | 134.5b | 157.2a | 13.8 | 18.9 |
| 111 | 115.1c | 142.2ab | 139.1b | 147.1ab | 150.0ab | 147.8ab | 140.2b | 137.3b | 159.3a | 12.7 | 18.0 |
| 118 | 119.5c | 143.8b | 142.3b | 150.1ab | 155.5ab | 150.6ab | 145.3ab | 141.8b | 163.1a | 12.6 | 18.3 |

DDT: Días después del trasplante; T1: Testigo Absoluto; T2: Testigo Químico; T3: Testigo Inoculado; T4: *Juglans microcarpa* hojas 5000 mg/L; T5: *J. microcarpa* hojas 4000 mg/L; T6: *J. microcarpa* tallos 5000 mg/L; T7: *C. ovata* tallos 5000 mg/L; T8: *J. mollis* hojas 5000 mg/L; T9: *J. mollis* hojas 4000 mg/L. Medias con letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos, DMS ($p < 0.05$).

Cuadro 18. Comparación de medias de diámetro de tallo (mm)

| DDT | Tratamientos | | | | | | | | | CV | LSD |
|-----|--------------|---------|--------|--------|-------|---------|---------|--------|--------|------|-----|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 | T9 | | |
| 13 | 5.0 a | 3.8bc | 4.4ab | 3.6c | 3.6c | 3.5c | 3.7c | 3.9bc | 3.5c | 18.0 | 0.7 |
| 20 | 5.5 a | 4.9ab | 5.5 a | 4.4bc | 4.2bc | 4.6bc | 4.2bc | 4.5bc | 4.0c | 16.4 | 0.8 |
| 27 | 6.8b | 6.6b | 8.2 a | 6.9b | 6.5b | 6.6b | 6.9b | 6.7b | 7.1b | 14.5 | 1.0 |
| 37 | 8.8bc | 9.2abc | 10.3 a | 9.5ab | 8.1c | 9.7ab | 9.8ab | 8.9bc | 9.4ab | 13.5 | 1.2 |
| 41 | 11.8 a | 10.7abc | 11.1ab | 9.8bc | 9.7bc | 10.6abc | 10.7abc | 10.2bc | 9.5c | 14.4 | 1.5 |
| 48 | 13.3 a | 11.7b | 12.1ab | 10.7b | 10.5b | 11.4b | 11.4b | 11.5b | 10.8b | 13.3 | 1.5 |
| 55 | 13.9 a | 11.5b | 11.8b | 11.2b | 10.6b | 11.8b | 11.6b | 11.7b | 11.3b | 11.1 | 1.3 |
| 62 | 14.0 a | 12.0bc | 12.7b | 11.6bc | 11.0c | 12.2bc | 11.8bc | 11.8bc | 11.4bc | 11.3 | 1.3 |
| 69 | 14.2 a | 12.9ab | 13.5ab | 12.0b | 11.6b | 12.7ab | 12.3ab | 12.0b | 12.1ab | 10.7 | 2.2 |
| 76 | 14.9 a | 13.0ab | 13.6ab | 12.4b | 12.0b | 13.0ab | 12.5b | 12.5b | 12.6b | 10.0 | 2.1 |
| 83 | 15.0 a | 13.2b | 13.5b | 12.5b | 12.2b | 12.8b | 12.6b | 13.0b | 12.8b | 10.2 | 1.3 |
| 90 | 14.9 a | 13.2bc | 13.5b | 12.5bc | 12.2c | 12.7bc | 12.6bc | 13.0bc | 13.0bc | 10.0 | 1.3 |
| 97 | 15.0 a | 13.3bc | 13.8ab | 12.8bc | 12.3c | 12.8bc | 12.8bc | 13.1bc | 13.2bc | 9.9 | 1.3 |
| 104 | 15.1 a | 13.4bc | 14.4ab | 13.2bc | 12.3c | 13.0c | 12.9c | 13.2bc | 13.3bc | 10.3 | 1.4 |
| 111 | 15.3 a | 13.6bc | 14.4ab | 13.2bc | 12.5c | 13.3bc | 13.1bc | 13.3bc | 14.1ab | 10.2 | 1.4 |
| 118 | 15.9 a | 13.5bc | 14.4b | 13.4bc | 12.8c | 13.5bc | 13.1bc | 13.4bc | 14.5ab | 10.5 | 1.5 |

DDT: Días después del trasplante; T1: Testigo Absoluto; T2: Testigo Químico; T3: Testigo Inoculado; T4: *Juglans microcarpa* hojas 5000 mg/L; T5: *J. microcarpa* hojas 4000 mg/L; T6: *J. microcarpa* tallos 5000 mg/L; T7: *C. ovata* tallos 5000 mg/L; T8: *J. mollis* hojas 5000 mg/L; T9: *J. mollis* hojas 4000 mg/L. Medias con letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos, DMS ($p < 0.05$).

Peso fresco y seco de hojas, tallos y raíces

Los resultados obtenidos por el ANOVA muestran significancia para los valores de pesos fresco de hoja (PFH), tallo (PFT) y raíz (PFR), así como para el peso seco de hoja (PSH), tallo (PST) y raíz (PSR) y la longitud de la raíz ($p < 0.05$) y se muestran en el cuadro 19. El extracto de *J. mollis* hojas 4000 mg/L (T9) tuvo el mayor valor medio para PFH, PFT, PFR, PSH, PST, PSR con 615.2 g; 253.5 g; 46 g; 80.9 g; 33 g; 6.5 g respectivamente, en comparación con el control inoculado (T3) que muestra valores inferiores. Este extracto logró proteger de marchitez e inducir el aumento de peso de las diferentes partes de la planta. Schinzoumka et al. (2016) usaron extractos de *Acacia albida* y *Crotalaria retusa* con diferentes solventes, los cuales fueron aplicados en las partes aéreas y en suelo, logrando inducir incremento en el peso de las partes aéreas y raíces en plantas de tomate cv. Rio Grande.

Cuadro 19. Comparación de medias de las variables peso fresco y seco de hoja, tallo, raíz y longitud de raíz

| Tratamiento | Variable | | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | PFH (g) | PFT (g) | PFR (g) | PSH (g) | PST (g) | PSR (g) | LR (cm) |
| T1 | 385.2e | 198.2bc | 41ab | 54.1bc | 29.1ab | 5.6ab | 69.5ab |
| T2 | 397.7cde | 159.2c | 38.8abc | 53.0bc | 23.4bc | 5.6ab | 70.5a |
| T3 | 394.2de | 168.5c | 22.6d | 47.6c | 21.4bc | 3.8b | 59.1bcd |
| T4 | 544.0ab | 227.7ab | 25.6cd | 65.9ab | 26.5abc | 4.3b | 55.9cd |
| T5 | 431.6bcde | 187.8bc | 26.5cd | 50.0c | 19.5c | 4b | 49.9d |
| T6 | 509.8abc | 202.7bc | 30.1bcd | 59.6bc | 23.1bc | 5ab | 64.7abc |
| T7 | 500.5bcd | 190.6bc | 34.3abcd | 58.1bc | 22.4bc | 5.1ab | 61.8abc |
| T8 | 484.3bcde | 202.5bc | 35.3abcd | 59.1bc | 23.8bc | 4.6b | 57cd |
| T9 | 615.2 a | 253.5 a | 46a | 80.9 a | 33.0 a | 6.5a | 60.7abc |
| CV | 24.2 | 22 | 42.2 | 26.1 | 32.4 | 36.6 | 17.3 |
| LSD | 114.6 | 43.8 | 14.1 | 15.3 | 8 | 1.8 | 10.6 |

PFH: Peso fresco de hojas; PFT: Peso fresco tallo; PFR: Peso fresco de raíz; PSH: Peso seco de hojas; PST: Peso seco de tallo; PSR: Peso seco raíz; LR: Longitud de raíz; NH: Número de hojas; T1: Testigo Absoluto; T2: Testigo Químico; T3: Testigo Inoculado; T4: *Juglans microcarpa* hojas 5000 mg/L; T5: *J. microcarpa* hojas 4000 mg/L; T6: *J. microcarpa* tallos 5000 mg/L; T7: *C. ovata* tallos 5000 mg/L; T8: *J. mollis* hojas 5000 mg/L; T9: *J. mollis* hojas 4000 mg/L. Medias con letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos, DMS ($p < 0.05$).

Existen reportes de la relación inversa significativa que existe entre el peso fresco de la planta y la severidad de la marchitez provocada por *Fusarium*, como lo citan Abdallah et al. (2016), en la evaluación con plantas de tomate cv. Rio Grande inoculadas con *Fol* y tratadas con *Bacillus cereus* (S18) y *Alcaligenes faecalis* (S42), disminuyeron la severidad de la enfermedad, así mismo promovieron el crecimiento de la planta y aumentaron el peso fresco, por el contrario el control inoculado y no tratado tuvo menor peso. Los autores citan que el efecto negativo de *Fol* en plantas de tomate, puede deberse a las toxinas producidas por el patógeno que afectan la absorción de K y la función estomática produciendo una transpiración excesiva y súbitamente la pérdida de agua, esto trae en consecuencia la marchitez de la planta, también estos autores citan que la pérdida del peso seco de los tallos también se puede asociar al incremento de la respiración, ruptura celular por la descomposición de la membrana (El-Khallal et al., 2007; Aducci et al., 1997; Orcutt y Nilsen, 2000). El extracto de *J. mollis* hojas a 4000 mg/L (T9), tuvo el mayor peso fresco y seco de raíz (Cuadro 19), en comparación del testigo inoculado y de los tratamientos restantes, este tratamiento disminuyó la entrada del patógeno a las raíces de la planta, este resultado es similar al obtenido por Nefzi et al. (2017), que aplicó extractos de hojas, tallos y frutos de *Lycium arabicum* a plantas de tomate cv. Rio Grande, infectadas con *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, los extractos mejoraron en un 70.5% la longitud radicular y 65.1 % en peso fresco radicular, también 70.1% del peso fresco de la parte aérea. En la Figura 29 se puede observar que el testigo químico (T2) y el testigo inoculado (T3), presentaron pobre desarrollo radicular, pocas raíces principales y secundarias, una coloración café oscuro y necrosis en diferentes puntos de la raíz, con los cortes del tallo se observó necrosis por la colonización del patógeno, el efecto de estos síntomas se comprueba en el bajo peso de raíces, Corpas et al. (2006) citan que *Fo* puede reducir la biomasa de raíces hasta en un 75 %. Por el contrario las raíces de las plantas inoculadas y tratadas con extracto de *J. mollis* a 4000 mg/L tuvieron un desarrollo abundante de raíces principales y secundarias.



Figura 29. Efecto de *Fusarium oxysporum* en raíces de plantas de tomate

El Cuadro 20 muestra el número de hojas, flores y frutos acumulados durante el ciclo del cultivo y el rendimiento total por planta. El T9 obtuvo el mayor número de hojas que todos los otros tratamientos que fueron estadísticamente iguales, también lo fue en el número de flores (59.3), pero en el número de frutos fue menor en comparación con el T4 (41.0), el T8 obtuvo el menor número de frutos (26.6), lo cual se puede atribuir a que la producción y la maduración se retrasó, el mayor rendimiento fue para T7 (2.11 kg/planta) en los otros tratamientos el rendimiento fue menor y fueron estadísticamente iguales, a excepción de T8 con el menor rendimiento atribuido a menor número de frutos. Estos resultados superan a los reportados por Rodríguez y Montilla (2002) con rendimientos de 1.4 kg/planta y 0.515 kg/planta con la aplicación semanal de extracto *Citrus paradisi* en raíces y en conjunto suelo y follaje, para disminuir la marchitez causada por *Fol*.

Cuadro 20. Comparación de medias, número de hojas, frutos, flores, y rendimiento total por planta.

| Tratamiento | Variable | | | |
|-------------|----------|---------|---------|-----------------|
| | NH | NFr | NFI | Rto (kg/planta) |
| T1 | 47.3ab | 32.6abc | 39.4c | 1.85ab |
| T2 | 37.0b | 34.0abc | 37.8c | 1.81ab |
| T3 | 42.0ab | 38.4ab | 53.1ab | 2.06ab |
| T4 | 40.8ab | 41.0a | 48.1abc | 2.03ab |
| T5 | 41.0ab | 28.5bc | 39.8bc | 1.55ab |
| T6 | 47.8ab | 32.0abc | 49.4abc | 1.72ab |
| T7 | 46.1ab | 36.6ab | 48.1abc | 2.11a |
| T8 | 42.4ab | 26.6c | 47.4abc | 1.51b |
| T9 | 48.8 a | 33.8abc | 59.3 a | 1.91ab |
| CV | 26.7 | 29.6 | 28.7 | 32.3 |
| LSD | 11.6 | 10 | 13.5 | 0.5 |

NH: Número de hojas; NFr: Número de frutos; NFI: Número de flores; Rto: Rendimiento; T1: Testigo Absoluto; T2: Testigo Químico; T3: Testigo Inoculado; T4: *Juglans microcarpa* hojas 5000 mg/L; T5: *J. microcarpa* hojas 4000 mg/L; T6: *J. microcarpa* tallos 5000 mg/L; T7: *C. ovata* tallos 5000 mg/L; T8: *J. mollis* hojas 5000 mg/L; T9: *J. mollis* hojas 4000 mg/L. Medias con letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos, DMS ($p < 0.05$).

Análisis de calidad a frutos después de la cosecha

En el Cuadro 21 se muestran los resultados obtenidos de los análisis de calidad realizados a los frutos. El ANOVA muestra diferencias significativas entre los tratamientos, para diámetro ecuatorial (DE), diámetro polar (DP), pH, conductividad eléctrica (CE), firmeza (F), sólidos solubles totales (SST) y licopeno (Lic), más no para Vitamina C donde los valores no arrojan diferencias entre los tratamientos. Los frutos cosechados del T9 resultaron con diámetro polar de 57.6 y diámetro ecuatorial de 47.3 y pH ácido, 4.2. El testigo no inoculado (T1) y *J. mollis* hojas 5000 mg/L (T8) mostraron mayor CE 36.7 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y 30.1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ respectivamente, que los tratamientos restantes, así como la firmeza de sus frutos de 8.4 kg•F con extracto de *J. mollis* hojas 5000 mg/L. Frutos cosechados de las plantas con aplicación de extracto *Juglans microcarpa* hojas 5000 mg/L mostraron mayor contenido de SST 5.0 °Brix en comparación del testigo no inoculado y sin tratamiento (3.8 °Brix). Para la variable vitamina C, los valores medios no tuvieron diferencias significativas, el rango de valores fluctuó entre 13.3 mg/100 g en T5 a 9.5 mg/100 g en T1. En licopeno estadísticamente ($p < 0.05$) el valor mayor lo tuvo el testigo inoculado con 82.9 mg de licopeno por 100 g de tomate, los otros tratamientos fueron iguales.

Cuadro 21. Análisis de calidad en frutos de tomate

| Tratamiento | Variable | | | | | | | |
|-------------|------------|------------|--------|-------------|-----------|--------------|-----------------------|----------------------|
| | DP (mm) | DE (mm) | pH | CE μS/cm | F kg•F | SST °Brix | VitC (mg/10 0g) | Lic (mg/100 g) |
| T1 | 56.4abc | 47.7a | 4.16cd | 36.7a | 3.1c | 3.8c | 9.5a | 53ab |
| T2 | 55.7abc | 47.3ab | 4.5a | 19.2cd | 4.3bc | 4.6ab | 13.08a | 81.3a |
| T3 | 54.5bc | 45.5b | 4.4ab | 22.1cd | 6.2abc | 4.9a | 11.2a | 82.9a |
| T4 | 53.6c | 45.2bc | 4.0d | 17.5cd | 4.1bc | 5.0a | 11.0a | 35.5b |
| T5 | 55.3abc | 46.9ab | 4.1cd | 15d | 3.9bc | 4.9a | 13.3a | 59.6ab |
| T6 | 54.7abc | 44.7c | 4.1cd | 24bc | 5.5abc | 4.6ab | 11.9a | 52.5ab |
| T7 | 54.8abc | 46.5abc | 4.1cd | 20.4cd | 6.7ab | 4.3bc | 10.7a | 43ab |
| T8 | 57.4ab | 46.8abc | 4.0cd | 30.1ab | 8.4a | 4.5ab | 11.1a | 63.1ab |
| T9 | 57.6a | 47.3ab | 4.2bc | 18.8cd | 5.8abc | 4.9a | 9.7a | 46.5ab |
| CV | 5.2 | 4.5 | 4.1 | 26.3 | 49.2 | 9.1 | 27 | 54.2 |
| LSD | 2.9 | 2.1 | 0.2 | 7.7 | 3.4 | 0.5 | 3.9 | 0.4 |

DP: Diámetro polar; DE: Diámetro ecuatorial; pH: potencial Hidrógeno; CE: Conductividad eléctrica; F: Firmeza; SST: Sólidos solubles totales; VitC: Vitamina C; Lic: Licopeno; T1: Testigo Absoluto; T2: Testigo Químico; T3: Testigo Inoculado; T4: *Juglans microcarpa* hojas 5000 mg/L; T5: *J. microcarpa* hojas 4000 mg/L; T6: *J. microcarpa* tallos 5000 mg/L; T7: *C. ovata* tallos 5000 mg/L; T8: *J. mollis* hojas 5000 mg/L; T9: *J. mollis* hojas 4000 mg/L. Medias con letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos, DMS ($p < 0.05$).

El diámetro del fruto es una variable importante en la producción de tomate, ya que de acuerdo al tamaño se realiza la clasificación y su valor monetario. Frutos obtenidos de plantas tratadas con extracto de *J. mollis* hojas a 4000 mg/L mostraron frutos más grande (57.6 mm y 47.3. mm) en comparación del testigo inoculado (54.5 mm y 45.5 mm). Este incremento de tamaño es similar al reportado por Ramírez et al. (2016), quienes demostraron un aumento de tamaño de frutos de tomate con la aplicación de biorreguladores como Prohexadiona de calcio (P-Ca) que retarda el crecimiento vegetativo y mejora la calidad de los frutos. Se observó la disminución de pH en los frutos cosechados de las plantas tratadas con extractos (T4-T9) en comparación con el testigo inoculado, esto se puede deber a los compuestos de los extractos, que proporcionaron menor grado de madurez, ya que el pH aumenta conforme los frutos maduran, debido a que el ácido disminuye, ya que el ácido málico desaparece seguido del ácido cítrico, sugiriendo el catabolismo de citrato a través de malato (Anyasi et al., 2016). Valores en pH de 4-4.2 atribuibles a los extractos, son similares con los encontrados por Abduli et al. (2013) quienes

obtuvieron frutos con acidez elevada al aplicar vermicompost al suelo. Babitha y Kiranmayi (2010) mencionan que el jugo de tomate tiene normalmente un pH de 4 a 4.5, este pH óptimo para que no haya desarrollo de bacterias (Nuez, 2001).

El extracto del T4 indujo a una mayor maduración de los frutos ya que los resultados de SST superan a los obtenidos por Anyasi et al. (2016) quienes aplicaron tratamientos de calor más ácido bórico y/o cloruro de calcio a frutos de tomate, reduciendo el índice de maduración, la tasa de respiración y en consecuencia los sólidos solubles totales por la reducción de la tasa de producción de etileno y CO₂ en frutos. Autores como Mejía et al. (2009), mencionan que el aumento de SST se debe a la hidrólisis del almidón al inicio de la maduración de frutos y la disminución de SST al aumento de la respiración de frutos maduros. Vázquez et al. (2015) obtuvo 4.21-4.51 °Brix en frutos de tomate con el uso de abonos orgánicos composta y te de composta y mencionan que el grado de SST para consumo en fresco o para procesar debe ser al menos de 4.5 °Brix. Cantwell et al. (2007) mencionan que el sabor característico de los frutos de tomate es medido por la concentración de sólidos solubles y ácidos orgánicos. En cuanto a concentración de sales presente en los frutos, el valor más alto con la aplicación de extractos lo obtuvo los frutos del T8, ya que a niveles más altos de acidez la conductividad eléctrica, será más alta. Esta variable debe tener valores mayores a 3.5 dS/m y no menores a 2.5 dS/m, para garantizar una mejor firmeza y calidad de los frutos, ya que a valores bajos se presentan frutos agrietados (Hao y Papadopoulos, 2004). Barrera et al. (2011) reportaron CE de 1.26 a 2.5 dS/m aplicando concentraciones diferentes de Ca²⁺ aplicadas a plantas de tomate en sistema hidropónico.

La firmeza de frutos mencionada en este estudio fue de 8.4 kg•F con extracto de T8 valor superior a 3.1 kg•F en frutos que no tuvieron ningún tratamiento (Testigo absoluto). San Martín et al. (2012) reportaron valores de 1.52 a 1.66 N en frutos obtenidos de plantas cultivadas en diversos sustratos con diferentes granulometrías. Guo et al. (2017) reportaron valores de firmeza entre 2.84 a 20.03 N en frutos de plantas de tomate cultivadas en suelos con desinfección

anaerobia (ASD), así como mayor rendimiento total y frutos extra grandes. Cuando existen cambios físicos y químicos asociados a la degradación de la pared celular y solubilización de pectinas por enzimas pectinesterasa, poligalacturonasa y pectatoliasa en los frutos, estos pierden su firmeza (Marín et al., 2002), también Arias et al. (2000) mencionan que la maduración de frutos en la planta y no en la industria son más firmes y tienen niveles más altos de carotenos y sólidos solubles. Los frutos de tomate están compuestos en su mayoría por fructosa, glucosa y trazas de sacarosa (63-65% de sólidos solubles), ácido cítrico (9%) y málico (4%), Vitamina C, aminoácidos (2-2.5%), Carotenoides, compuestos volátiles (aroma), sales minerales (8%) y sustancias pécticas de la pared celular. (Tieman et al., 2007; Narain et al., 2010). Los resultados de vitamina C (Cuadro 21) obtenidos no tuvieron diferencias significativas entre tratamientos y los rangos encontrados fueron de 9.5 a 13.3 mg por 100 g de tomate. Estos valores son inferiores a los reportados por Al-Harbi et al. (2017) con injertos en plantas de tomate, estrés hídrico y salinidad del suelo. Georgé et al. (2011) reportaron el contenido de vitamina C en dos cultivares diferentes 15.8 ± 1.1 mg/100 g de tomate rojos y 17.1 ± 1.1 mg/100 g de tomate amarillo y el contenido de licopeno, el cual fue de 3.7 ± 0.5 en tomate rojo y ausente en tomate amarillo. El contenido de licopeno (Cuadro 21) encontrado en los frutos de las plantas tratadas con algún extracto (35.5-63.1 mg/100 g) son menores a comparación del testigo químico y testigo inoculado (81.3 y 82.9, respectivamente), valores mayores fueron reportados por Migliori et al. (2017) durante el almacenamiento de frutos de tomate cv. Vesuviano en frío por 120 días y asperjados con tomillo, propóleo y quitosano; 126.5 mg/100 g de peso seco de licopeno. Estos procesos hacen que se mantenga una buena calidad a largo plazo, ya que el licopeno es de los compuestos más importantes relacionados con la sanidad de frutos. Sánchez et al. (2016) mencionan que independientemente de la salinidad del sustrato aplicado a una variedad de tomate híbrido Raf, los frutos que son madurados en la planta contienen más licopeno, que los madurados fuera de la planta. También la maduración fuera de la planta afecta la fisiología del color de manera significativa.

CONCLUSIONES

Los extractos de etanol de hojas, ramas y frutos de *J. mollis*, *J. microcarpa* y *C. ovata* presentaron actividad fungistática contra el crecimiento micelial de *F. oxysporum* y actividad fungicida contra *A. alternata*, lo cual muestra que los extractos de *J. mollis*, *J. microcarpa* y *C. ovata* fueron más efectivos contra *A. alternata* que contra *F. oxysporum*. Además que la CMI_{90} determinadas para inhibir a estos hongos fue baja y la inhibición fue dependiente de la concentración empleada.

Los extractos protegieron a las plantas de tomate del ataque de *Fusarium oxysporum* y además promovieron el crecimiento, biomasa y el tamaño de los frutos. También los parámetros de calidad de frutos fueron aceptables. Por lo tanto, estas especies se pueden considerar como una fuente potencial de compuestos antifúngicos y una alternativa al uso de fungicidas sintéticos.

REFERENCIAS

- Abduli, M.A., Amiri, L., Madadian, E., Gitipour, S. and Sedighian, S. 2013. Efficiency of vermicompost on quantitative and qualitative growth of tomato plants. *International Journal of Environmental Resources*, 7(2):467-472.
- Aducci, P., Ballio, A. and Marra, M. 1997. Phytotoxins as molecular signals. In: *Signal transduction in plants*. Aducci, P. (ed.), pp: 83-105. Birkhauser Verlag, Basel.
- Abdallah, R.A.B., Mokni, T.S., Nefzi, A., Khiareddine, H.J., Daami, R.M. 2016. Biocontrol of Fusarium wilt and growth promotion of tomato plants using endophytic bacteria isolated from *Nicotiana glauca* organs. *Biological Control*. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.03.005>
- Agoramoorthy, G., Chandrasekaran, M., Venkatesalu, V., Hsu, M.J. 2007. Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(4). 739-742.
- Agrios G.N., 2005. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Ed. Elsevier Academic Press. San Diego, California. 992 pp.
- Al-Harbi, A., Hejazi, A. and Al-Omran, A. 2017. Responses of grafted tomato (*Solanum lycopersicon* L.) to abiotic stresses in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences* 24, 1274–1280.
- Al-Tameme, H.J., Hadi, M.Y. and Hameed, I.H. 2015. Phytochemical analysis of *Urtica dioica* leaves by fourier-transform infrared spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 7(10), 238-252.
- Almeida, I.F., Fernandes, E., Lima, J.L.F.C., Costa, P.C., Bahia, M.F. 2008. Walnut (*Juglans regia*) leaf extracts are strong scavengers of pro-oxidant reactive species. *Food Chemistry* 106, 1014–1020.
- Andersen, B., Kroger, E. and Roberts, R.G. 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycol. Res.* 105 (3). 291-299. Printed in the United Kingdom.
- Anguiz, R. and Martín, C. 1989. Anastomosis groups pathogenicity and other characteristics of *Rhizoctonia solani* isolated from potatoes in Perú. *Plant Disease* 73: 199-201.
- Anyasi, T.A., Aworh, C.O. and Jideani, A.I.O. 2016. Effect of packaging and chemical treatment on storage life and physicochemical attributes of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill cv. Roma). *African Journal of Biotechnology*. Vol. 15(35), pp. 1913-1919. DOI: 10.5897/AJB2012.8384

- Ara, I., Shinwari, M.M.A., Rashed, S.A., Bakir, M.A. 2013. Evaluation of Antimicrobial Properties of Two Different Extracts of *Juglans regia* Tree Bark and Search for Their Compounds Using Gas Chromatography-Mass Spectrum. International Journal of Biology; Vol. 5, No. 2.
- Arias, R., Lee, T.C., Specca, D., Janes, H. 2000. Quality comparison of hydroponic tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) ripened on and off vine. J. Food Sci., 65, pp. 545-548.
- Ascencio, A. A., López, B. A., Borrego, E. F., Rodríguez, H. S. A., Flores, O. A., Jiménez, D.F., Gámez, V.A.J. 2008. Marchitez vascular del tomate: I. Presencia de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología, vol. 26, núm. 2, pp. 114-120.
- Babitha, B. and Kiranmayi, P. 2010. Effect of storage conditions on the postharvest quality of tomato (*Lycopersicon esculentum*). J. Res.Agric. Sci. 1(4):409-411.
- Badr, A. and Elkington, T.T. 1982. Antimitotic and chromotoxic activities of isoproturon in *Allium cepa* and *Hordeum vulgare*. Environmental and Experimental Botany, 22(3), 265-270. doi.org/10.1016/0098-8472(82)90017-X
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi.4th Edn. St. Paul, MN: APS Press
- Barrera, P.P., Vázquez, P.M.A., Arteaga, R.R., López, C.I.L. 2011. Calidad y rendimiento de jitomate variando el calcio en un sistema nft en invernadero. Ingeniería Agrícola y Biosistemas 3(2): 49-55. DOI: 10.5154/r.inagbi.2011.11.008
- Blancard, D., Laterrot, H., Marchoux, G., Candresse, T. 2011. Enfermedades del Tomate. Identificar, Conocer, Controlar. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid-México, pp. 679. ISBN: 9788484764274.
- Berton, T.R., Conti, C.J., Mitchell, D.L., Aldaz, C.M., Lubet, R.A. Fischer, S.M. 1998. The Effect of Vitamin E Acetate on Ultraviolet-Induced Mouse Skin Carcinogenesis. Molecular Carcinogenesis 23:175–184.
- Blomhoff, R., Carlsen, M. H., Frost, L.A., Jacobs, J.D.R. 2006. Health benefits of nuts potential role of antioxidants. British Journal of Nutrition. 96, Suppl. 2, S52-S60.
- Brezna, B. and Kuchta, T. 2008. A novel real-time polymerase chain reaction method for the detection of pecan nuts in food. European Food Research and Technology, 226, 373–377.

- Burketová, L., Trdá, L., Ott, P.G., Valentová, O. 2015. Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. *Biotechnol. Adv.* 33, 994-1004.
- Cai, G., Gale, I.R., Scheider, R.W., Kistler, H.C., Davis, R.M., Elias, K.S., Miyao E.M. 2003. Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. *Phytopathology*. 93:1014–1022.
- Cantwell, M.S., Stoddard, M., Strange, L. and Aegerter, B. 2007. Report to the California tomato commission. Tomato variety trials: postharvest evaluations for 2006. UCCE Fresh Market Tomato Variety Trial 2006 Postharvest Evaluation. UC Davis, Davis Ca. USA. 16 p.
- Carrillo, F.J.A., Montoya, R.T.J., García, E.R.S., Cruz, O.J.E., Márquez, Z.I., Sañudo, B.A.J. 2003. Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder y Hansen, en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el valle de Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:123-127.
- Castillo, F., Hernández, D., Gallegos, G., Méndez, M., Rodríguez, R., Reyes, A., Aguilar, C.N. 2010. *In vitro* antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Industrial Crops and Products* 32, 324–328.
- Casas, A., Viveros, J.L., Caballero, J., 1994. Etnobotánica mixteca: sociedad, cultura y recursos naturales en la montaña de Guerrero. Instituto Nacional Indigenista/Consejo Nacional para la Cultura y las Artes/Instituto Nacional Indigenista. Pp. 366
- Clark, A.M., Jurgens, T.M. and Hufford, C.D. 1990. Antimicrobial activity of juglone. *Phytotherapy Research*, Vol 4 (1). 11-14.
- Chobot, V., and Hadacek, F. 2009. Milieu-Dependent Pro- and Antioxidant Activity of Juglone May Explain Linear and Nonlinear Effects on Seedling Development. *J Chem Ecol.* 35(3). 383-390. DOI 10.1007/s10886-009-9609-5
- Corpas, H.C., Melero, V.J.M., Molinero, R.M.L., Zurera, M.C., Basallote, U.M.J. 2006. Characterization of isolates of *Fusarium* spp. Obtained from asparagus in Spain. *Plant Dis.* 90:1441-1451. DOI: 10.1094/PD-90-1441.
- Cruz, V.D.E., Verde, S.M.J., Salinas, G.N., Rosales, H.B., Estrada, G.I., Méndez, A.P., Carranza, R.P., González, G.M.T., Castro, G.J. 2008. Antimycobacterial Activity of *Juglans regia*, *Juglans mollis*, *Carya illinoensis* and *Bocconia frutescens*. *Phytother. Res.* 22, 557–559. DOI: 10.1002/ptr.2343.
- De la Rosa, L.A., Vázquez, F. A.A., Álvarez, P.E., Rodrigo, G. J., Medina, C.O.N., Ávila, N. A., González, R. S., Pedraza, Ch.J. 2014. Content of major classes of polyphenolic compounds, antioxidant, antiproliferative,

and cell protective activity of pecan crude extracts and their fractions. *Journal of Functional Foods* 7, 219–228.

- Diener, A.C. and Ausubel, F.M. 2005. Resistance to *Fusarium oxysporum* 1, a dominant *Arabidopsis* disease-resistance gene, is not race specific. *Genetics* 171:305–321.
- El- Khallal, S.M. 2007. Induction and Modulation of Resistance in Tomato Plants Against *Fusarium* Wilt Disease by Bioagent Fungi (Arbuscular Mycorrhiza) And/or Hormonal Elicitors (Jasmonic Acid& Salicylic Acid): 1- Changes in Growth, Some Metabolic Activities and Endogenous Hormones Related to Defence Mechanism. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1(4): 691-705. ISSN 1991-8178.
- FIRA, Tomate Rojo. 2017. Panorama Agroalimentario. Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial.
- García, J. M. D., Shagarodsky, T., Fresneda, J. A., Fundora, Y. H., González, J. 2007. Caracterización de especies del género *Fusarium* en el cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum*) en las provincias ciudad Habana y La Habana. *Temas de Ciencia y Tecnología. Notas* 32 Vol. 11, pp 63-66.
- Garrido, C.F., Cepeda, S.M., Hernández, C.F.D., Ochoa, F.Y.M., Cerna, C.E., Morales, A.D.M. 2014. Efectividad biológica de extractos de *Carya illinoensis*, para el control de *Meloidogyne incognita*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* Vol.5 Núm.7 p. 1317-1323.
- Georgé, S., Tourniaire, F., Gautier, H., Goupy, P., Rock, E., Caris, V.C. Changes in the contents of carotenoids, phenolic compounds and vitamin C during technical processing and lyophilisation of red and yellow tomatoes. *Food Chemistry* 124, 1603–1611.
- Gómez, J. R., Hernández, F. L. M., Cossio V. L. E., López A. J. G., Sánchez L. R. 2011. Enfermedades fungosas y bacterianas del cultivo de tomate en el estado de Nayarit. INIFAP, CIRPAC. Campo Experimental Santiago Ixcuintla. Folleto Técnico Núm. 19.
- González, M. S., Flores, L. M. L., Benavides, M. A., Flores, O. A. 2011. Actividad Inhibitoria del Extracto de *Heliopsis longipes* Sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Revista Mexicana de Fitopatología. Volumen* 29, Número 2, 146–153.
- González I., Arias Y., Peteira B. 2012. Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Tomate. *Revista Protección Vegetal. Volumen* 27, Número 1, 1-7.
- Guo, H., Di Gioia, F., Zhao, X., Ozores, H. M., Swisher, M.E., Hong, J., Kokalis, B.N., DeLong, A.N., Roskopf, E.N. 2017. Optimizing anaerobic soil disinfestation for fresh market tomato production: Nematode and weed control, yield, and fruit quality. *Scientia Horticulturae* 218, 105–116.

- Hanaa, F.R.M., Zeinab, A.A., Dawlat, A.S., Mervat, A.R.i., Srour, H.A.M. 2011. Effect of neem and willow aqueous extracts on fusarium wilt disease in tomato seedlings: Induction of antioxidant defensive enzymes. *Annals of Agricultural Science* 56,1–7.
- Hao, X. and Papadopoulos, A. P. 2004. Effects of Electrical Conductivity and Mineral Nutrition on Fruit Radial Cracking, Russeting, and Firmness of Greenhouse Tomatoes. *Acta horticulturae*. 633: 365-372.
- Harun, J., Labosky, Jr. P., 1985. Antitermic and Antifungal Properties of Selected Bark Extractives. *Wood and Fiber Science* 17, pp. 327–335. Journal series No. 6868.
- Hyun, J. K., Yong, K.C., Byung, R. M. 2001. Variation of the intergenic spacer (IGS) region of ribosomal DNA among *Fusarium oxysporum* formae specialis. *Journal of Microbiology* 39:265-272.
- Inoue Y., Hada, T., Shiraishi, A., Hirose, K., Hamashima, H., Kobayashi, S. 2005. Biphasic Effects of Geranylgeraniol, Teprenone, and Phytol on the Growth of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49(5) 1770-1774.
- Jasso de Rodríguez, D., Salas, M.E.J., Rodríguez, G. R., Hernández, C.F.D., Díaz, J.M.L.V., Sáenz, G. A., González, M.S., Flores, L.M.L., Villarreal, Q.J.A., Peña, R.F.M., Carrillo, L.D.A. 2017. Antifungal activity *in vitro* of ethanol and aqueous extracts of leaves and branches of *Flourensia* spp. against postharvest fungi. *Ind. Crops Prod.* 107, 499–508. doi:10.1016/j.indcrop.2017.04.054
- Jasso de Rodríguez, D., Trejo, G. F. A., Rodríguez, G. R., Díaz, J. M. L. V., Sáenz, G. A., Hernández, C. F. D., Villarreal, Q. J. A., Peña, R. F. M. 2015. Antifungal activity *In vitro* of *Rhus muelleri* against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Industrial Crops and Products* 75, 150-158. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.048>
- Kang G.D., Yunk C.K. and Lee H.S. 2003. Screening and comparison of antioxidant activity of solvents extracts of herbal medicines used in Korea. *Journal of Ethnopharmacology* 87, 231-236.
- Kinnunen, T. and Koskela, M. 1991. Antibacterial and antifungal properties of propylene glycol, hexylene glycol, and 1,3-butylene glycol in vitro. *ActaDerm. Venereol.* 71(2). 148-150.
- Koffi, E., Sea, T., Dodehe, Y., Soro, S., 2010. Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty three Ivorian plants. *J. Anim. Plant Sci.* 5, 550–558.
- Leslie, J.F. and Summerell, B.A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, 388 Pp.

- Li, L., Tsao, R., Yang, R., Liu, C., Zhu, H., Young, J.C. 2006. Polyphenolic Profiles and Antioxidant Activities of Heartnut (*Juglans ailanthifolia* Var *cordiformis*) and Persian Walnut (*Juglans regia* L.).
- Lira, D.L.K., Ramírez, M.M.V., Sánchez, L.V., Ramírez, L.M., Salas, C.R., Santos, S.N.F., Valadez, B.R., Hernández, C.B. 2014. Effect of crude plant extracts from some Oaxacan flora on two deleterious fungal phytopathogens and extract compatibility with a biofertilizer strain. *Frontiers in Microbiology. Food Microbiology*, Volume 5, Article 383, pp 1-10. doi: 10.3389/fmicb.2014.00383.
- Ma, L. J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., Kazan, K. 2013. *Fusarium* Pathogenomics. *Annual review of microbiology*, 67, 399-416.
- Mabkhot, Y.N., Al-Majid, A.M., Barakat, A., Al-Showiman, S.S., Al-Har, M.S., Radi, S., Naseer, N.M., Hadda, T.B. 2014. Synthesis and Biological Evaluation of 2-Aminobenzamide Derivatives as Antimicrobial Agents: Opening/Closing Pharmacophore Site. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 5115-5127.
- Manning, W. E. 1949. The genus *Carya* in Mexico. *Journ. Arnold Arbor.* 30: 425-432.
- Manning, W. E. 1957. The genus *Juglans* in Mexico and Central America. *Journ. Arnold Arbor.* 38: 121-150.
- Marín, R.M.C., Orchard, J., Seymour, B. 2002. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *J. Exp. Bot.* 53: 2115-2119.
- Martínez, R. F. E., Aíl, C. C. E., Cervantes, D. L., Hernández, M. L. G., Del Toro, S. C. L., Rueda, P. E.O., 2016. Hongos Fitopatógenos Asociados Al Tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) En La Zona Árida Del Noroeste De México: La Importancia De Su Diagnóstico. *European Scientific Journal.* Vol.12, No.18, 232–256.
- McGovern, R. J. 2015. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection.* 73, 78-92.
- McGranahan, G. and Leslie, C. 2012. Nuts In. *Fruit Breeding. Handbook of Plant Breeding* 8. Badenes, M.L. and Byrne, D.H. (eds). Springer Science & Business Media, pp 875. DOI 10.1007/978-1-4419-0763-9_22, ISBN1441907637, 9781441907639
- Mehrabian, S., Majd, A., Majd, I. 2000. Antimicrobial effects of three plants (*Rubia tinctorum*, *Carthamus tinctorius* and *Juglans regia*) on some airborne microorganisms. *Aerobiologia* 16, 455–458.
- Mejía, S., Vega, M., Valverde, J., López, J., Caro, J. 2009. Effect of wax application on the quality, lycopene content and chilling injury of tomato fruit. *J. Food Qual.* 32, 735–746.

- Migliori, C.A., Salvati, L., Di Cesare, L.F., Lo Scalzo, R., Parisi, M. 2017. Effects of preharvest applications of natural antimicrobial products on tomato fruit decay and quality during long-term storage. *Scientia Horticulturae* 222, 193–202.
- Mitchell, A.M., Strobel, G.A., Moore, E., Robison, R., Sears, J. 2010. Volatile antimicrobials from *Muscodoricrispans*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, 156, 270–277. doi: 10.1099/mic.0.032540-0
- Montes B. R., Cruz C. V., Martínez M. G., Sandoval G. G., García L. R., Zilch D. S., Bravo L. L., Bermúdez T. K., Flores M. H. E., Carvajal M. M. 2000. Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 18, número 002. pp. 125- 131.
- Morris, W.L. and Taylor, M.A. 2017. The Solanaceous Vegetable Crops: Potato, Tomato, Pepper, and Eggplant. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 2nd edition, Volume 3. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00129-5>
- Gu, M., Hui-Ping, C., Mou-Ming, Z., Xi, W., Bao, Y., Jiao-Yan R., Guo-Wan, S. 2015. Identification of antioxidant peptides released from defatted walnut (*Juglans Sigillata* Dode) meal proteins with pancreatin. *Food Science and Technology* 60, 213-220.
- Muñoz, R.J.J. 2009. Manejo del cultivo de tomate en invernadero. En: Castellanos, J.Z. (Ed.) *Manual de producción de tomate en invernadero*. Editorial Intagri. México. 458p.
- Muthuraman, M.S., Santharam, L., Ariraman, S., Pemaiah, B. 2012. Studies on anticancer and antimicrobial efficacy of *Anisochilus carnosus* Wallich – extract. *Int J Pharm Pharm Sci*. Vol 4(2). 132-135.
- Narain, N., Galvao, M.S., Santana, K.L., Silveira, J.J. 2010. Volatile compounds in tomato-based dried products. *Drying Technol*. 28:232–239.
- Narave, F.H. 1983. Flora De Veracruz, *Junglandaceae*. Instituto De Investigaciones Sobre Recursos Bioticos. Xalapa, Mexico. pp11-12.
- Nefzi, A., Jabnoun, K.H., Abdallah, R.A.B., Ammar, N., Medimagh, S.S., Haouala, R., Daami, R. M. 2017. Suppressing *Fusarium* Crown and Root Rot infections and enhancing the growth of tomato plants by *Lycium arabicum* Schweinf. Ex Boiss. extracts. *South African Journal of Botany* 113, 288–299.
- Nuez, V. F. 2001. *El cultivo del tomate*. Editorial Mundi- Prensa. Barcelona, España. 538 p.
- Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L., Pereira, J.A. 2008. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of

- walnut (*Juglans regia* L.) green husks. Food and Chemical Toxicology 46, 2326–2331.
- Orcutt, D.M. and Nilsen, E.T. 2000. Influence of plant phytopathogens on host physiology. In: Orcutt, D.M. and Nilsen, E.T. (eds), The physiology of plants under stress. Soil and Biotic Factors., pp: 239-236. John Wiley & Sons, Inc. VSA.
- Osorio, E., Flores, M., Hernández, D., Ventura, J., Rodríguez, R., Aguilar, C.N. 2010. Biological efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts shell (*Carya Illinoensis*), pomegranate husk (*Punica granatum*) and creosote bush leaves (*Larrea tridentata* Cov.) against plant pathogenic fungi. Industrial Crops and Products 31, 153–157.
- Pane, C., Fratianni, F., Parisi, M., Nazzaro, F. 2016. Control of *Alternaria* post-harvest infections on cherry tomato fruits by wild pepper phenolic-rich extracts. Crop Protection 84, 81-87.
- Pérez, C.E. 2001. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Juglandaceae. Fascículo 96. Publicado por el Instituto de Ecología A.C. Centro Regional del Bajío. Editores: Jerzy Rzedowski y Graciela Calderón de Rzedowski. Producción Editorial: Rosa Ma. Murillo. ISSN 0188-5170, ISBN 968-7863-89-7
- Pitt J. I. and Hocking A. D. 2009. Fungi and Food Spoilage. 3rd edition. London, Springer.
- Pryor, B.M., y Michailides, T.J., 2002. Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. Phytopathology 92, 406-416.
- Rajeswari, G., Murugan, M., Mohan, V.R. 2012. GC-MS analysis of bioactive components of *Hugonia mystax* L. (linaceae). Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences, 3(4), 301-308.
- Ramaiah, A. K. and Garampalli, R. K. H. 2015. *In vitro* antifungal activity of some plant extracts against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Asian Journal of Plant Science and Research, 5(1): 22-27.
- Ramírez, H., Zavala, R.M.G., Sanchez, L.A., Aguilar, Z.P., Aguilar, G.C.N., Rodriguez, G.R., Jasso, C.D., Zermeño, G.A., Villarreal, Q.J.A., López, F.A. 2016. Tomato Responses to Bioregulators Grown under Greenhouse Conditions. International Journal of Plant & Soil Science, 10(6): 1-13
- Réus, G.Z., Stringari, R.B., De Souza, B., Petronilho, F., Dal-Pizzol, F., Hallak, J.E., Zuardi, A.W., Crippa, J.A., Quevedo, J. 2010. Harmine and imipramine promote antioxidant activities in prefrontal cortex and hippocampus. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 3(5), 325-331. doi: 10.4161/oxim.3.5.13109

- Robbins, K.S., Gong, Y., Wells, M.L., Greenspan, P., Pegg, R.B. 2015. Reprint of "Investigation of the antioxidant capacity and phenolic constituents of U.S. pecans". *Journal of Functional Foods* 18, 1002–1013.
- Rodríguez, P.A.T., Ramírez, A.M.A., Bautista, B.S., Cruz, T.A., Rivero, D. 2012. Actividad antifúngica de extractos de *Acacia farnesiana* sobre el crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Revista Científica UDO Agrícola* 12 (1): 91-96.
- Rodríguez, D.A. y Montilla, J.O. 2002. Disminución de la marchitez causada por *Fusarium* en tomate con extracto de *Citrus paradisi*. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* No. 63 p. 46-50.
- Rodríguez-Jasso, R.M., Mussato, S.I., Pastrana, L., Aguilar, N.C., Teixeira, J., 2014. Chemical composition and antioxidant activity of sulphated polysaccharides extracted from *Fucus vesiculosus* using different hydrothermal processes. *Chem. Papers* 68, 203–209.
- Rotem J. 1998. *The Genus Alternaria: Biology, Epidemiology and Pathogenicity*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, 326 p.
- Salazar, R., Pozos, M.E., Cordero, P., Perez, J., Salinas, M.C., Waksman, N. 2008. Determination of the Antioxidant Activity of Plants from Northeast Mexico. *Pharmaceutical Biology*, Vol. 46, No. 3, pp. 166–170.
- Sánchez, C. M. 2001. Manejo De enfermedades del tomate. Curso del INCAPA "Manejo integrado de plagas y enfermedades en tomate, chile y papa". Guadalajara, Jalisco, México. Pp.22-39.
- Sandoval, B. C. 2004. Manual Técnico. Manejo Integrado de Enfermedades en Cultivos Hidropónicos. FAO, Oficina Regional Para América Latina y el Caribe. 53 p.
- San Martín, H.C., Ordaz, C.V.M., Sánchez, G.P., Beryl Colinas, L.M.T., Lizette Borges, G.L. 2012. Calidad de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) producido en hidroponía con diferentes granulometrías de tezontle. *Agrociencia* Vol.46, No.3, 243-254
- Schillberg, S., Zimmermann, S., Zhang, M. Y. and Fischer, R. 2001. Antibody-based resistance to plant pathogens. *Transgenic Research*. 10:1-12.
- Schinzoumka, P.A., Jean, A.N., Valère, T., 2016. Effects of *Acacia albida* and *Crotalaria retusa* on the growth and development of tomato. *Journal of Agriculture and Ecology Research International* 8, 1–9.
- Senter, S.D., Horvat, R.J., Forbus, W.R. 1983. Comparative GLC-MS Analysis of Phenolic Acids of Selected Tree Nuts. *Journal of food science*. Volume 48, 798-799.

- Sharma, A., Rajendran, S., Srivastava, A., Sharma, S., Kundu, B. 2016. Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. Journal of Bioscience and Bioengineering. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.09.011>.
- SIAP. (2016). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Atlas Agroalimentario. <http://www.siap.gob.mx/>. <http://www.gob.mx/siap/articulos/atlas-agroalimentario-2016-siap-presenta-los-exitos-del-campo-mexicano>. Acceso 15.06.17.
- Silva, A. G., Lagunes, T. A., Rodríguez, M. J. C., Rodríguez, L. D. 2002. Insecticidas vegetales: una vieja y nueva alternativa para el manejo de plagas. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica) No. 66 p. 4-12.
- Singh, V.K., Singh, H.B., Upadhyay, R.S. 2017. Role of fusaric acid in the development of '*Fusarium wilt*' symptoms in tomato: Physiological, biochemical and proteomic perspectives. Plant Physiology and Biochemistry 118, 320-332.
- Snowdon A.L. 1991. A color atlas of postharvest diseases and disorders of fruits and vegetables. Vol 1 Fruits CRC Press London. 302 p.
- Stephens, H.A. 1973. Woody plants of the North Central Plains. University of Kansas Press. Lawrence, KS.
- Stone, D. E. 1997. Juglandaceae. Flora of North America 3: 416-428.
- Sumalan, R. M., Alexa, E., Poiana, M. A. 2013. Assessment of inhibitory potential of essential oils on natural mycoflora and *Fusarium* myco- toxins production in wheat. Chemistry Central Journal, 7(1), 1-12.
- Thanh, N.D. and Hoai, L.T. 2012. Synthesis, Structure and Antioxidant Activity of (Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl) thiosemicarbazones of Substituted Benzaldehydes. Indian Journal of Pharmaceuticas Sciences 74 (1), 54-62.
- Tieman, D.M., Loucas, H.M., Kim, J.Y., Clark, D.G., Klee, H.J. 2007. Tomato phenylacetaldehyde reductases catalyze the last step in the synthesis of the aroma volatile 2-phenylethanol. Phytochemistry 68:2660-2669.
- Tirmenstein, D.A. 1990. *Juglans microcarpa*. In: Fire Effects Information System. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fire Sciences Laboratory (Producer). Available: <http://www.fs.fed.us/database/feis/> (2017, December 7).
- Troncoso, R.R. and Tiznado, H.M.E. 2014. *Alternaria alternate*. Chapter 5. Black Rot, Black Spot. In Postharvest Decay: Control Strategies. Elsevier Inc. pp 147-187. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00005-3>

- Upadhyay, V., Kambhoja, S., Harshaleena, K. 2010. Antifungal Activity and Preliminary Phytochemical Analysis of Stem Bark Extracts of *Juglans regia* linn. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives; 1(5):442-447. ISSN 0976 – 3333
- USDA, NRCS. 2008. The PLANTS database. National Plant Data Center, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA. <http://plants.usda.gov>, acceso 20 Septiembre 2017.
- Vaishnavi, B., Rameshkumar, G., Rajagopal, T., Ponmanickam, P. 2015. Evaluation of Bactericidal and Fungicidal Properties of Silver Nanoparticles Fabricated Using *Jasminum sambac* (L.). Global Journal of Biotechnology & Biochemistry. 10(1). 22-31. DOI: 10.5829/idosi.gjbb.2015.10.01.9215
- Vázquez, V.P., García, L.M.Z., Navarro, C.M.C., García, H.D. 2015. Efecto de la composta y té de composta en el crecimiento y producción de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en invernadero. Revista Mexicana de Agronegocios, vol. XIX, núm. 36, pp. 1351-1356
- Villa, M. A., Pérez L. R., Morales, M. H. A., Basurto, S. M., Soto, P. J. M., Martínez, E. E. 2015. Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. Acta Agronómica, vol. 64, núm. 2, pp. 194-205.
- Wang, H., Li, G., Wu, Y., Yuan, F., & Chen, Y. 2014. Development of an indirect competitive immunoassay for walnut protein component in food. Food Chemistry, 147, 106–110.
- Wang, Y.N., Shi, G.L., Zhao, L.L., Liu, S.Q., Yu, T.Q., Clarke, S.R., Sun, J.H. 2007. Acaricidal Activity of *Juglans regia* Leaf Extracts on *Tetranychus viennensis* and *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae). Journal of Economic Entomology, 100(4):1298-1303. Published By: Entomological Society of America.
- Wianowska, D., Garbaczewska, S., Cieniecka-Roslonkiewicz, A., Dawidowicz, A.L., Jankowska, A. 2016. Comparison of antifungal activity of extracts from different *Juglans regia* cultivars and juglone. Microbial Pathogenesis 100, 263-267.
- Wong, P. J.E., Contreras, C. J., Rodríguez, H. R., Carrillo, I. M. L., López, I.L., Nevárez, M. G.V., Aguilar, C.N. 2015. Total phenolic content, in vitro antioxidant activity and chemical composition of plant extracts from semiarid Mexican region. Asian Pacific journal of Tropical Medicine, pag.104-111
- Yavuz, B. and Arslan, U., 2013. Antifungal activity of some plant extracts against phytopathogenic fungi. Journal of Food, Agriculture & environment Vol.11 (3&4): 704-709.

- Yang, D., Li, S., Li, S., Li, J., Sun, M., Jin, Y. 2009. Effect of juglone from *Juglans mandshurica* bark on the activity of wood decay fungi. *Forest Products Journal* vol. 59, no.9.
- Zabka, M. and Pavela, R. 2013. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere* 93, 1051-1056.
- Zhang, S., P. D. Roberts, R. J. McGovern, and L.E. Datnoff. 2011. *Fusarium* Crown and Root Rot of Tomato in Florida. Publication PP-52. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.