



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Ingeniería Agroindustrial

“Evaluación de actividad antimicrobiana de extractos metanólicos de timbe (*Acaciella angustissima* Mill.), en ajo contra *Sclerotium cepivorum* Berk.”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el título de
Ingeniero Agroindustrial

Presenta:

Ana Karen Martínez Sánchez

Dirigido por:

Dr. Moisés Alejandro Vázquez Cruz

SINODALES

Dr. Moisés A. Vázquez Cruz
Presidente

Firma

Dr. Ramón G. Guevara González
Secretario

Firma

Dra. Rosalía V. Ocampo Velázquez
Vocal

Firma

MC. Adán Mercado Luna
Suplente

Firma

Dr. Enrique Rico
Suplente

Firma

Dr. Aurelio Domínguez González
Director de la Facultad
Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre de 2013
México.

RESUMEN

México se encuentra dentro de los primeros 10 países exportadores de ajo en el mundo. Del total de la producción de ajo en México el 27% es exportado (equivalente a 21 millones de dólares), sin embargo para el periodo 2001-2011 la superficie dedicada a este cultivo se redujo 30%, respecto al periodo 1990-2000, perdiendo 2.270 ha (FAO, 2012). Una de las causas por las que se abandonó del cultivo de ajo es la enfermedad conocida como pudrición blanca, causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk., (Delgadillo *et al.* 2000). Con el objetivo de encontrar nuevos métodos de control para la pudrición blanca en ajo, se evaluó la capacidad antimicrobiana del extracto metanólico de vainas de timbe (EMVT) y su fitotoxicidad. Se estableció un experimento *in vitro* cuantificándose el efecto del EMVT sobre el crecimiento micelial del hongo, se usó el fungicida Captan® como control positivo. Se establecieron además experimentos *in vivo* utilizando plantas de ajo como hospederas de *S. cepivorum*, la unidad experimental constó de 8 plantas. En el primer experimento *in vivo* se evaluó el uso preventivo del EMVT (desarrollado en cámara de ambiente controlado y en campo bajo malla sombra). Se probó un factor, concentración del extracto (CE) con dos niveles (100 y 300 ppm) en un diseño de bloques completos al azar y una repetición. En el segundo, se evaluó el EMVT como correctivo, y en el tercero se evaluó su fitotoxicidad. En estos dos últimos experimentos se probaron dos factores, concentración del extracto (CE) con dos niveles (100 y 300 ppm) y frecuencia de aplicación (FA) con tres niveles con una aplicación al inicio (AI), una aplicación cada 15 días (C15); y una aplicación cada 8 días (C8), en base a una modificación de Delgadillo (*et al.* 2002), los tratamientos se distribuyeron en bloques completos al azar con una repetición. En las pruebas *in vitro* el EMVT retardó el porcentaje de germinación de los esclerocios hasta 80% a una concentración de 100 ppm. En las pruebas *in vivo* la severidad de la enfermedad disminuyó significativamente con las aplicaciones del EMVT a 100 ppm, además, este no mostró fitotoxicidad.

Palabras Clave: Timbe, *Acaciella*, extracto metanólico, *Sclerotium cepivorum*, *Allium sativum*.

SUMMARY

Mexico is within the first 10 garlic exporters in the world. Twenty seven percent (equivalent to 21 million) the total garlic production in Mexico is exported however for the period 2001 to 2011 the area devoted to this crop fell 30 % over the 1990-2000 period, losing 2,270 ha (FAO , 2012). One of the reasons why the crop was abandoned garlic is the disease known as white rot , caused by the fungus *Sclerotium cepivorum* Berk., (Delgadillo *et al.* 2000). In order to diversify the methods to control for this disease, it was evaluated antimicrobial capacity of methanolic extract of timbe pods (METP) and phytotoxicity. An experiment *in vitro* quantified the METP effect on mycelial growth, it used the fungicide Captan® as a positive control. It was also established *in vivo* experiments using garlic as *S. cepivorum* host, the experimental unit consisted of 8 plants. In the first *in vivo* experiment METP was evaluated using as preventive (developed in controlled environment chambers and field under shade). It proved one factor, concentration of the extract (CE) with two levels (100 and 300 ppm) in a complete block design random and one repeat. In the second, it was evaluated the METP as corrective, and in the third it was evaluated for phytotoxicity. In the latter two experiments were tested two factors, concentration of the extract (CE) with two levels (100 and 300 ppm) and frequency of application (FA) with three levels with an application to start (AI), an application every 15 days (E15) and an application every 8 days (E8), based on a modification of Delgadillo (*et al.* 2002), treatments were distributed in a randomized complete block random design with one repetition. *In vitro* tests the METP retarded germination percentage of sclerotia to 80 % at a concentration of 100 ppm. *In vivo* tests, the disease severity was significantly decreased with METP applications to 100 ppm, moreover, this showed no phytotoxicity.

Key words: Timbe, *Acaciella*, methanolic extract, *Sclerotium cepivorum*, *Allium sativum*.

DEDICATORIAS

A:

Mi Padre

Fuente de agua viva.

Mi familia

Camilo, Emma, Carla, Miguel.

Mis amigos

Héctor, Hernán, Toño, Edgar, Pablo y Javier.

AGRADECIMIENTOS

A:

Dr. Ramón G. Guevara G., Dr. Moisés A. Vázquez C. y Dr. Gustavo Cornejo, Dr. Enrique Rico.

Por sus comentarios, material y tiempo invertidos durante la realización de este trabajo.

Instituto Tecnológico de Celaya, Departamento de Ingeniería Molecular

Por su asesoría en la ejecución de las pruebas de laboratorio y por el material microbiológico.

Ángel, Manuel y Miguel

Por su ayuda en las pruebas de campo.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatorias.....	iii
Agradecimientos	iv
Índice general.....	v
Índice de tablas	vi
Índice de figuras.....	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades	1
1.2. Descripción del problema	3
1.3. Justificación	4
1.4. Hipótesis	4
1.5. Objetivos	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1. Ajo (<i>Allium sativum</i> L.)	5
2.2. Pudrición Blanca (<i>Sclerotium cepivorum</i> Berk.)	8
2.3. Manejo integrado de la pudrición blanca	12
2.4. Compuestos bioactivos	16
2.5. Timbe (<i>Acaciella angustissima</i> Mill.)	21
III. METODOLOGÍA Y MATERIALES.....	26
3.1. Material biológico	26
3.2. Siembra de ajo	26
3.3. Extracción metanólica y preparación de soluciones	27
3.4. Ensayos <i>in vivo</i>	32
3.5. Evaluación de efecto antimicrobiano <i>in vitro</i>	34
3.6. Diseño experimental y análisis estadístico	35
IV. RESULTADOS.....	36
4.1. Extracción de bioactivos.....	36
4.2. Evaluación <i>in vitro</i>	36
4.3. Ensayos <i>in vivo</i>	37
V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	44
5.1. Extracción de bioactivos.....	44
5.2. Evaluación <i>in vitro</i>	44
5.3. Evaluación <i>in vivo</i>	46
REFERENCIAS.....	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Promedio del peso seco de las plantas tratadas con EMVT en los tratamientos preventivos.....	39
Tabla 2. Porcentaje de plantas cloróticas (al día 28 después de iniciado el experimento).	41
Tabla 3. Porcentaje de plantas con maceración radicular (día 35-37 después de iniciado el experimento).	41
Tabla 4. Porcentaje de plantas cloróticas en la prueba de fitotoxicidad.	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Fig. 1. Plantas mostrando síntomas severos (aéreos) de pudrición blanca (Velázquez <i>et al.</i> 2001).	10
Fig. 2. Bulbos de ajo con micelio y esclerocios <i>Sclerotium cepivorum</i> (Velázquez <i>et al.</i> 2001). 11	11
Fig. 3. A) Estructura básica de un fenol B) Estructura de un flavonoide.	20
Fig. 4 Distribución de <i>Acaciella angustissima</i> en el continente americano (Fuente: <i>Biodiversity occurrence data published by Accessed through GBIF Data Portal, data.gbif.org, 2012-09-03</i>).	23
Fig. 5. Fruto inmaduro (A) y maduro (B) de <i>Acaciella angustissima</i> (Mill.) Britton & Rose. <i>var. angustissima</i> (Csurhes, 2009).....	24
Fig. 7. Maceración de 50 g de vainas molidas (sin semilla), en 400 mL de metanol al 70 %, por cada matraz. B. Filtración del metanol resultante del recambio diario.....	30
Fig. 9. Extracto de timbe sobre papel aluminio luego de la separación por rotavapor.	31
Fig. 10. Rotavapor utilizado para la separación de fases sólida-líquido: A. Bomba de vacío. B. (der-izq) tina con control de temperatura, rotor acoplado a refrigerante (al que se acopla el matraz con solvente a separar), tina con recirculante.	31
Fig. 10. Desarrollo de micelio en tres tipos de medio, al tercer día de incubación (15-20°C): A) PDA, B) PDA + 1 mL EMVT 100 ppm y C) PDA + EMVT 300 ppm.....	36
Fig. 11. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo crecido en diferentes medios (PDA + EMVT 100 ppm, PDA + EMVT 300 ppm, PDA+ Captan®. La concentración que reportó mayor porcentaje de inhibición fue 100 ppm.....	37
Fig. 12. Planta del tratamiento testigo (inoculada, sin aplicación de extracto), se puede observar el sistema radicular destruido en su totalidad.	37
Fig. 13. Planta del tratamiento con extracto a 100 ppm. A. Hojas sanas, no se observó clorosis ni marchitamiento. B. Bulbo sin pudrición ni presencia de micelio o esclerocios. C. Sistema radicular sano (raíces abundantes, blancas), menos del 25% de las raíces sufrió maceración.	38
Fig. 14. Planta del tratamiento con extracto a 300 ppm. A. Parte aérea mostrando síntomas de marchitez y clorosis. B. Bulbo y tallo con pudrición. C. Sistema radicular con maceración.	38
Fig. 15. Planta con una aplicación de extracto a 100 ppm post-inoculación. Observación al día 28 después de iniciado el experimento. Las raíces que sufrieron maceración. Se puede observar la maceración de las raíces y parte del tallo.....	40
Fig. 16. Plantas con extracto a 300 ppm, pos-inoculación (una aplicación cada 8 días). Observación al día 28 después de iniciado el experimento (A). Caso más severo de la enfermedad (B), donde se observa la destrucción total del sistema radicular de una planta.	40
Fig. 17. Control negativo: plantas inoculadas sin aplicación de EMVT ni Captan presentan. A. Se observa clorosis en el 100% de las hojas. B. Las flechas indican las zonas donde el tallo y las raíces sufrieron maceración. Observación al día 28 después de iniciado el experimento.	42

Fig. 18. A. Plantas sin aplicación del extracto, sin inocular. B Plantas con aplicaciones del extracto a 100 ppm (en las tres frecuencias de aplicación). C. Plantas con aplicaciones del extracto a 300 ppm (en las tres frecuencias de aplicación)..... 42

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

Los compuestos bioactivos de plantas, conocidos también como fitoquímicos son metabolitos secundarios con el potencial de inducir efectos en el organismo de los seres vivos (Palencia, 2008), es decir, presentan actividad biológica, actuando como antioxidantes, antimicrobianos, anticancerígenos, entre otras funciones (Choque *et al.* 2011). Dentro de los metabolitos secundarios destacan los compuestos fenólicos, en especial los compuestos aromáticos (de mayor abundancia en la naturaleza). De éstos, los flavonoides son de particular interés por las múltiples aplicaciones que se han descubierto, tanto en la industria farmacéutica y alimentaria como en la agroindustria (Martínez *et al.* 2002; Martínez, 2005; Martino, 2000).

Una de las especies vegetales estudiada por su contenido en compuestos fenólicos es el timbe (*Acaciella angustissima*), perteneciente a la familia *Leguminosae*. El timbe es una leguminosa, originaria de Belice, América Central. Se distribuye desde el sur de los Estados Unidos hasta Colombia, y la mayor diversidad está concentrada en la costa Mexicana del Pacífico (Rico y Rodríguez, 1998; Rico y Bachman, 2006; Rincón y Gutiérrez, 2008). Vargas (2011) reportaron que extractos de timbe poseen actividad antimicrobiana (inhibición del crecimiento micelial en dos hongos fitopatógenos), concluyendo que dicha actividad biológica se debe a la presencia de compuestos fenólicos, por lo cual ésta especie representa una fuente alternativa de compuestos para el control de microorganismos fitopatógenos en frijol. El mecanismo de acción consiste en la desintegración de la membrana celular, desestabilización de la bomba de protones, del flujo de electrones, del transporte activo, la coagulación del contenido celular y se unen a enzimas (Vargas, 2011).

Por otro lado, el ajo es uno de los cultivos de mayor importancia en México por el valor de producción y por ser un importante generador de empleos directos, se estima que contribuye con cerca de 120,000 a 412,300 jornales por ciclo de cultivo (SIAP, 2010; Olvera *et al.* 1999; Velásquez *et al.* 2009).

En México, específicamente en El Bajío, se tiene registrado el cultivo de ajo desde principios del siglo XX, adquiriendo gran importancia económica a mediados del mismo, cuando

se registraron las primeras exportaciones que para 1940 superaban las 2 mil toneladas (ASERCA, 1999). A partir de esa fecha éstas fueron en aumento, y de 1961 a 2010 México se ha posicionado entre los primeros diez países exportadores de esta hortaliza de bulbo a nivel mundial, dedicando a este rubro, en promedio cada año, el 29% de la producción nacional. Ésta ha tenido un incremento del 408% de 1961 a 2011, aunque es baja si se compara con el 556%, 548% y 1460% de China, Argentina y Estados Unidos, respectivamente. Y si bien el rendimiento en México está por debajo de otros países exportadores, el mismo se ha incrementado 282% de 1961 a 2011 (crecimiento cercano al de China, que para el mismo periodo fue de 276%). Sin embargo, las exportaciones mexicanas de ajo tuvieron un descenso al pasar de 34,358 toneladas (US\$30.1 millones) en 1987, a 12,370 toneladas (US\$12.6 millones) en 2010 (FAOSTAT, 2012).

Lo anterior refleja la problemática en la producción mexicana de ajo. En primer lugar se tiene un bajo rendimiento (23, 18.7 y 9.8 ton/ha de China, EUA y Argentina, respectivamente, contra 10 ton/ha de México, en 2011). Y en segundo lugar, actualmente se dedican a este cultivo tan solo 5,675 ha (un área pequeña comparada con las 83.3, 17.7, y 10.2 miles de hectáreas en China, Argentina y Estados Unidos, respectivamente, en 2011). Cabe destacar que el área dedicada a la producción de ajo se había mantenido entre 5,100 y 8,600 ha, entre 1961 y 2000 (con una máxima histórica de 9,304 ha en 1997), sin embargo ésta área disminuyó hasta oscilar entre 4,784 y 5,675 ha, de 2002 a 2011. La mayor pérdida se registra en el periodo 2001-2011, cuando la superficie dedicada a este cultivo se redujo un 30%, respecto a la década 1990-2000, perdiendo cerca de 2,270 ha (FAOSTAT, 2012).

Uno de los factores que influyen directamente en la proporción de área cultivada y el rendimiento del ajo, es la sanidad vegetal y concretamente la pudrición blanca. Ésta es la enfermedad más destructiva y persistente a nivel mundial cuyo agente causal es el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk., que afecta a todo el género *Allium* (ajo, cebolla, puerro, entre los de mayor importancia económica). En ajo, produce pérdidas de hasta el 100% del cultivo, por su amplia distribución y su alta latencia (Sepúlveda *et al.* 2013; Delgadillo *et al.* 2000).

La pudrición blanca puede aparecer desde el estado de plántula cuando éstas nacen de semillas infectadas. Los síntomas que se presentan en las plantas infectadas son, clorosis, marchitamiento y caída de las hojas inferiores. Al arrancar una planta puede observarse que la

base de las hojas, el bulbo y las raíces están necróticos y cubiertos por una capa blanca (micelio). La pudrición del bulbo es suave y acuosa. Los síntomas en el follaje se presentan una vez que el patógeno ha crecido y penetrado a la base del tallo o del bulbo (Luna *et al.* 2001). Este hongo es un pobre competidor contra los microorganismos saprófitos del suelo, y de acuerdo a Scott y Coley citados por Papavizas (1972) el hongo no sobrevive en el suelo sino en forma de esclerocios (estructuras esféricas de 0.2-0.5 mm de diámetro, con pigmentación oscura).

Dentro del manejo integrado de la pudrición blanca se recomienda de manera preventiva usar semilla certificada o producir semilla en áreas libres de la enfermedad, desinfección de maquinaria y equipo y desinfección de semilla con agroquímicos. Para tratar el suelo, en México se recomienda el uso de tebuconazole cuando la densidad del patógeno sea menor o igual a 20 esclerocios por cada kilogramo de suelo. Como práctica correctiva, además del uso de agroquímicos (inhibidores de la síntesis de esteroides), se han tenido resultados positivos con el uso de microorganismos antagonistas (*Sclerotium cepivorum* es un pobre competidor contra los microorganismos saprófitos). Entre otras prácticas se encuentra el uso de compuestos bioactivos, principalmente como estimulantes de la germinación de esclerocios en ausencia del cultivo, logrando disminuir la densidad de esclerocios y por ende reducir la incidencia de la pudrición blanca (Aguilera *et al.* 2002; Argüello *et al.* 2009; Delgadillo *et al.* 2003; Sepúlveda *et al.* 2010).

1.2. Descripción del problema.

En México la pudrición blanca afectan directamente el rendimiento y calidad del ajo (Delgadillo *et al.* 2000), además ha provocado una disminución en la superficie sembrada (Velázquez *et al.* 2001), lo cual se debe a que el agente causal puede permanecer en estado de latencia hasta por 20 años (Velázquez y Medina, 2004). En varias partes de los campos infestados habían sido reportadas pérdidas cercanas al 100% (Papavizas, 1972; Pérez *et al.* 2002). Y aunque desde 1984 se iniciaron esfuerzos para diseñar y ejecutar el control integrado de esta enfermedad (Espinosa *et al.* 2003), no se ha podido consolidar un paquete tecnológico para ajo que cubra esta necesidad.

1.3. Justificación

El manejo inadecuado de la pudrición blanca ha tenido como consecuencias un bajo rendimiento y calidad en el producto, el abandono definitivo de estas tierras de cultivo, la disminución gradual del área sembrada, lotes que hoy son fuente de contaminación, 150 lotes tan solo en Aguascalientes en 2001 (Velázquez *et al.*, 2001; Velázquez y Medina, 2004a; Velázquez y Medina, 2004b). A través del presente trabajo se propone una alternativa a esta problemática, al evaluar los compuestos bioactivos del extracto de timbe como antimicrobianos contra el hongo causante de la pudrición blanca en ajo, en base a la información acerca de la actividad biológica de timbe contra otros fitopatógenos (Vargas, 2011). Esta alternativa ofrece la ventaja de utilizar una mezcla de compuestos (Russo *et al.* 2013) y no un solo compuesto, lo que reduce el riesgo del desarrollo de resistencia por parte de *Sclerotium cepivorum*.

1.4. Hipótesis

Los extractos metanólicos obtenidos de las vainas sin semilla provenientes de timbe (*Acaciella angustissima* Mill.) poseen actividad antifúngica, debido a la presencia de compuestos bioactivos flavonoides.

1.5. Objetivos

Objetivo general: Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto metanólico, obtenido por el método de maceración, de vainas sin semilla de timbe (*Acaciella angustissima* Mill.), mediante pruebas *in vitro* e *in vivo*, en el control del hongo *Sclerotium cepivorum* Berk, en ajo.

Objetivos específicos:

- Extraer compuestos fenólicos de las vainas de timbe (*Acaciella angustissima* Mill.) mediante el método de maceración.
- Determinar la capacidad antifúngica del extracto en pruebas *in vitro* e *in vivo* a diferentes concentraciones y frecuencias de aplicación, esto último para el caso de las pruebas *in vivo*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A continuación, se expondrán los aspectos centrales que permitan comprender la problemática originada por la pudrición blanca en ajo a nivel nacional, así como su manejo a base de los extractos de plantas.

2.1. Ajo (*Allium sativum* L.).

El ajo pertenece a la familia Liliaceae, género *Allium*. Etimológicamente la palabra *allium*, se cree que proviene de la palabra celta *all*, que significa "picante, caliente". Y el término *sativum* es una contracción de *seminativum* que significa "que se puede sembrar". Esta familia está formada mayoritariamente por hierbas provistas de bulbos, rizomas o tubérculos. Además del género *Allium* (cebollas, puerros, ajos, etc.), agrupa a otros como el género *Aloe* y *Tulipa* (de los tulipanes).

El ajo es una hortaliza de bulbo, éste es conocido como "cabeza" y se conforma de 8 a 12 bulbillos (dientes) que son además los órganos de propagación (semillas) de la planta. El tallo es subterráneo, en forma de disco. Se consume fresco y a través de diferentes productos derivados de procesos industriales como aceite, polvo, medicamentos, extractos, entre otros. (Espinosa *et al.* 2003).

Los bulbillos (dientes de ajo) son yemas axilares de las hojas y están constituidos por 2 hojas verdaderas y 1 yema vegetativa. La hoja exterior consiste sólo en una vaina foliar lignificada y seca, forma una funda protectora y tiene una superficie fibrosa. Esta hoja externa (denominada protectora) es la responsable del color característico de cada cultivar. Al interior de la funda protectora se encuentra la hoja de acumulación de reservas sin lámina, la cual representa entre el 90 y 95% del peso total del diente, al interior de ésta y en su base, se encuentra la yema que crecerá en la temporada siguiente, denominada hoja de brotación o "germinadora" que es delgada y sin lámina. Las raíces son fibrosas y su volumen más activo se ubica entre los 20 cm y 30 cm de profundidad. Las hojas son planas y de sección longitudinal en forma de "v". Hojas y bulbillos están unidos por su base al tallo subterráneo que tiene forma de disco. En la madurez, el tallo principal, las raíces y el follaje se secan y mueren. (Aljaro *et al* 2009; González, 2004).

El ajo es un bulbo, procedente del centro y sur de Asia desde donde se propagó al área mediterránea y de ahí al resto del mundo. Tiene flores pequeñas, blancuzcas, de seis piezas, dispuestas en umbelas. El fruto es una cápsula que encierra unas semillas negras arriñonadas. El ajo comúnmente se cultiva desde el bulbo, posee olor y sabor intensos y característicos, está cubierto por una envoltura papirácea y consta de varias piezas fáciles de separar llamadas dientes, además contiene una sustancia denominada alína, que por acción de un fermento contenido en ellos se transforma en desulfuro de alilo, cuyo resultado es el olor característico de los ajos, su reproducción es asexual y sexual (SIAP, 2012).

No es una planta exigente en clima, aunque adquiere un sabor más picante en climas fríos. Sin embargo, para un crecimiento vigoroso la planta requiere temperaturas medias nocturnas inferiores a 16°C (entre 8°C y 20°C) y medias mensuales entre 13°C y 24°C. Temperaturas nocturnas elevadas (por encima de 20°C) promueven un crecimiento en forma de mata estrellada y de color amarillento (González, 2004).

Prefiere los suelos arenosos, arcillosos, calcáreos, fértiles, permeables y trabajados profundamente con mucha anticipación a la siembra. El diente se introduce con la mano en el suelo a una profundidad suficiente para que éste lo cubra unos 2 ó 3 cm o no sea visible y siempre con la base hacia abajo, también se los puede colocar acostados pero nunca invertidos, también existen máquinas sembradoras de ajo, puede sembrarse en el fondo del surco, en las costillas del surco o en el camellón del surco. El distanciamiento de los surcos puede variar de 50 a 60 cm de ancho y cuando se siembra en camas levantadas el ancho de éstas varía de 1 a 1.2 m de ancho y separadas 50 cm entre sí. En algunos lugares se siembran los dientes distanciados de 12 a 15 cm hasta 20 cm y de 4 a 5 hileras en el fondo del surco, lo que hace poblaciones de 500 a 600 mil plantas por hectárea. Cada cultivo tiene su índice de cosecha, la mayoría muestra clorosis, adelgazamiento del cuello y dureza del bulbo. La cosecha puede ser manual o con bayonetas o ganchos. Respecto a su consumo el ajo se usa en las cocinas de casi todos los países en salsas, sopas, pescados y mariscos, carnes y vinagretas. Este bulbo es uno de los condimentos más usados en la cocina mexicana, siempre ha sido muy apreciado, pues además de su aroma se le han atribuido propiedades curativas aunque es un alimento de difícil digestión (SIAP, 2012). El ajo fresco y seco (cosechado), 180-120 días, se conserva en ambiente frío 0°C y con una humedad relativa de 65 a 70%. (Ramírez, 2000).

El ajo, como ya se mencionó antes, es básicamente un órgano de reserva, posee un alto contenido de humedad y su capa externa (yema) es poco resistente a la penetración de microorganismos como los hongos, por lo anterior el ajo es fácilmente atacado por hongos desde la etapa de siembra (penetrando con facilidad al bulbillo) y durante todo su desarrollo, hasta después de la cosecha (si no se tienen las medidas adecuadas respecto a humedad y temperatura), debido a la humedad presente en el bulbillo y en el bulbo. Entre las enfermedades que se transmiten por el bulbillo el moho azul (*Penicillium hirsutum*), pudrición basal o fusariosis (*Fusarium oxysporum*) y la cabeza negra (*Helminthosporium allii campanile*); y entre las que sobreviven varios años en el suelo y afectan a los bulbillos inmediatamente después de la plantación se encuentran la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) y la pudrición del cuello causada por *Botrytis allii* Munn (Sepúlveda *et al* 2010; Terán, 1997).

Considerando que el ajo ocupa el segundo lugar en importancia en el ámbito mundial dentro de las especies del género *Allium* (Pérez *et al.* 2005), después de la cebolla (*Allium cepa* L.), cuya producción mundial es de 2.7 millones de toneladas y que México se ubica entre los ocho principales países exportadores de ajo a nivel mundial junto con China, Tailandia, España, Argentina, Italia, Estados Unidos y Corea (FAO, 2012), es de gran relevancia desarrollar un paquete tecnológico que pueda ofrecer mejores condiciones en la producción de ajo mexicano, especialmente en el manejo de las enfermedades que reducen el potencial productivo de este cultivo.

Como ya se había señalado, la pudrición blanca (aunada a otros factores) ha provocado un descenso en el área cultivada de ajo en México. Al respecto, es importante mencionar que en a nivel nacional en el año agrícola 2012 (riego más temporal) se contaba con la siguiente distribución en la superficie dedicada al cultivo de ajo: sembrada de 5,451.90 ha, cosechada de 5,299.40 ha (152.5 ha siniestradas). La producción nacional para ese mismo ciclo fue de 54,015.27 ton, con un rendimiento máximo de 13.9 ton/ha (perteneciente a Baja California, aunque en los ciclos anteriores era Aguascalientes y Zacatecas quienes obtenían los mayores rendimientos) y un rendimiento promedio nacional de 10.19 ton/ha. Por otro lado, el precio medio rural se ubicó en 12,951.29 \$/ton (en 2011 fue de 21,386.10 \$/ton), el valor de la producción nacional (en miles de pesos) fue de \$699,891.37 (en 2011 fue de \$1, 241,773.21). De lo anterior se puede decir que por cada hectárea siniestrada (y sea por factores abióticos o

bióticos como lo son las enfermedades fúngicas) se pierden entre \$130,729.75 y \$218,779, considerando el precio medio rural por tonelada (SIAP, 2013).

2.2. Pudrición Blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.)

El hongo causante de la pudrición blanca de las especies del género *Allium*, se llama *Sclerotium cepivorum* Berk., y es un hongo filamentoso (Quiroz *et al.*, 2008). Este hongo está clasificado como un deuteromiceto (el grupo especial de Micelia Sterilia), aunque ha sido denominado como Orden Aganomycetales (Agrios, 1996). No se ha identificado el ciclo de vida sexual ni se sabe si produce esporas funcionales, aunque se ha sugerido que es un ascomiceto, pues se ha reportado la formación de microconidias de 1.6 a 3.4 mm cuando se crece sobre agar agua (Littled y Rahe citados por Luna, *et al.*, 2003). Por tanto, las únicas formas reproductivas que se conocen corresponden a los esclerocios, éstos son estructuras de resistencia, de forma esférica a irregular, de color negro oscuro por la presencia de melanina, de acuerdo a Kohn y Grenville citados por Luna (*et al.*, 2003), ocasionalmente se presentan dos o tres esclerocios fusionados en uno sólo, pero cada uno puede medir de 0.35 a 0.50 mm. Los esclerocios maduros muestran diferentes anillos de células en cuyo centro se observan hifas de diferente diámetro y entre ellas se advierte un material gelatinoso, de acuerdo a la American Phytopathological Society y a Hollyday citados por Velásquez (*et al* 2009). Se sabe también que este patógeno posee una fuerte variación patogénica entre aislamientos, como lo describen Sánchez (*et al.*, 2001) y Reyes (*et al.*, 2003).

Celdeño y Palacios (1992) investigaron la organización celular del hongo *Sclerotium cepivorum* Berk., y dieron a conocer que la formación de los esclerocios ocurre a partir de una agregación de hifas, que inicialmente se engruesan e irregularizan la trayectoria de sus talos, posteriormente se diferencian las hifas para constituir la corteza y la médula.

La germinación de los esclerocios puede ser de dos tipos. En condiciones asépticas (agar o suelo estéril), los esclerocios germinan mediante la producción de hifas que emergen individualmente, sin alterar la corteza ni la médula, mientras que, en suelos sin esterilizar, la germinación ocurre eruptivamente por la brotación de un manojito micelial compacto, que fractura la corteza y hace desaparecer todo el contenido medular. Éste último tipo de germinación ocurre

con mayor frecuencia y es la forma potencialmente infectiva que es estimulada por los exudados radiculares de las plantas *Allium* e inhibida por la presencia de nutrientes en los sustratos (Celdeno y Palacios, 1992).

Así mismo, varios autores coinciden en que los niveles de inóculo, requeridos para alcanzar incidencia de la enfermedad de 40 y 25%, abarcan un amplio rango, desde 1.5 y 5000-9000 esclerocios kg^{-1} . Tal variación se atribuye, entre otros factores a: condiciones climáticas, características físicas, químicas y biológicas (presencia de antagonistas) del suelo, prácticas culturales, y susceptibilidad entre especies hospedantes y cultivares, así como la variabilidad patogénica del hongo (Coley-Smith y Parfitt, 1983; Entwistle *et al.* 1994; Uthkede *et al.* 1982; citados por Sánchez *et al.* 2001).

En otros experimentos, la temperatura óptima para el desarrollo de la pudrición blanca en cebolla fue de 15°C, la temperatura óptima para germinación de esclerocios en suelo esterilizado (en autoclave), fue de 20°C. El pH óptimo para germinación de esclerocios en agar y en suelo esterilizado (en autoclave) fue de 5.3 y 4.8, respectivamente. Sin embargo más del 50% de los esclerocios germinaron en suelo esterilizado (en autoclave) a valores de pH probados entre 4.5 y 7.8. A un pH de 5.0 o menor, menos del 30% de las plantas fueron infectadas, mientras que desde 6.0 hacia arriba, el 90% de las plantas fueron infectadas. Cerca de 25 esclerocios por gramo de suelo se requirieron para obtener una infección de aproximadamente 60% de las plántulas. De las numerosas especies probadas sólo *Allium caeruleum* parece poseer una resistencia significativa hacia la pudrición blanca (Adams y Papavizas, 1971). Respecto a la humedad, Delgadillo *et al.*, (2000) señalan que la germinación fue mayor en suelos con 15% de humedad, aunque también se ha reportado que el exceso de humedad es desfavorable para el hongo (Valle, 1989, citado por Velásquez, 2009).

La pudrición blanca puede aparecer desde el estado de plántula cuando éstas nacen de semilla infectada ('dientes de ajo'). Los síntomas que se observan en esta etapa son clorosis y marchitez, las plántulas tienden en el suelo, al extraerlas el tejido ha sido invadido por una pudrición húmeda (Valle, 1989, citado por Velásquez, 2009).

De acuerdo a Pérez *et al.* (2005), el hongo *Sclerotium cepivorum*, aumenta su actividad conforme las raíces de las plantas de ajo se desarrollan; sin embargo, los síntomas en el follaje no

se manifiestan hasta que el hongo invade el bulbo de la planta. Las plantas enfermas tienden a amarillarse en pocos días empezando por las hojas basales o más viejas y posteriormente las superiores o más jóvenes se marchitan y secan totalmente (Fig. 1).



Fig. 1. Plantas mostrando síntomas severos (aéreos) de pudrición blanca (Velázquez *et al.* 2001).

Un síntoma inicial de la enfermedad es el micelio blanco y de aspecto algodonoso que se encuentra alrededor del bulbo y que puede profundizar su desarrollo en el tejido del bulbo. En la base de las plantas, sobre los bulbos y aún sobre el terreno, se pueden observar los esclerocios así como franjas algodonosas del micelio blanco (Fig. 2). En el interior del bulbo se puede observar distintas etapas en el desarrollo del hongo, aunque generalmente, la presencia de micelio y esclerocios es menos frecuente conforme se profundiza en las cubiertas del bulbo. Los esclerocios son liberados en el suelo tan pronto como los tejidos donde se desarrollan se pudren completamente. Las plantas afectadas pueden arrancarse fácilmente ya que sus raíces han sido destruidas. Es común que en los lotes infectados la enfermedad se presente formando secciones circulares de tamaño y forma variable. Generalmente las plantas en el centro de estas áreas son las primeras en morir (Velásquez *et al.* 2001).



Fig. 2. Bulbos de ajo con micelio y esclerocios *Sclerotium cepivorum* (Velázquez *et al.* 2001).

La enfermedad puede continuar después de la cosecha, sobre todo en los bulbos que llevan infección que no fue observada en el campo. En este caso, la membrana externa tiene un aspecto normal pero el interior del bulbo está invadido completamente por el hongo. Estos bulbos son fácilmente detectables debido a un menor peso que los bulbos sanos y a que al presionarlos con los dedos se aplastan con facilidad. Los dientes infectados se deshidratan (“momifican”) y se pueden cubrir de una masa de esclerocios negros. Si los bulbos infectados son almacenados en condiciones muy secas el hongo no se propagará, aunque los bulbos infectados en el campo continuaran el proceso de descomposición. Es importante recalcar que ningún otro cultivo (hortalizas, granos y forrajes) además de los pertenecientes al género *Allium* es afectado por esta enfermedad y se pueden sembrar sin peligro alguno aún en terrenos altamente infestados (Velázquez *et al* 2001).

La diseminación de este patógeno puede ocurrir a grandes distancias o bien de planta a planta dentro una parcela. La transmisión de la enfermedad de plantas enfermas a plantas vecinas, sanas, puede ocurrir por el desarrollo del hongo a través del suelo (Velásquez, 2001). El micelio puede desarrollarse de uno a dos centímetros más allá de las raíces enfermas y de esta manera infectar las raíces sanas de plantas vecinas; de esta manera, el hongo se mueve a lo largo del surco de plantas de ajo (Littley and Rahe, 1987, citados por Velásquez, 2001). Una de las maneras más efectivas de mover esclerocios a distancias más grandes, ocurre al trasladar bulbillos infectados de una localidad a otra; en estos casos la aparición de la enfermedad será generalizada en toda la parcela. Cuando los almácigos son establecidos en suelo infestado las

plántulas ahí producidas pueden llevar esclerocios o micelio del patógeno y al ser trasplantadas infestan nuevas tierras. Otra forma de diseminar al patógeno es mediante el agua de riego que al pasar por los bulbos enfermos desprenderá los esclerocios y los arrastrará hacia otras partes del terreno o hacia otras parcelas. Los esclerocios también pueden ser diseminados mediante el suelo que se adhiere a las herramientas o equipo agrícola o bien, al calzado de los trabajadores. Otros materiales vegetales, pertenecientes o no al género *Allium* también pueden trasladar esclerocios a grandes distancias (APS, 1995, citado por Velásquez, 2001).

2.3. Manejo integrado de la pudrición blanca.

Los tratamientos fungicidas son y seguirán siendo esenciales para mantener la sanidad vegetal y rendimientos de alta calidad, pues conforman un componente clave en el manejo integrado de plagas (Brent & Hollomon, 2007). Por ello, el tratamiento de la pudrición blanca en ajo se inicio, como en todas las enfermedades fúngicas, con el uso de compuestos químicos.

Al respecto, se destaca el uso de procymidone, fluazinam y tebuconazole, cuya eficacia depende de la densidad y distribución del inóculo en el suelo y de la oportunidad, forma y frecuencia de su aplicación. El fungicida que ha demostrado resultados económicamente aceptables es el tebuconazole. Es un triazol sistémico con actividad fungicida, impide la formación de las paredes celulares de hongos patógenos. En el suelo se degrada con rapidez y no se acumula (Velásquez *et al.* 2001).

Entre las nuevas alternativas menos dañinas para el medio ambiente y el ser humano, y que evitarían el desarrollo de algún tipo de resistencia a los agroquímicos está el uso de la biosolarización, la cual puede ser útil en suelos poco infestados (a poca profundidad), también se hacen aplicaciones al suelo de disulfuro de dialilo, (compuesto que da el olor característico al ajo), el cual se aplica para inducir la germinación de esclerocios en ausencia del cultivo.

De acuerdo a Velásquez y Medina, 2004b, y otros autores citados por Velásquez (2009), las siguientes medidas se han desarrollado para el manejo de la pudrición blanca (de las cuales se describen más adelante algunos ejemplos):

- a. Uso de semilla sana.
- b. Análisis de suelo para conocer la densidad de esclerocios dentro de la parcela.
- c. Saneamiento del cultivo. Se pretende localizar aquellas plantas con síntomas iniciales de la enfermedad y proceder a extraerlas (evitando una mayor dispersión del micelio y esclerocios), y finalmente confinarlas (dentro de bolsas plásticas). Si se han detectado áreas de incidencia de la enfermedad es conveniente suspender el paso de maquinaria, trabajadores y agua de riego (rodado o de gravedad).
- d. Solarización: Proceso que se produce en suelos húmedos expuestos al sol durante los meses de verano, cubiertos con una película transparente. Se ha reportado que durante 6 semanas se pueden alcanzar temperaturas hasta de 42°C en los primeros 7 cm de suelo.
- e. Empleo de estimulantes de germinación de esclerocios.
- f. Fechas de siembra. Se recomiendan fechas de siembra tempranas, cuando la temperatura es aún alta.
- g. Otras prácticas: Incorporación de gallinaza o vermicomposta y la incorporación de agentes de control biológico como *Trichoderma harzianum*.
- h. Resistencia genética.
- i. Rango de hospederos. Afecta exclusivamente a especies del género *Allium*.
- j. Rotación de cultivos. Se recomienda dejar de sembrar 10 años las especies del género *Allium*.
- k. Inundar el suelo. Con una capa de agua de 20 cm hasta por 8 meses, se ha podido reducir la viabilidad de los esclerocios a 0% luego de este tratamiento. Sin embargo este método no es factible desde el punto de vista económico.
- l. Uso de fungicidas.
- m. Uso de tapetes sanitarios. Como medida adicional se recomienda que el empleo de un tapete sanitario donde las llantas de vehículos y calzado del personal que ingrese a dichas parcelas o ranchos se impregnen con una solución fungicida

que elimine los posibles esclerocios transportados en el suelo adherido a llantas y calzado.

Dentro del uso de los agroquímicos. Los fungicidas pertenecientes a los grupos dicarboximide (procymidone), triazoles (triadimefon, triadimenol y tebuconazole), y pirimidina (fluazinam) han mostrado buenos resultados en el manejo de la pudrición blanca en ajo, algunos de ellos tuvieron efecto satisfactorio pero se degradan rápidamente en el suelo de acuerdo a lo citado por Delgadillo (*et al.* 2002). Dentro de éstos fungicidas, el de mayor eficacia y factibilidad económica para el manejo de la pudrición blanca está el Tebuconazole (Delgadillo *et al.* 2004).

Los triazoles son un grupo de compuestos que actúan sobre la integridad de la pared celular de los hongos (impide su formación). El mecanismo de acción es el siguiente: alteran la biosíntesis de esteroides, impidiendo que los hongos crezcan, por alteración de la permeabilidad de la membrana. Causa pérdidas de los constituyentes citoplásmicos esenciales. En el suelo el tebuconazole se degrada con rapidez y no se acumula. Es poco móvil y por tanto no se lixivia. En el agua se hidroliza y se fotoliza con una vida media de unos 28 días (se le considera poco persistente). Es ligeramente tóxico para aves, peces y abejas. Otro producto comercial que se había usado para el control de la pudrición blanca es el Captan, que pertenece a las ftalimidias (Milagro, 2005). Éstos compuestos son derivados del ácido ftálico. Muy utilizados por su eficacia y baja toxicidad para animales. Actúan como tóxicos generales ya que reaccionan con grupos-tiol desnaturalizando proteínas y provocando la muerte del hongo.

Como se mencionaba anteriormente existen alternativas al uso de agroquímicos, como lo son: la rotación de cultivos, análisis de suelo previo a la siembra para determinar la densidad de esclerocios por kilogramo de suelo, uso de semilla sana proveniente de áreas libres de la enfermedad, saneamiento del cultivo durante el ciclo de producción, esperar al menos ocho años antes de plantar en un suelo que haya estafado infestado con *Sclerotium cepivorum* (Delbón, N., Cosa, M. T., Bernardello, G. 2012. Exomorfología y anatomía de órganos vegetativos aéreos en especies de *Fluorensia* DC. (*Asteraceae*) con importancia fitoquímica. Acta Botanica Brasilica 26(1):2-10, 2012.

Delgadillo *et al.* 2000).

El uso de agentes biológicos como antagonistas de fitopatógenos (bacterias y hongos, principalmente) es una práctica cada vez más empleada. Un ejemplo de este tipo de tratamientos es el presentado en el trabajo de Abeysinghe (2009), donde nos expone la forma en que usando una combinación de *Bacillus subtilis* con *Pseudomonas* se puede dar protección contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*. En otro estudio se reporta al hongo *Coniothyrium minitans* dentro del manejo integrado de la pudrición blanca causada por *S. cepivorum*, lo cual concuerda con lo reportado por De Oliveira (*et al.* 1984) quienes indican que algunos hongos antagonistas como *C. minitans* y *Trichoderma harzianum* tienen una acción activa contra hifas y esclerocios (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** *et al.* 2004).

Los trabajos que se basan en la inducción de la germinación mencionados en una recopilación por Espinosa (*et al.* 2003), demuestran que se puede estimular la germinación del esclerocio en ausencia del cultivo hospedero y así reducir el número de esclerocios del hongo *Sclerotium cepivorum*, debido a la muerte de esclerocios por inanición. También se han usado productos como el Disulfido de Dialilo (Diallyl Disulfide) que han estimulado la germinación de esclerocios bajo condiciones de laboratorio y también en terrenos agrícolas. Su aplicación en otros cultivos durante el invierno, presenta la mejor alternativa actual para recuperar terrenos altamente infestados (como es el caso de la parte central de México). Las ventajas ecológicas son evidentes al usar un aromatizante que se usa en la industria alimenticia en lugar de algún fungicida químico. Dosis y métodos de aplicación son las incógnitas a resolver antes de saber la factibilidad económica de su uso (Espinosa *et al.* 2003). En afinidad con el uso de estimulantes para la germinación Argüello *et al.* (2009), demostraron que es posible reducir la cantidad de esclerocios viables para producir la podredumbre blanca en ajo utilizando un extracto de puerro (de la familia del ajo y la cebolla), que induce la germinación de los esclerocios en ausencia del cultivo, (logrando también la muerte de los mismos por inanición), se encontraron resultados favorables con el extracto a una concentración de 75%.

Por otro lado, los extractos vegetales con propiedades antimicrobianas también representan una buena opción para integrarla al manejo de la pudrición blanca. Al respecto, se ha reportado que compuestos bioactivos extraídos de timbe (*A. angustissima*) posee una actividad inhibitoria contra el hongo *Fusarium oxysporum*, la inhibición del crecimiento micelial se observó a una concentración de 200 mg/mL con $14.8 \pm 0.6\%$ y a 300 mg/mL se obtuvo una

inhibición de $17.9 \pm 0.8\%$ alcanzando la mayor actividad a 400 mg/mL con $29.5 \pm 0.7\%$. Este mismo extracto se evaluó contra *Phytophthora capsici*, y mostró inhibición del crecimiento micelial de $15.5 \pm 0.6\%$ para 300 mg/mL y la máxima concentración evaluada alcanzó $28 \pm 0.2\%$ (Vargas, 2011). Asimismo Saldaña (2011) demostró que el extracto metanólico de timbe a una concentración de 300 ppm protegió a plantas de Chile de la misma manera que el fungicida sintético Busan® contra problemas por marchites de raíz causados por el oomiceto *Phytophthora capsici* a nivel de invernadero, en Celaya, Guanajuato.

2.4. Compuestos bioactivos

A diferencia de los metabolitos primarios (carbohidratos, proteínas y grasas) que son sintetizados por todos los organismos vivos, los metabolitos secundarios son sintetizados en mayor proporción por las plantas, aunque también por algunos microorganismos (como los hongos de los cuales el hombre obtiene compuestos antibióticos). Estos compuestos poseen una extensa variedad de funciones biológicas, por lo cual se les ha denominado compuestos bioactivos, fitoquímicos o sustancias bioactivas. (Guiérrez *et al.* 2000; Palencia, 1999).

Estos compuestos intervienen en importantes funciones, algunos ejemplos son los siguientes: Los flavonoides (Fig. 3), que protegen a las plantas contra radicales libres generados durante la fotosíntesis, o del ataque contra microorganismos fitopatógenos como los hongos (entre estos compuestos están las fitoalexinas), también se incluyen en este grupo a las antocianinas, que tienen como principal función ser señalizadores para polinizadores y agentes dispersantes de frutos. Los terpenoides, que pueden atraer a polinizadores o inhibir el crecimiento de plantas competitivas. Los alcaloides, que protegen a las plantas de los herbívoros o ataques de insectos. También se ha descubierto que hay metabolitos secundarios que funcionan como señalizadores moleculares (Ávalos y Pérez-Urria, 2009; Bernhoft *et al.* 2008; Cowan, 1999; Grotewold, 2006; Martínez, 2000).

De los compuestos antes mencionados los flavonoides grupo más estudiado. Estos compuestos son metabolitos secundarios provenientes de flavanonas que a su vez derivan de chalconas generadas en la ruta fenilpropanoide (Drago, 2007). Se encuentran en diferentes órganos de las plantas (Grotewold, 2006), donde están libres o como glucósidos. Las mezclas de

flavonoides presentes en un espécimen dependerán de la especie vegetal (variedad, etapa fenológica por ejemplo) y de las condiciones a las que se encuentre expuesta durante su desarrollo (ubicación geográfica, época del año, condiciones climáticas, suelo, factores bióticos o tecnológicos, como el tipo o proceso de recolección de muestra, condiciones de almacenamiento y procesamiento). Por tanto, para una misma especie la actividad biológica de un extracto puede variar significativamente dependiendo de las condiciones ambientales a las que se halle expuesta, (Maestro *et al.* 1993; Russo *et al.* 2013).

BIOSÍNTESIS

En general, los compuestos fenólicos de las plantas son biosintetizados en diferentes rutas, pero existen dos rutas básicas: la ruta del ácido shiquímico y la ruta del ácido malónico. La vía del ácido shiquímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de fenoles en las plantas, está presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales. La vía del ácido malónico, aunque es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, es poco empleada en plantas superiores (Lincoln y Zeiger, 2010).

El anillo pirano puede ser abierto (chalconas) o reciclado en un anillo furano, como en el caso de las auronas, (Lincoln y Zeiger, 2006; García, 2007). Las diferentes clases de flavonoides difieren en la insaturación del anillo heteroatómico, en la colocación de anillo aromático B en las posiciones C2 o C3 del anillo C, y en el conjunto de patrones de hidroxilación.

Las diferentes clases de flavonoides difieren en la insaturación del anillo heteroatómico, en la colocación de anillo aromático B en las posiciones C2 o C3 del anillo C, y en el conjunto de patrones de hidroxilación. Pueden dividirse en: chalconas (anillo pirano abierto), flavonas (como la diosmetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carece del grupo hidroxilo en posición C3), flavonoles (representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C), flavanonas, flavanoles, isoflavonas, flavanos y antocianinas (tienen unido el grupo –OH en posición 3 pero además

poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C), catequinas, rotenoides (Lincoln y Zeiger, 2006; Martínez, 2001).

Respecto al lugar de biosíntesis y depósito de los flavonoides, se cree que son sintetizados en el citosol, aunque se ha sugerido también que los flavonoides son sintetizados cerca del Retículo Endoplasmático. Sin embargo, la mayoría son sintetizados en el citosol y acumulados en vacuolas, como el caso de las antocianinas, las cuales son sintetizadas en el citosol y llevadas hacia las vacuolas (donde se encuentran disueltas en la solución vacuolar o en los antocianoplastos), este proceso requiere de permeasas vacuolares unidas a las membranas y/o transportadores que toman los flavonoides sintetizados en el citosol (Grotewold, 2006; Aguilera *et al.* 2011). Además de las vacuolas, la pared celular constituye otro lugar de almacenamiento para estos compuestos, tal como lo demostraron Kenneth *et al.*, (2000), quienes encontraron que cerca del 30% del total de los flavonoles glucósidos de pétalos (otro tipo de flavonoides) están localizados en la pared celular. Estos flavonoles glucósidos se distinguen de los glucósidos vacuolares en que carecen de acilación. Por lo anterior se puede afirmar que los dos sitios de mayor concentración de compuestos fenólicos son las vacuolas y la pared celular.

UBICACIÓN EN LA PLANTA

De acuerdo a Martínez (2000), se han encontrado en las diferentes partes de las plantas, especialmente en las partes aéreas. Difieren en la forma en que se encuentran, por ejemplo, las antocianinas como sales se las halla en flores, frutos y tejidos con coloraciones que van del rojo hasta el violeta y azul. Así mismo, algunas antocianinas son más frecuentes en frutos, en tanto que otras lo son en flores (Aguilera *et al.* 2011). A menudo las antocianinas se hallan en hojas, tallos, semillas y otros tejidos. Las proantocianidinas o taninos condensados en *Arabidopsis* se han encontrado solo en la cubierta de la semilla o testa, y confieren una pigmentación café en semillas maduras debido a la oxidación de las proantocinidinas (Grotewold, 2006).

Otros de los compuestos fenólicos, presentes en las vainas senescentes son los taninos, compuestos polifenólicos, más o menos complejos de origen vegetal, masa molecular relativamente elevada y sabor astringente, han sido utilizados en la industria de la curtiruría (debido a su capacidad para unirse a macromoléculas como hidratos de carbono y proteínas). Son

compuestos hidrosolubles, aunque también son solubles en alcohol y acetona e insolubles en disolventes orgánicos apolares. Se dividen en dos tipos los hidrolizables, y los no hidrolizables. Los primeros se hidrolizan con facilidad por ácidos, álcalis y por vía enzimática, al que pertenecen los taninos gálicos y los ésteres de un poliol, generalmente de la glucosa con varias moléculas de ácido gálico. Los segundos se forman químicamente por condensación de flavanoles y no contienen azúcares en su estructura. Proceden del metabolismo flavonoide (Carretero, 2000; Lattanzio *et al.*, 2006).

PROPIEDADES

Los glucósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona flavonoide respectivo. Las propiedades ácido-base muestran que los radicales flavonoides son neutros en un medio ácido (por debajo de pH 3) y con una carga negativa a pH 7. Esto es importante, ya que el radical cargado negativamente no es probable que pase a través de la membrana celular con carga negativa. Los flavonoides pueden ser modificados mediante hidroxilación, metoxilación, o O-glicosilación del grupo hidroxilo así como C-glicosilación directamente al átomo de carbón del esqueleto flavonoide. La última modificación toma lugar más frecuentemente en el caso de los isoflavonoides, donde el anillo B es condensado al carbón C3 del esqueleto. Los derivados de los flavonoides glucósidos son térmicamente lábiles (fácil de transformar en otro compuesto más estable) y su aislamiento y posterior purificación sin degradación parcial es difícil. La multiplicidad de posibles modificaciones de los flavonoides resulta en más de 6,000 compuestos diferentes de esta clase conocidos en los últimos cien años (Grotewold, 2006; Martínez, 2001).

Sus propiedades dependen de la clase de flavonoide y su forma (si está libre, como glucósido o como sulfato). Por ejemplo las flavonas, flavonoles y auronas, son compuestos sólidos. En general los glucósidos son sólidos amorfos, mientras que las agliconas y los altamente metoxilados son cristalinos. La solubilidad depende de la forma en que se encuentren y el número y clase de sustituyentes presentes. Los glucósidos, las antocianidinas y los sulfatos son solubles en agua y alcohol. Las agliconas flavonoides altamente hidroxiladas son solubles en alcohol (etanol, metanol y n-butanol), mientras que las poco hidroxiladas lo son en solventes

como éter etílico, acetato de etilo y acetona. Las agliconas flavonoides altamente metoxiladas son solubles en solventes menos polares como el éter de petróleo y el cloroformo. Los flavonoides con hidroxilos fenólicos son solubles en soluciones alcalinas, pero algunos altamente hidroxilados se descomponen por acción de las bases fuertes, un hecho que permite reconocerlos y diferenciarlos de otros, y que tiempo atrás se utilizó para su elucidación estructural. Los glucósidos son sólidos amorfos que se funden con descomposición, mientras que las correspondientes agliconas son sólidos cristalinos. La mayoría de flavonoides son degradados en condiciones alcalinas fuertes, rompiéndose el anillo C (Martínez, 2001).

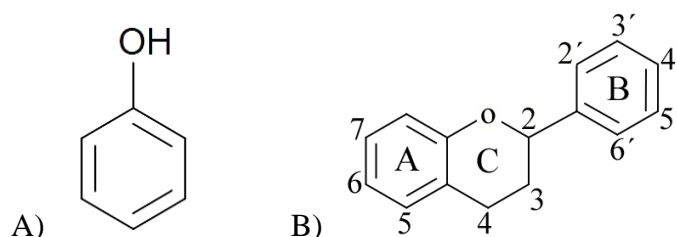


Fig. 3. A) Estructura básica de un fenol B) Estructura de un flavonoide.

COMPUESTOS FENÓLICOS EN LA DEFENSA DE LAS PLANTAS

Se estima que hay cerca de 250,000 especies de plantas superiores, pero seis veces más (1.5 millones) de especies de hongos. Todos los hongos dependen de las plantas superiores como fuentes de carbón y energía, así como los demás organismos que no tienen la capacidad de fotosíntesis (Lattanzio *et al.*, 2006).

Entre las dos posibles interacciones planta-microorganismo pasa de una relación simbiótica a una interacción patogénica (“*non-host resistance*”). En este caso, los compuestos pre-formados (“*phytoanticipin*”), como fenoles y polifenoles, ubicuos en la planta, son importantes agentes contra los hongos filamentosos. Éstos son diferentes a las fitoalexinas (las cuales se producen después del ataque del fitopatógeno). La teoría de las sustancias conocidas como fitoalexinas se desarrolló con la hipótesis de Muller y Börger en 1941, aunque ya desde 1905 Marshal Ward había desarrollado una teoría que ponía de manifiesto la existencia de

sustancias producidas por las plantas con la capacidad de inhibir el desarrollo de los hongos patógenos (Harbone, 2003; Lattanzio *et al.*, 2006).

Las fitoalexinas son metabolitos secundarios de naturaleza química diversa, aunque generalmente son sustancias lipofílicas, muchas de ellas son flavonoides de bajo peso molecular. Se sintetizan en los vegetales después de una infección microbiana. La síntesis se puede disparar por la acción de factores como elicitores o inductores, tanto exógenos, producidos por patógenos, agentes químicos, daños mecánicos; como endógenos, producidos por las plantas en respuesta a determinadas situaciones de estrés. Los inductores de la síntesis y acumulación de fitoalexinas no sólo provienen de la planta hospedera, sino del huésped (hongos, bacterias y virus). Se han identificado principalmente en dicotiledóneas. Existen pocos reportes de su presencia en monocotiledóneas y gimnospermas. La técnica del cultivo *in vitro* es una alternativa para la producción de fitoalexinas y la investigación de estos metabolitos una contribución para control de ciertas plagas. Las investigaciones reportan su síntesis como producto del ataque de hongos y en menor medida al de bacterias (García y Pérez, 2003; Kuć y Rush, 1985).

Se ha documentado que la resistencia de una planta ocurre cuando una o más fitoalexinas alcanzan una concentración suficiente para inhibir el desarrollo del patógeno (Agrios, 1998). El mecanismo por el cual las fitoalexinas alcanzan su efecto tóxico no es aún claro, pero se cree que actúan sobre la estabilidad de la membrana del agente fitopatógeno. Existen inductores de la síntesis y acumulación de fitoalexinas, provenientes de la planta hospedera o del huésped (hongos, bacterias, virus), ambos liberan o producen inductores como sales inorgánicas, carbohidratos complejos, oligoglucanos, lípidos, etileno, aligómeros como el quitosano, entre otros, (García y Pérez, 2003). Las fitoalexinas más conocidas son las pertenecientes a las producidas por las leguminosas, como la pisantina, la faseolina, la maackianina y la wyerona. Al igual que otros compuestos fenólicos relacionados con los mecanismos de defensa del vegetal, las fitoalexinas han sido estudiadas sobre todo desde el punto de vista de su fungitoxicidad más que de su posible actividad antibacteriana, explicado por el hecho de que la mayoría de las enfermedades vegetales están producidas por hongos y muchas menos por bacterias o virus., de acuerdo a Smith, citado por Maestro (*et al.* 1993).

2.5. Timbe (*Acaciella angustissima* Mill.)

Esta leguminosa puede crecer en diferentes tipos de suelos y está distribuida en zonas con temperaturas, precipitaciones y altitudes variables, se extiende desde Norteamérica hasta una pequeña parte en Sudamérica, (Csurhes, 2009). La madera de este árbol se usa en curtiduría, su raíz pivotante es profunda (ayudando a la infiltración de agua), además por su asociación con *Rhizobium* forma islas de fertilidad, tiene un rápido crecimiento, por lo cual se emplea en agroforestería (Rincón *et al.* 2008). Su fruto es una vaina de 4 cm de largo por 5 mm de ancho en cuyo interior se encuentran las semillas de 0.3 mm de diámetro.

El timbe pertenece a la familia *Leguminosae*, subfamilia (*Mimosoideae*), género *Acaciella*, especie *angustissima*, y entre los nombres comunes en México se encuentran: Carboncillo, chilicap, guajillo blanco, guajito, guapinico, huajillo, timbe, timbre; en Estados Unidos se le conoce como: Fern acacia, prairie acacia, prairie wattle, white ball acacia, white-ball acacia, whiteball acacia.

Esta especie fue descrita primero como *Mimosa angustissima* en 1768. Fue transferida al género *Acacia* por Kuntze en 1896 y recientemente fue conocida con el nombre científico de *Acacia angustissima*. Britton y Rose propusieron moverla al nuevo género *Acaciella* en 1928, siendo esto rechazado por mucho tiempo. Sin embargo, en una revisión taxonómica reciente por Arce Ricos y Bachman en 2006, el género *Acaciella* fue reintegrado. Por lo tanto, *Acacia angustissima* ahora debe ser referida como *Acaciella angustissima*. El género *Acaciella* es de origen neotropical, con su centro de diversidad en la costa pacífica de México, y comparte más características morfológicas con el género *Piptadenia* que con *Acacia*. Arce ricos y Bachman describieron 15 especies de *Acaciella*, separaron *A. angustissima* en tres variedades (es decir var. *angustissima*, var. *Filicioides* y var. *texensis*), se basaron en gran parte en el número de pinas de las hojas y en el grado de la vellosidad de los tallos y hojas. Pese a esto, sigue compartiendo características con el género *Acacia* (donde inicialmente se encontraba clasificada), como lo es la producción de compuestos que han sido objeto de estudio por su uso potencial en la agroindustrial. La acetina se identificó por primera vez en una planta del género *Acacia* y se clasifica como una flavona (Martínez, 2001).

En México *Acaciella angustissima* está representada por sus tres variedades. Distribuidas en: Chiapas, Guanajuato, Querétaro, Michoacán, Sonora, Sinaloa, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Hidalgo, Jalisco, México, Puebla, Veracruz, Guerrero, Chihuahua, Coahuila, N.L., Tamaulipas, Aguascalientes, Nayarit, (Fig. 4) de acuerdo a Rico (2006).

En el continente americano se ha reportado en la parte sur de Estados Unidos, Argentina, Bolivia y en el Caribe.



Fig. 4 Distribución de *Acaciella angustissima* en el continente americano (Fuente: *Biodiversity occurrence data published by Accessed through GBIF Data Portal, data.gbif.org, 2012-09-03*).

2.2.1. Descripción

Porte: Su hábito puede ser tanto arbustivo como arbóreo, en este último caso se reportan alturas de 5 a 7 m, y hasta 12 m. Aunque menos frecuente pueden ser herbáceas perennes. Su tallo es estriado y en la variedad *flicioides* presenta pubescencias. Puede llegar a tener 25 cm de diámetro (a 30 cm desde la base). Su copa es esparcida y redondeada.

Hojas y flores: Pecíolo de 2 a 2.5 cm de largo, pinnas 3 a 18 pares, foliolos 14 a 25 pares por pina, lineares, de 2.4 a 6 mm de largo con una nervadura principal conspicua, glabros o ligeramente pubescentes. Inflorescencias en forma de panículas de capítulos globosos axilares, dispuestos en fascículos de 3 a 4. Flores con pedicelos de 1 a 1.5 mm de largo, blancas.

Fruto: Legumbre oblonga, 4-9 cm de largo, 1 a 1.7 cm de ancho, color de guinda-verdoso, glabra, aplanada.

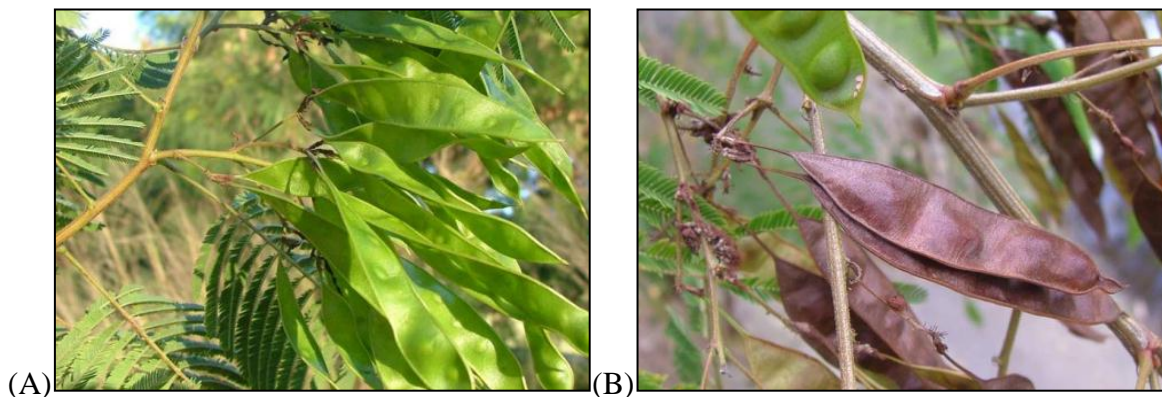


Fig. 5. Fruto inmaduro (A) y maduro (B) de *Acaciella angustissima* (Mill.) Britton & Rose. var. *angustissima* (Csurhes, 2009)

Para el timbe se reportan las siguientes fechas de floración y fructificación: Floración en enero, y de abril a noviembre, y fructificación de septiembre a febrero (Rico, 2006)

Actualmente se emplea en: construcción, melífera, forraje, veterinario y en curtiduría. Recientemente se ha utilizado en agroforestería.

Rincón *et al.* (2008) estudiaron esta especie en el estado de Chiapas partiendo de la idea que existe una amplia variedad de plantas con potencial para uso industrial. Timbe (*Acaciella angustissima*) acumula taninos en su corteza, y se usa para curtir pieles. En la Depresión Central y en la Meseta Comiteca se seleccionaron ocho sitios para estudiar sus características biológicas y su hábitat, así como evaluar su rendimiento cortical. Los resultados indicaron que *A. angustissima* es una leguminosa muy versátil que crece en diferentes tipos de suelos, en zonas con temperaturas, precipitaciones y altitudes variables. Los arbustos estudiados no presentaron

diferencias morfológicas, pero las plantas que crecen en la Meseta Comiteca tuvieron mayor altura que las de la Depresión Central.

En otros estudios acerca de *A. angustissima*, se ha reportado que además de su gran capacidad de adaptación a condiciones ambientales que son poco favorables para la mayoría de las plantas, se ha podido incrementar la tolerancia a suelos con alto contenido de aluminio, lo cual representa una oportunidad para introducir esta especie en un rango más amplio de condiciones (Rincón-Rosales, 2011).

Las características fisiológicas y condiciones ambientales generales bajo las cuales se sabe que esta especie se ha desarrollado: De 0 a 2700 msnm, precipitaciones desde 500 hasta 3500 mm. Temperatura media anual de 18-28°C, máxima de 30-36°C, mínima de 10-20°C. El pH del suelo ácido (5.0) hasta alcalino (7.4). Suelos someros, calizos, arenosos, pedregosos y bien drenados, en pendientes de 0 a 35°, respecto a la materia orgánica soporta niveles bajos de N, P y K. Resiste estaciones secas de hasta 7 meses consecutivos. La flora circundante a timbe son bosques de encinos en la parte baja caducifolia y en los matorrales espinosos. La propagación de timbe puede ser por siembra directa, plantas en bolsa o por regeneración natural. En zonas húmedas, germinan 120-150 días después de sembrada. Fisiológicamente es una especie con una altura que oscila de 2 a 5 m. El diámetro a 30 cm de la base es de hasta 25 cm. Las flores son blancas, en climas húmedos como en Chiapas la floración inicia a finales de verano. El fruto es una legumbre aplanada y muy delgada, de 4-9 cm de largo y de 1 a 1.7 cm de ancho. Las semillas son pequeñas, aplanadas, de color café, de 0.3 cm de diámetro, producción prolífica de 90'000-100'000 semillas/kg de vainas. Las hojas tiene de 3 a 18 pares de pinas y hasta 60 ó más pares de hojuelas por pina; las hojuelas son de 6 mm de largo y 1 mm de ancho, y con el nervio central muy excéntrico. La raíz de timbe es profunda, y tradicionalmente se utiliza como madera, también como hierba medicinal, planta melífera y en la industria de la curtiduría (pues almacena importantes cantidades de taninos en su corteza). El uso potencial y que actualmente se está estudiando es para reforestación, pues se sabe que fija nitrógeno gracias a su asociación a bacterias nitrificantes (SEMARNAT: Veloz *et al.* 2013; Rico, 2006).

III.METODOLOGÍA Y MATERIALES

3.1. Material biológico

3.2.1. Vegetal

Las vainas de timbe (*Acaciella angustissima*) fueron colectadas en el parque nacional El Cimatario (20°31'44" N, 100°21'42" O a 2379 m de altitud), y se conservaron dentro de un ultracongelador a -70°C, en el laboratorio de Biosistemas, de la Facultad de Ingeniería, hasta el inicio de las pruebas.

La semilla “diente” de ajo empleada fue del tipo jaspeado, se compró en Celaya, Guanajuato.

3.2.2. Microbiológico

La cepa del hongo *Sclerotium cepivorum* Berk. se obtuvo del Instituto Tecnológico de Celaya, Guanajuato.

3.2. Siembra de ajo

La semilla (diente de ajo) se compró en el mercado de abastos de Celaya. El desgrane fue manual. Luego del desgrane se hizo una clasificación de dientes por tamaño, eligiéndose los de un tamaño entre 2 y 3 cm de largo, ya que, pese a tener semilla más grande, éstos eran pocos, y ya que se busca la mayor uniformidad se optó por sembrar los dientes de tamaño medio. Posterior a la clasificación se desinfectaron con etanol al 70% por 2 minutos, luego con lejía (2% v/v, cloro comercial) durante 10 min y finalmente se lavaron con agua destilada estéril durante 1 minuto tres veces.

El sustrato utilizado fue tierra de bosque, Peat Moss (Sunshine®). La siembra se hizo en vasos desechables (Reyma®) con 118 cm³ de sustrato cada uno. Un vaso por planta. Cabe mencionar que los vasos también fueron desinfectados con una solución de sales cuaternarias (1 mL por cada litro de agua corriente). Las condiciones bajo las cuales se desarrollaron las plantas

en la casa sombra fueron: sombra al 75%, temperaturas que oscilaron entre 9 y 35°C, con una mínima extrema de -7°C. El cultivo se desarrolló de octubre a noviembre de 2011 (para el ensayo en cámara de ambiente controlado) y de noviembre a diciembre de 2011 (para el ensayo en casa sombra).

3.3. Extracción metanólica y preparación de soluciones

La elección de esta especie, timbe (*Acaciella angustissima*), se hizo en base a lo reportado por Vargas (2011), quien encontró una mayor cantidad de fenoles y flavonoides, comparado con tepame (*Acacia pennatula*), halló también niveles detectables de ácido gálico, (+)-catequina, luteolina y de ácido protocatecuico. Además, el extracto de timbe inhibió el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capsici*, a concentraciones de entre 200 y 400 mg/mL.

Para considerar al timbe como fuente de materia prima para la extracción de compuestos fenólicos de manera sustentable se han elegido las vainas de timbe por ser el método de obtención menos invasivo (Vargas, 2011).

Por otro lado, y de acuerdo con la composición química de los compuestos fenólicos, se tienen diferentes métodos de extracción. Mismos que se sustentan en las bases de la química inorgánica (Núñez, 2008), para elegir la sustancia que podrá separar el compuesto de interés. Básicamente son tres criterios los que se siguen para esta tarea: Primero, una sustancia es soluble en un solvente de acuerdo a su mayor o menor semejanza de funciones químicas con las moléculas de aquel. Segundo, una sustancia es más o menos soluble en un solvente en la medida que son similares sus polaridades. Tercero, Una molécula será más soluble mientras más pequeña sea. Por ello en la extracción de compuestos flavonoides se utilizan solventes polares cuyo extracto posteriormente se concentra (García, 2007).

Además de los flavonoides, otros compuestos que han exhibido actividad antifúngica son los taninos, terpenoides y terpenos. Se ha estudiado la actividad de los taninos y la misma se reporta de buena a moderada, pues las concentraciones mínimas fungicidas se encontraron entre 100 a 250 ppm de un extracto usando turboextracción en una solución acetona:agua (7:3 v/v) por

30 minutos (Conegero *et al.*, 2005). Los aceites esenciales, que están constituidos principalmente por terpenoides, también muestran importante actividad antifúngica, como se manifiesta en su evaluación sobre los fosfolípidos y la composición del esteroles de *Sclerotium cepivorum*, así como la peroxidación lipídica micelial y el desarrollo de los esclerocios (Russo *et al.* 2013), sin embargo, el proceso de producción es costoso y de bajo rendimiento, cerca de 1% para algunas especies de *Lippia* (Barrientos *et al.* 2012).

Para la extracción de flavonoides agliconas libres exudados por tejidos de plantas (hojas o raíces), éstos pueden ser lavados de la superficie con solventes no polares, como el cloruro de metileno, etil éter, o acetato de etilo. Sin embargo, la mayoría de los glucósidos polares conjugados se disuelven en solventes polares (metanol y etanol) y esos solventes orgánicos son aplicados para los procedimientos de extracción en un aparato Soxhlet. Mezclas de alcohol y agua en diferentes proporciones son aplicadas para la extracción de flavonoides y sus conjugados desde material biológico sólido. La extracción eficiente puede mejorarse aplicando “ultrasonication” o extracción con líquido presurizado (PLE), un procedimiento desarrollado a elevadas temperaturas entre 60°C a 200°C, también puede extraerse con fluidos supercríticos con dióxido de carbono, mucho más seguro por utilizar bajas temperaturas. Los robustos métodos multipasos cromatográficos son necesarios para el aislamiento de componentes individuales desde extractos vegetales que contienen nuevos compuestos que no han sido caracterizados (Grotewold, 2006).

Por otro lado, la utilización de material vegetal (plantas) secado con calor para extracción puede causar un decremento sustancial en el rendimiento de flavonoides conjugados. Al respecto, los flavonoides glucósidos acilados son especialmente lábiles a elevadas temperaturas y usualmente son térmicamente degradados durante los procesos de secado de tejidos de plantas. (Grotewold, 2006). Sin embargo, para la extracción de flavonoides generalmente se utilizan muestras secas y molidas.

Para su extracción los compuestos fenólicos pueden ser divididos básicamente en dos grupos, los no solubles como taninos condensados, ligninas y ácidos hidroxicinámicos de la pared celular, y los solubles como los ácidos fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides y quinonas. Para poder obtener la mayor cantidad de compuestos fenólicos las muestras de *Lotus japonicus* Rispaill *et al.*, (2005) propusieron la siguiente metodología: la muestra es secada en frío y

posteriormente molida hasta obtener partículas lo más finas posibles. Luego la muestra es sometida a maceración en metanol 70% grado HPLC durante 15 minutos con agitación constante y a temperatura ambiente, se centrifuga, se filtra el supernadante, el pellet es re-extraído, los supernadantes son combinados antes de remover el metanol bajo condiciones de vacío en un rota-evaporador a 70°C. Finalmente purificado.

Por lo anterior y en base al rendimiento que presenta el empleo de la maceración en metanol, se ha elegido éste método como el más conveniente para la obtención del extracto de timbe.

En cuanto a la preparación del material vegetal, y aunque las metodologías para la extracción de compuestos fenólicos implican el uso de estufas de secado, fluidos supercríticos, las vainas de timbe para este trabajo se pusieron a secar al sol durante una semana y media. Al término de este periodo se molieron con un molino eléctrico y así liberar los compuestos de los compartimentos vacuolares en los que se hallan (Bonzani *et al.*, 2007; Delbón *et al.*, 2012).

Se utilizó metanol grado reactivo como solvente. La técnica consistió en colocar una muestra (50 g) en remojo dentro de 400 mL de metanol, como se muestra en la Fig. 6, esto se hizo durante 9 días a temperatura ambiente y diariamente se realizó un recambio del mismo volumen, agitando en el momento que el solvente era adicionado. El séptimo día no se hizo recambio ni se separó el metanol del material vegetal, en cambio se dejó reposar hasta el octavo día, cuando se coló por última vez el metanol, incorporándose al volumen anterior. Esto se hizo por duplicado, obteniéndose al final 8.4 L. El metanol se almacenó diariamente en un una garrafa plástica (filtrando el extracto con una malla convencional metálica), ésta se mantuvo en un cuarto oscuro y fresco a temperatura ambiente hasta la preparación de las disoluciones, las cuales fueron almacenadas en frascos ámbar de 2 L (Vargas, 2011).

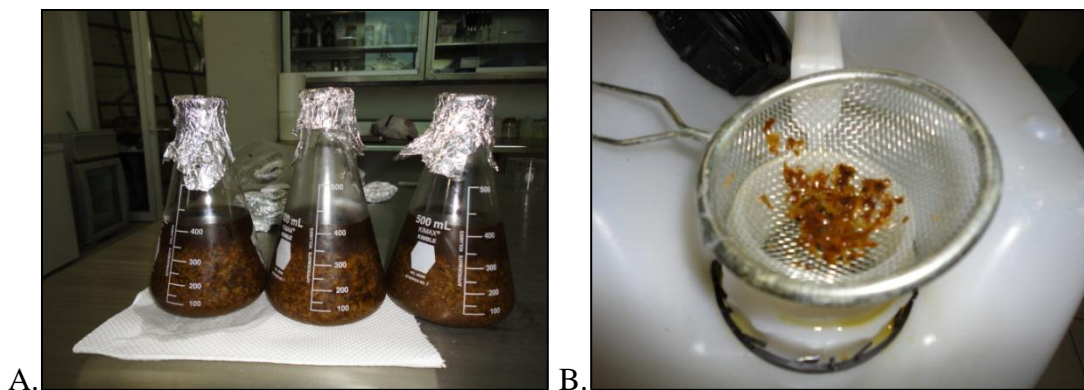


Fig. 6. Maceración de 50 g de vainas molidas (sin semilla), en 400 mL de metanol al 70 %, por cada matraz. B. Filtración del metanol resultante del recambio diario.

Para separar el metanol del extracto de timbe se utilizó un rotavapor, Fig. 8 (marca BUCHI R-114), que consiste en una tina de acero inoxidable con control de temperatura (marca BUCHI, B-480), un rotor con regulador de velocidad, un condensador de espiral, un recirculante con tina para el agua y una bomba de vacío. Las funciones de cada parte se describen a continuación:

1. Bomba: Hacer el vacío en matraz con la solución a separar, el metanol se evapora a 64.5°C , sube hacia el condensador (que se encuentra al vacío) el extracto queda en el matraz.
2. Recirculante. Mantiene la temperatura del refrigerante por debajo del punto de evaporación del disolvente, a través de la circulación de un líquido.
3. Refrigerante (condensador) para condensar el vapor del solvente (en este caso, metanol) y de esta forma recuperarlo.
4. Rotor, hace girar el matraz con la muestra que a su vez se encuentra parcialmente sumergida en la tina con agua caliente. Se mantuvo a una
5. Calentador de agua. Para evaporar a “baño maría”. Regula la temperatura del agua.

Al finalizar la extracción del solvente se raspó del matraz de bola para guardar el extracto así obtenido. La masa resultante fue guardada en refrigeración dentro de papel aluminio como se muestra en la Fig. 7 (para protegerla de la radiación).

Para preparar las soluciones se disolvieron 0.21 g del extracto en 2.1 L de agua destilada y 0.63 g en 2.1 L de agua destilada (para las concentraciones de 100 y 300 ppm, respectivamente). El extracto se pesó en una balanza analítica y fue cortado con un asa.



Fig. 7. Extracto de timbe sobre papel aluminio luego de la separación por rotavapor.

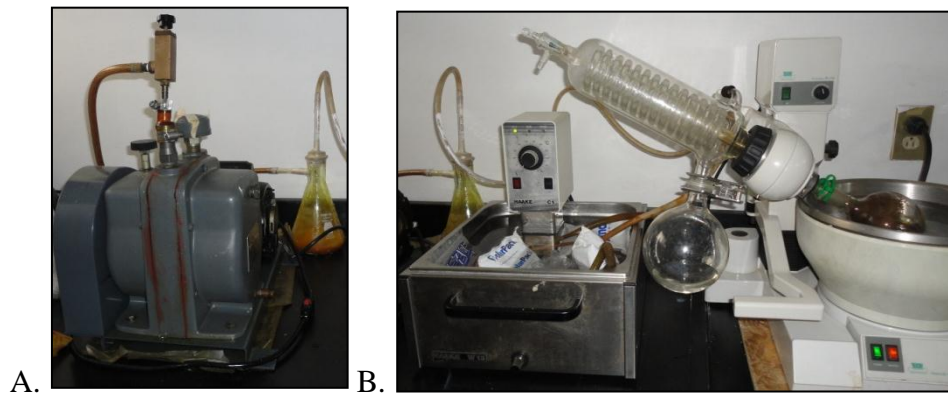


Fig. 8. Rotavapor utilizado para la separación de fases sólida-líquido: A. Bomba de vacío. B. (der-izq) tina con control de temperatura, rotor acoplado a refrigerante (al que se acopla el matraz con solvente a separar), tina con recirculante.

3.4. Ensayos *in vivo*

Se establecieron tres experimentos utilizando al ajo como planta hospedera de *S. cepivorum*. A continuación se describen las condiciones bajo las cuales se desarrollaron los experimentos.

CÁMARA DE AMBIENTE CONTROLADO

El primer experimento se desarrolló en el departamento de Bioquímica, del Instituto Tecnológico de Celaya, Guanajuato. Se evaluó el EMVT como tratamiento preventivo. Inició el 5 de octubre de 2011 con una duración de diez días. Se utilizó una cámara de ambiente controlado donde la temperatura se mantuvo cercana a 17°C.

Se aplicaron 10 mL del extracto a 100 ó 300 ppm cuatro días antes de inocular las plantas de ajo con el hongo (*Sclerotium cepivorum*). Con una modificación de Ulacio (*et al.*, 2003) se realizó la inoculación a nivel radicular, enterrando cuatro fragmentos de 1x1 cm de medio de cultivo, obtenidos de una colonia con esclerocios y micelio, de esta manera se inoculó cada planta con un promedio de 140 esclerocios. Una semana después se evaluó visualmente la condición de las plantas de ajo.

Para establecer el grado de severidad de una fitopatología se han desarrollado diferentes metodologías, algunos autores se basan en la pérdida de peso de la materia seca (Reyes *et al.* 2003), otros en una escala arbitraria según una evaluación visual (Moreno y Acevedo, 2002). En este primer experimento se estableció una escala arbitraria y se contabilizó el porcentaje de plantas dañadas, observando si se presentaban síntomas de la enfermedad en follaje (clorosis) y en raíz (maceración de raíz y bulbo, presencia de esclerocios y/o micelio) en base a lo descrito por Delgadillo (*et al.* 2000).

CASA SOMBRA

Los experimentos desarrollados bajo condiciones de malla sombra se establecieron en la Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Amazcala, El Marqués, municipio localizado al

Noroeste del estado de Querétaro, entre los 20° 31' y 20° 58' de latitud Norte, longitud se entre 100° 09' y los 100° 24' del Oeste. Con una altitud de 1850 msnm.

Las condiciones ambientales para el primer experimento donde se evaluó el EMVT como preventivo fueron las siguientes: en marzo la temperatura mínima de 2°C y máxima de 31.7°C, HR mínima de 10% y máxima de 100%, abril de 2012 temperatura de mínima de 8°C y máxima de 28.6°C, HR mínima de 11% y máxima de 93%. Para mayo la temperatura mínima fue de 7°C, máxima de 37.5°C, HR mínima de 21.7% y máxima de 99%.

Las aplicaciones pre-inoculación constaron de 10 mL del EMVT al tallo de cada planta a 100 ppm ó 300 ppm. Se tuvo un testigo al que se le aplicaron 10 mL de agua destilada. Se evaluó la condición de las plantas al final del experimento (28 días después de inoculación) en base a la materia seca, expresada en gramos (las plantas fueron secadas a temperatura ambiente bajo malla sombra (9°C mínima temperatura, 35°C máxima temperatura, radiación máxima de 1058 W/m²).

El segundo experimento tuvo como objetivo evaluar el EMVT como tratamiento correctivo (aplicándolo pos-inoculación). Para realizar la inoculación del hongo se tomó un cuadro de 1x1 cm del medio de cultivo con esclerocios, la densidad fue cercana a 5000 esclerocios kg⁻¹ de sustrato (Delgadillo *et al*, 2002). Se establecieron dos testigos que constaron de plantas con el hongo y sin aplicación del extracto, y otro testigo sin el hongo y sin aplicación del extracto.

El tercer experimento se estableció para conocer la fitotoxicidad del extracto. Se realizaron aplicaciones del mismo a diferentes concentraciones y frecuencias de aplicación.

Para la evaluación en el segundo y tercer experimento (evaluación del EMVT como tratamiento correctivo y de fitotoxicidad, respectivamente) se estableció una escala arbitraria que permitió conocer el porcentaje de plantas cloróticas (síntoma tomado como indicador de la severidad de los daños causados por el hongo o por toxicidad del extracto, en cada caso). Se contaron como plantas cloróticas aquellas que presentaron la mitad o más de sus hojas con una coloración amarilla. Además se hicieron observaciones visuales de las raíces en base a Delgadillo (*et al*. 2000) para saber si había o no maceración de las mismas, pues es uno de los síntomas de la pudrición blanca de acuerdo a Delgadillo (*et al*. 2000).

$$\% \text{ Clorosis} = \frac{\text{Plantas cloróticas}}{\text{Total de plantas}} * 100$$

3.5. Evaluación de efecto antimicrobiano *in vitro*

Las pruebas de laboratorio se desarrollaron en el laboratorio de la Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Amazcala, El Marqués, Qro.

Cinco esclerocios, igualmente distanciados, se colocaron en cada caja petri con medio PDA+EMVT (1mL) o PDA+Agua destilada (1mL), o PDA+Captan (1mL) y se incubaron entre 17 y 20°C en oscuridad. La germinación de esclerocios se cuantificó desde un día hasta tres días después de la siembra de esclerocios. La inhibición del crecimiento de esclerocios se calculó de acuerdo a la ecuación propuesta por Pinto (1998), modificada, donde: g.e. es la germinación de los esclerocios tratados; g.c. es la germinación en el control (PDA+Agua destilada). Se probó el fungicida comercial Captan® incubando esclerocios en medio PDA con 1 mL de este fungicida a 100 ppm. El control negativo estuvo compuesto por esclerocios crecidos en PDA más 1 mL de agua destilada.

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(1 - (g.e.))}{g.c.} * 100$$

3.6. Diseño experimental y análisis estadístico

EVALUACIÓN *IN VITRO*

El diseño experimental fue completamente al azar. La unidad experimental consistió en una caja petri. Se realizaron tres réplicas, cada una estuvo compuesta por una caja petri con cinco esclerocios. Se probó un factor de variación, la concentración del extracto con dos niveles (100 ppm y 300 ppm). Los dos tratamientos se distribuyeron en un diseño experimental completamente al azar.

EVALUACIÓN *IN VIVO*

La unidad experimental constó de 8 plantas y se realizó una sola repetición para cada experimento. En el primer experimento con el que se evaluó la aplicación preventiva del extracto (en cámara de ambiente controlado y bajo malla sombra) el factor de variación fue la concentración del EMVT con dos niveles, 0: 100 ppm y 1: 300 ppm; por lo que se tuvieron dos tratamientos distribuidos bajo un diseño por bloques completos al azar al azar al azar al azar. En el segundo y tercer experimento se probaron dos factores de variación: concentración del EMVT con dos niveles (0: 100 ó 1: 300 ppm) y frecuencia de aplicación con tres niveles: 1) una aplicación al inicio del experimento; 2) aplicaciones cada 15 días y 3) aplicaciones cada 8 días. Los seis tratamientos se distribuyeron en un diseño experimental completamente al azar.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se sometieron a un análisis de varianza y prueba de separación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$), mediante el paquete estadístico SAS.

IV. RESULTADOS

4.1. Extracción de bioactivos

De los 50 g de vainas molidas se obtuvieron 8 g de extracto concentrado, esto implica que se obtuvo un rendimiento de 16%, para esta misma especie y método Vargas (2011) reportó un rendimiento de 6.36%, la diferencia puede deberse a que el tiempo de maceración utilizado en este trabajo fue de 9 días, mientras que en el experimento de Vargas (2011) fue de 7 días, además, por cada 50 g de muestra Vargas (2011) utilizó 200 mL de metanol y aquí se emplearon 400 mL, este cambio en metodología se debió a que 200 mL no eran suficientes para humedecer los 50 g de la muestra de vainas molidas.

4.2. Evaluación *in vitro*

Para evaluar la capacidad antimicrobiana del EMVT se probó su efecto sobre la germinación del hongo *S. cepivorum*, haciendo crecer éste en medio PDA con el EMVT (a 100 y 300 ppm). En la Fig. 9 se muestra el desarrollo micelial, lo que indica que a las concentraciones probadas el EMVT no inhiben la germinación de los esclerocios. A pesar de esto, el extracto mostró un efecto fungistático, al retardar el desarrollo micelial al tercer día de incubación (Fig. 9).

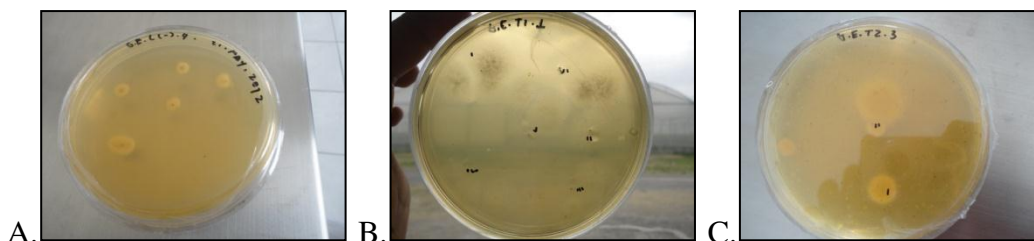


Fig. 9. Desarrollo de micelio en tres tipos de medio, al tercer día de incubación (15-20°C): A) PDA, B) PDA + 1 mL EMVT 100 ppm y C) PDA + EMVT 300 ppm.

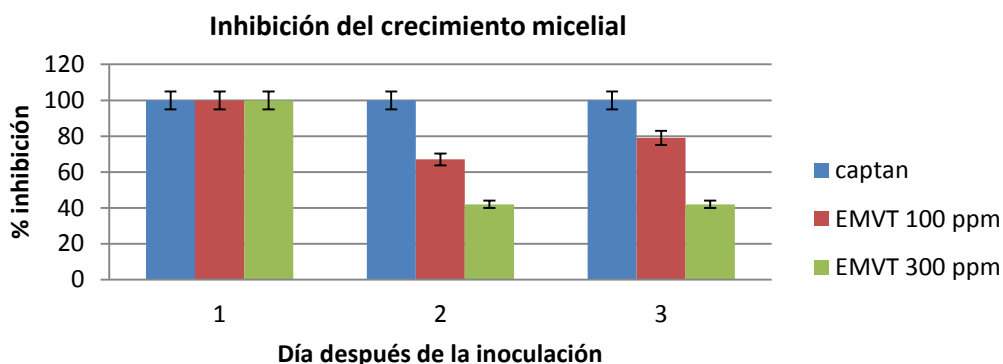


Fig. 10. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo crecido en diferentes medios (PDA + EMVT 100 ppm, PDA + EMVT 300 ppm, PDA+ Captan®. La concentración que reportó mayor porcentaje de inhibición fue 100 ppm.

4.3. Ensayos *in vivo*

EFEECTO ANTIMICROBIANO DEL EMVT PRE-INOCULACIÓN

Todas las plantas de los tratamientos con el extracto conservaron un aspecto sano en la mayor parte de su raíz, se observaron aún de color blanco y sin maceración o ligera maceración (Fig. 12 y Fig. 13), al contrario de las raíces del tratamiento testigo (Fig. 11).

El 68.7% de las plantas que fueron inoculadas y tratadas previamente con el extracto conservaron su raíz con la fuerza suficiente para no ser desenterrada con facilidad. El testigo sufrió maceración total de su raíz (Fig. 11).



Fig. 11. Planta del tratamiento testigo (inoculada, sin aplicación de extracto), se puede observar el sistema radicular destruido en su totalidad.



Fig. 12. Planta del tratamiento con extracto a 100 ppm. A. Hojas sanas, no se observó clorosis ni marchitamiento. B. Bulbo sin pudrición ni presencia de micelio o esclerocios. C. Sistema radicular sano (raíces abundantes, blancas), menos del 25% de las raíces sufrió maceración.



Fig. 13. Planta del tratamiento con extracto a 300 ppm. A. Parte aérea mostrando síntomas de marchitez y clorosis. B. Bulbo y tallo con pudrición. C. Sistema radicular con maceración.

Además de utilizar la cámara de ambiente controlado, el experimento se desarrolló bajo malla sombra. La evaluación del estado de las plantas se hizo al día 28 después de la inoculación y se observó que las plantas del tratamiento testigo (a las que no se les aplicó EMVT y no fueron inoculadas) presentaron un grado de clorosis y maceración radicular mayor con respecto a las que fueron tratadas con el EMVT (e inoculadas).

Se evaluó el EMVT de manera preventiva, haciendo aplicaciones pre-inoculación. El experimento duró de abril a mayo de 2012, en condiciones de crecimiento bajo malla sombra, donde se evaluó el peso seco al final del experimento (junio de 2012), los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Promedio del peso seco de las plantas tratadas con EMVT en los tratamientos preventivos.

Tratamiento	Peso (*)
100	1.31 ^a
300	0.74 ^b
Control	0.78 ^b

*Es el peso seco expresado en gramos, $p < 0.0001$. $\alpha = 0.05$.

Debido a que durante el experimento no se realizó ningún tipo de fertilización mineral u orgánica (excepto los nutrientes presentes en la sustrato Peat-Moss®), las plantas control pudieron estar más expuestas a factores abióticos (temperaturas extremas y estrés por sequía, principalmente), así como a factores abióticos, como ataques de insectos (se halló presencia de gusano), pues las deficiencias nutricionales además de disminuir el rendimiento, elevan el riesgo de que la planta sea atacada por algún patógeno (Ulacio *et al.*, 2003).

EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EMVT POS-INOCULACIÓN

En el segundo experimento, donde se usó el EMVT como tratamiento correctivo (aplicaciones pos-inoculación), para la evaluación del mismo se revisaron tres plantas al azar del tratamiento donde se aplicó extracto a 100 ppm (una sola vez al inicio del experimento), en dos de las cuales se observó que pese al daño en las raíces (ver Fig. 14) la planta se sacó del sustrato sin que éstas se desprendieran, como ocurrió en el control negativo (Fig. 16).



Fig. 14. Planta con una aplicación de extracto a 100 ppm post-inoculación. Observación al día 28 después de iniciado el experimento. Las raíces que sufrieron maceración. Se puede observar la maceración de las raíces y parte del tallo.

Al evaluar el extracto en aplicaciones pos-inoculación a la concentración de 300 ppm (cada 8 días), se seleccionaron tres plantas y se observó que 16 días después las plantas estaban en mejores condiciones que las que tenían el extracto a 100 ppm, y así continuaron hasta el final del experimento (Fig. 15).

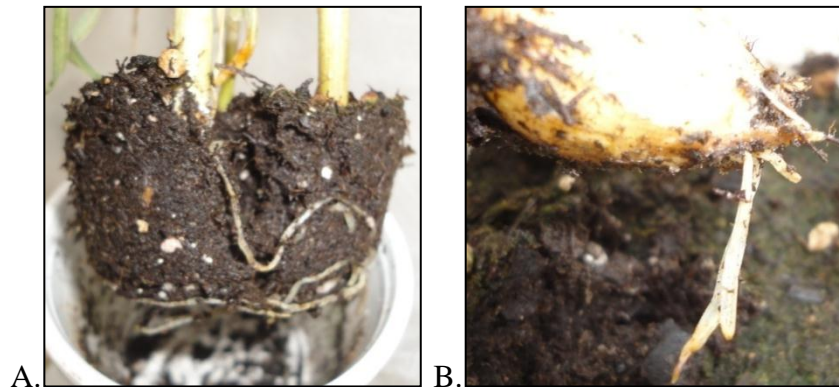


Fig. 15. Plantas con extracto a 300 ppm, pos-inoculación (una aplicación cada 8 días). Observación al día 28 después de iniciado el experimento (A). Caso más severo de la enfermedad (B), donde se observa la destrucción total del sistema radicular de una planta.

En las tablas 2 y 3 se muestran las evaluaciones visuales, en base a una escala arbitraria propuesta para este caso. Se muestra el porcentaje de plantas cloróticas y el porcentaje de plantas con maceración radicular en los últimos días del experimento.

Tabla 2. Porcentaje de plantas cloróticas (al día 28 después de iniciado el experimento).

Tratamientos	Intervalo de aplicación (días)			Promedio (%)
	0	8	15	
100	63%	38%	63%	55%
300	88%	75%	60%	74%
*control	71%			

*El control constó de plantas inoculadas con el hongo, sin aplicaciones de EMVT y sin aplicación de fungicida comercial.

Tabla 3. Porcentaje de plantas con maceración radicular (día 35-37 después de iniciado el experimento).

Tratamiento	Intervalo de aplicación			Promedio (%)
	0	8	15	
100	75%	50%	43%	55.9%
300	71 %	63%	33%	56%

En el control negativo, donde no se aplicó ningún tratamiento a las plantas inoculadas con el hongo, se observó clorosis del 100% y el sistema radicular estaba completamente macerado, síntomas característicos de la pudrición blanca por *Sclerotium cepivorum* (Fig. 16), esto se observó para el 75% de las plantas.

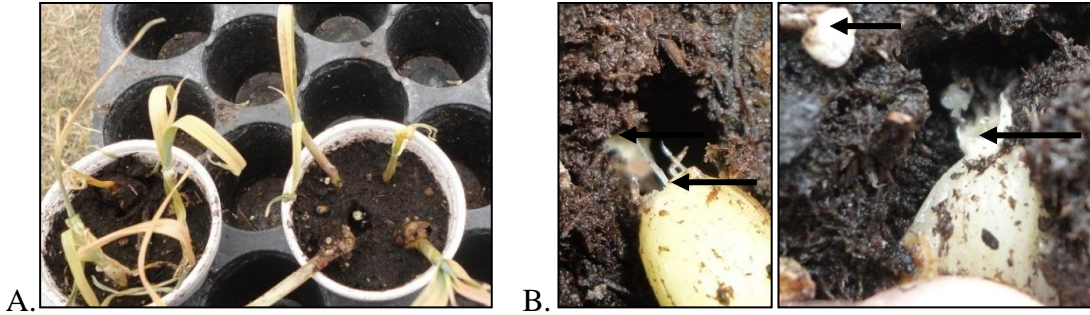


Fig. 16. Control negativo: plantas inoculadas sin aplicación de EMVT ni Captan presentan. A. Se observa clorosis en el 100% de las hojas. B. Las flechas indican las zonas donde el tallo y las raíces sufrieron maceración. Observación al día 28 después de iniciado el experimento.

EFEECTO FITOTÓXICO DEL EMVT

En el experimento 3 (prueba de fitotoxicidad), en la evaluación del extracto a 100 ppm, se observó que con una sola aplicación se obtuvo un menor número de plantas marchitas, y para aplicaciones cada 8 y 15 días se observó un 50% de marchitez. Mientras que para el extracto a 300 ppm, con aplicaciones cada 8 días se tuvo la menor cantidad de plantas marchitas, un 50% con una sola aplicación y el 100% de éstas con una aplicación cada 15 días. Lo anterior se observó al día 26 después de iniciado el experimento. Los resultados de la observación visual se presentan en la Tabla 4.



Fig. 17. A. Plantas sin aplicación del extracto, sin inocular. B Plantas con aplicaciones del extracto a 100 ppm (en las tres frecuencias de aplicación). C. Plantas con aplicaciones del extracto a 300 ppm (en las tres frecuencias de aplicación).

Tabla 4. Porcentaje de plantas cloróticas en la prueba de fitotoxicidad.

Concentración	Frecuencia de aplicación*		
	1 AI	1 C8	1 C15
100 ppm	38	50	50
300 ppm	50	25	100
0 ppm	71		

* 1 AI: Una aplicación al inicio. 1 C8: Una aplicación cada 8 días. 1 C15: Una aplicación cada 15 días.

Se observó también que el nivel de clorosis no fue significativamente diferente entre las dos concentraciones, sin embargo sí lo fue para el control (aplicaciones de agua destilada), donde se presentó el mayor nivel de clorosis. Así mismo, al evaluar la frecuencia de aplicación y el nivel de clorosis, se observó que no existió diferencia significativa entre las tres frecuencias probadas.

V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

5.1. Extracción de bioactivos

En la extracción de compuestos bioactivos se buscó obtener el mayor rendimiento de compuestos fenólicos, pues Vargas (2011) reportó para esta especie (*Acaciella angustissima*) alto contenido de compuestos fenólicos, pues son éstos los que se reportaron en vainas de timbe y además poseen actividad antifúngica (Alvarado *et al.* 2011), se debe considerar que la deshidratación de la vaina para realizar la extracción se hizo al sol (sin protección contra los rayos UV), por lo que se esperaría una degradación parcial de los compuestos bioactivos (Grotewold, 2006; Martínez, 2001).

5.2. Evaluación *in vitro*

El efecto fungistático observado se atribuye al ácido protocatecuico, compuesto mayoritario del extracto, pues está bien documentado que este ácido es capaz de inhibir el desarrollo de hongos fitopatógenos como en el caso de las cebollas moradas resistentes a *Colletotrichum circinans*, donde junto con el catecol el ácido protocatecuico previene la germinación de esporas de este hongo (Montes, 2009).

Como se mencionó, el EMVT no inhibió la germinación de los esclerocios a las concentraciones aquí evaluadas, aunque retardó el desarrollo micelial hasta un 80% al tercer día de incubación. Respecto a este resultado hay al menos dos aspectos a considerar, el tipo de extracción y las concentraciones evaluadas.

En relación con el tipo de extracción y por tanto de compuestos bioactivos obtenidos, el extracto (de naturaleza flavonoide) presentó una capacidad antifúngica baja comparada con la de otro tipo de compuestos bioactivos. En el trabajo de Russo (*et al.* 2013) se reportó inhibición total del crecimiento micelial de *Sclerotium cepivorum* con el aceite esencial de *Thymus capitatus* a una concentración de 200 ppm.

El resultado concuerda también con el trabajo de Montes y Prados (2006), quienes al evaluar los extractos acuosos (aceites esenciales) de 15 especies de plantas contra *Sclerotium*

cepivorum, encontraron efecto fungistático (después de 4 días de incubación). Cada extracto presentó de manera individual efecto fungicida a una concentración de 5%, pero perdió el mismo (antagonismo) cuando fueron combinados los extractos entre sí. Los autores también explican que el esclerocio fue afectado por un grupo de extractos y el micelio por otro, sin embargo descubrieron que algunos extractos detuvieron el desarrollo micelial y además inhibieron el desarrollo del esclerocio (algo que no se había reportado antes).

El trabajo de Pinto *et al.* (1998) fue el antecedente del uso de los extractos acuosos de plantas en el combate de *Sclerotium cepivorum*, ellos ya habían reportado que extractos en acetona-agua de las hojas de *Brachiaria humidicola*, *Crotalaria paulina*, *Eucalyptus citriodora* y *Brassica oleracea*, inhibieron completamente tanto el desarrollo del micelio como la germinación de los esclerocios a 1000 y 10 000 ppm

En los extractos acuosos los compuestos son generalmente terpenos. Los terpenos son otro grupo estudiado como agente para el combate de la pudrición blanca causada por *Sclerotium cepivorum*. Lucini *et al* (2006) encontraron que la mayoría de los monoterpenos incrementaron el contenido de ergosterol con la consecuente disminución en la razón fosfolípido/esterol (modificando la permeabilidad de la membrana celular). Cuando el hongo creció en presencia de dos terpenos (timol y borneol), el contenido de ácidos grasos saturados y los peróxidos lipídicos se incrementó, concomitante con un incremento del diámetro del esclerocio. Estos resultados indican que estos terpenos podrían ser promotores de la generación de peróxidos lipídicos. Por otro lado, también hallaron que la diferenciación de los esclerocios fue retardada principalmente por el alcanfor, 1,8-cineole, linalol y mentol.

Con referencia a las concentraciones evaluadas, la pobre actividad del EMVT sobre *Sclerotium cepivorum* puede deberse a la concentración empleada (pues no se determinó la concentración mínima inhibitoria sobre este hongo, solamente se tomó como referencia la concentración utilizada del extracto sobre *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capsici*, que son hongos de diferente especie a *Sclerotium cepivorum*).

Pese a lo anterior se observó que el EMVT posee actividad antifúngica contra el hongo *Sclerotium cepivorum*, si bien no posee actividad fungicida, sí posee actividad fungistática al retardar la germinación de los esclerocios.

5.3. Evaluación *in vivo*

Las plantas poseen mecanismos de defensa constitutivos (pre-existentes) e inducibles (post-formados). En el primer grupo se hallan las defensas estructurales y las bioquímicas, y dentro de las segundas se encuentra la acción de los metabolitos secundarios. El ácido protocatecuico es uno de estos metabolitos secundarios del cual se ha documentado confiere resistencia contra el hongo *Colletotrichum circinea* en cebollas moradas (Riveros, 2010).

Las pruebas *in vivo* mostraron que el extracto mejoró la condición de marchitez y clorosis, además, las plantas tratadas con el extracto tuvieron un mayor peso seco al final del experimento. Al observar los tratamientos control (evaluando la fitotoxicidad del extracto en las plantas) aquellas plantas más débiles (cloróticas, achaparradas) fueron las que no recibieron aplicación alguna del extracto. Aunque a 300 ppm y con la frecuencia de aplicación más alta probada puede dañar a la planta (mayor clorosis), la evaluación visual de las plantas indica que a la concentración de 100 ppm el extracto las ayuda a combatir el estrés abiótico (temperaturas extremas, estrés hídrico) y biótico (se tuvo presencia mínima de gusano minador), un efecto conocido de los metabolitos secundarios (Montes, 2009; Salgado, 2012).

Los mejores resultados respecto al grado de severidad (clorosis) de la enfermedad se obtuvieron con el tratamiento preventivo respecto al correctivo, lo cual concuerda bien con Veloz (*et al.* 2010).

El experimento se desarrolló rápidamente en la cámara de ambiente controlado, en 10 días después de la inoculación ya se observaban las diferencias entre los tratamientos. En cambio, la variación extrema de temperatura en el Campus Amazcala retardó el desarrollo del hongo y por ende los síntomas de la enfermedad (debilitamiento de raíz). Los resultados no fueron visibles sino un mes después de iniciado el experimento.

Los factores de ruido en los experimentos *in vivo* se considera fueron: Variaciones de temperatura. Altas temperaturas que no favorecen el desarrollo del hongo (se puede llevar un registro de las temperaturas consultando los datos de la estación meteorológica de Amazcala). Y falta de fertilización, la cual ocasiona un estrés nutricional, enmascarando los resultados (Oyoque, 2008). Por esta razón, aunque se pretendía utilizar la clorosis como indicador de la

severidad de la enfermedad, se optó por evaluar la misma a través del peso de los bulbos y la aparición de zonas necróticas en cuello y bulbo.

En el sistema de defensa de las plantas existe un estado llamado *priming*, éste es el proceso fisiológico mediante el cual una planta se prepara para actuar más rápida y agresivamente a un futuro estrés biótico o abiótico (Edreva, 2004), esto fue lo que se observó en el testigo (aplicaciones de agua destilada). Algunos compuestos de naturaleza fenólica actúan como inductores de resistencia a estos tipos de estrés. Por lo cual aunque las pruebas *in vitro* muestran un baja actividad antifúngica, las pruebas *in vivo* indican que el extracto puede estar funcionando como un inductor de la resistencia hacia condiciones ambientales adversas y hacia el ataque del hongo.

Finalmente y aunque en los experimentos *in vitro* el EMVT mostró una actividad pobre, en comparación con este mismo extracto sobre hongos fitopatógenos *Fussarium oxysporum* y *Phytophthora capsici*, se debe considerar que en los experimentos *in vivo* el EMVT muestra un potencial en el manejo de la pudrición blanca, pues disminuyó significativamente los síntomas de esta enfermedad, y además tiene potencial de ser una buena alternativa al no presentar fitotoxicidad a la mínima concentración evaluada (que además fue la concentración a la que se tuvo el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial).

REFERENCIAS

- Abeyasinghe, Saman. 2009.** Efficacy of combine use of biocontrol agents on control of *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* of *Capsicum annuum*. Archives of Phytopathology and Plant Protection 42(3): 221–227.
- Adams, P. B., Papavizas, G. C. 1971.** Effect of inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and some soil environmental factors on disease servery. Phytopathology 61:1253-1256.
- Agrios, G.N. 1996.** Fitopatología. Ed. LIMUSA, 2a ed. México. 838 p.
- Aguilera-Ortíz, M., Reza-Vargas, M. C., Chew-Mandinaveitia, R. G., Meza-Velázquez, J. A. 2011.** Propiedades funcionales de las antocianinas. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad de Sonora.
- Albarado-Lucena, S., Ulacio-Osorio, D., Sanabria-Chópite, M. E., Jiménez-Tamayo, M. 2011.** Bol. Centro Invest. Biol. 45(3): 217-236. Venezuela.
<http://revistas.luz.edu.ve/index.php/bcib/article/viewFile/11293/10926>
- Aljaro-U., A., Monardes-M., H., Urbina-Z., C., Martin-B., A. 2009.** Manual de cultivo del ajo (*Allium sativum* L.) y cebolla (*Allium cepa* L.). Facultad de Cs. Agronómicas Universidad de Chile. InnovaChile CORFO.
- Argüello, E., Yossen E., Lucini y M. Conles. 2009.** Efecto del extracto de puerro (*Allium porrum* L.) sobre la supervivencia de esclerocios de *Sclerotium cepivorum*. AGRISCIENTIA,- Vols. XXVI (1): 23-27.
- ASERCA. 1999.** El ajo mexicano, una historia de eficiencia y calidad. Revista Claridades Agropecuarias. No. 68. 1999. Disponible en:
<http://www.aserca.gob.mx/sicsa/claridades/portadas.asp>
- Barrientos, J. C., Reina, M. L., Chacón, M. I. 2012.** Potencial económico de cuatro especies aromáticas promisorias para producir aceites esenciales en Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas. Vol. 6-No.2. pp. 225-237, 2012.
<http://www.scielo.org.co/pdf/rcch/v6n2/v6n2a10.pdf>
- Bernhoft, A., Paulsen, B. S., Ingebrigtsen, K., Spillum, B. J., Muan, B., Blomhoff, R., Svendsen, M., Ellingsen, I., Tonstad, S., Adlercreutz, H., et al. 2010.** Bioactive compounds in plants-benefits and risks for man and animals. The Norwegian Academy of Science and Letters.

- Bonzani, N. E., Costaguta, M., Barboza, G. E. 2007.** Estudios anatómicos en especies de *Mentha* (Fam. *Lamiaceae* de Argentina). *Arnaldoa* 14(1): 77-96, 2007.
- Brent, K. J., Hollomon, D. W. 2007.** Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? 2a edición. FRAC Monografía 1. ISBN 90-72398-07-6 [Online]:
<http://www.frac.info/>
- Carretero-Accame, M. E. 2000.** Compuestos fenólicos: Taninos. *Panorma Actual Med* 2000; 24(235): 633-636.
- Celdeño, L., Palacios-Prü, E. 1992.** Características ultraestructurales de *Sclerotium cepivorum* Berk., agente causal de la “pudrición blanca”. *Acta Científica Venezolana* 43:178-189, 1992. [Online]
<http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/36088/1/38.pdf>
- Choque-Aspiazu, G., Fuertes, W., Flores-Calero, M. J., Pozo, A., Minango, J., Olmedo, F., Tierra, R., Alvarez, C., Koch, A., Álvarez, X., Cumbal, L., Bonifaz, H., Carrera, E., Proaño, Karina, De la Cruz, L. 2011.** Revista Digital VI CONGRESO Ciencia y Tecnología ESPE 2011. [Online]
http://www.espe.edu.ec/portal/files/sitio_congreso_2011/papers/V4.pdf
- Cowan, M. M. 1999.** Plant Products as Antimicrobial Agents. American Society for Microbiology. [Online]
<http://cmr.asm.org/content/12/4/564.long>
- Csurhes, S., Navie S., Weed risk assessment. White ball acacia *Acaciella angustissima* (syn. *Acacia angustissima*, *Acacia boliviana*). [online]. 2009. [citado 01/09/2012]. Disponible en: http://www.daff.qld.gov.au/documents/Biosecurity_EnvironmentalPests/IPA-White-Ball-Acacia-Risk-Assessment.pdf**
- Delbón, N., Cosa, M. T., Bernardello, G. 2012.** Exomorfología y anatomía de órganos vegetativos aéreos en especies de *Fluorensia* DC. (*Asteraceae*) con importancia fitoquímica. *Acta Botanica Brasilica* 26(1):2-10, 2012.
- Delgadillo-Sánchez, F., Arévalo-Valenzuela, A., Torres-Pacheco, I.** Manejo de la pudrición blanca del ajo en Guanajuato. 2000. INIFAP. Desplegable para productores núm. 3. Marzo 2000.
- Delgadillo-Sánchez, F., Zavaleta-Mejía, E., Osada-Kawasoe, S., Arévalo-Valenzuela, A., González-Hernández, V. A., Nieto-Angel, D., Torres-Pacheco, I. 2002.** Densidad de

- inóculo de *Sclerotium cepivorum* Berk. y su control mediante tebuconazole en ajo (*Allium sativum* L.). Rev. Fitotec. Mex. Vol. 25 (4): 349-354, 2002.
- Delgadillo-Sánchez, F., Zavaleta-Mejía, E., Aguilar-Laguna, A., Arévalo-Valenzuela, A., Torres-Pacheco, I., Valdivia-Alcalá, R., Garzón-Tiznado, J. A. 2004.** Manejo de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) del ajo en Guanajuato, México. Agricultura Técnica en México ISSN: 0568-2517.
- Drago-Serrano, M. E. 2007.** Flavonoides recombinantes de relevancia farmacéutica. Revista Farmacéutica Mexicana [en línea].
Disponible en:
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57938407>
- Edreva, A. A novel strategy for plant protection: Induced resistance. 2004.** Journal of Cell and Molecular Biology 3: 61-69, 2004. Haliç University, Turkey.
<http://jcmb.halic.edu.tr/pdf/3-2/a.pdf>
- Espinosa-Pozo, M., S. Enríquez, A. Cervantes, M. González, J. M. Ramos, K. Silva. 2003.** FUNDACIÓN PRODUCE QUERÉTARO Plan de Investigación y Transferencia de Tecnología Cadena Agroalimentaria de Ajo. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Querétaro.
- Espinosa-Pozo, M., García-Jurado, A., Ebel-Fonseca, A., Leal-Espinosa, C., Guillén-Gutiérrez, A. C. 2008.** Actualización del Programa Estratégico de Necesidades de Investigación y Transferencia de Tecnología para el Estado de Guanajuato.
- Flora Digital:** Península de Yucatán. 2010. Herbario CICY.
http://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/ficha_virtual.php?especie=1503
- Food and Agriculture Organization, **FAOSTAT. 2012.**
<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> y
<http://faostat3.fao.org/home/index.html#COMPARE>
- García-Nava, M. A. 2007.** Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Memorias del Programa verano de la Ciencia 2007. Universidad Autónoma de Querétaro. [Online]
<http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/>
- Gardiner, Chris. Cox, Kendrick. Wright, Carole. Keating, Mark.** Passage and survival of *Acaciella angustissima* (Mill.) Britton & Rose and *Aeschynomene paniculata* Willd. ex

- Vogel seed through the seep gut. 2010. Seventeenth Australasian Weeds Conference.
<http://www.caws.org.au/awc/2010/awc201014181.pdf>
- González-Ruíz, G.** 2004. Estudio de la diversidad genética de poblaciones de ajo (*Allium* L.) en México. Querétaro, Méx.
- Grotewold, Erich.** The Science of flavonoids. 2006. The Ohio State University Columbus, Ohio, EU.
http://cs5594.userapi.com/u11728334/docs/bb47d6a4547c/Erich_Grotewold_The_Science_Of_Flavonoids_319.pdf
- Gutiérrez, S., Casqueiro, L. y Martín, J. F.** 2000. Los hongos como factorías celulares: biodiversidad de metabolitos secundarios. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17:S54-S60. [Online]
<http://www.reviberoammicol.com/2000-17/S54S60.pdf>
- Harbone, J. B.** 2003. Secondary Products Phytoalexins, Natural Plant Protection. Encyclopedia of Applied Plant Sciences, Editor-in-Chief. Brian Thomas, Oxford, 2003. 1152-1159 p. [Abstract Online]
<http://dx.doi.org/10.1016/B0-12-227050-9/00131->
- Kenneth R. Markham, Ken G. Ryan, Kevin S. Gould, Geoff K. Richards.** 2000. Cell wall sited flavonoids in lisianthus flower petals. *Phytochemistry*. 54(7), 681-687. [Abstract Online]
[http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00180-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00180-1)
- Kuč, J., Rush, J.S.** 1985. Phytoalexins. *Arch Biochem Biophys*. 1985 Feb 1; 236(2):455-72. [Abstract Online]
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3882051>
- Lucini, E. I., Zunino, M. P., López., M. L. Zygadlo, J. A.** 2006. Effect of monoterpenes on lipid composition and sclerotial development of *Sclerotium cepivorum* Berk. *J. Phytopathology* 154, 441-446 (2006).
- Luna-Martínez, F., Ponce-Noyola, P.** 2001. Caracterización molecular de aislados de *Sclerotium cepivorum* mediante análisis del polimorfismo de los fragmentos amplificados al azar. Tesis, Universidad de Guanajuato.
- Mestro-Durán, R., León, R., Ruiz-Gutiérrez, V.** 1993. Los compuestos fenólicos en la autodefensa de los vegetales. Instituto de la Grasa y sus Derivados (CSIC). Sevilla. España Vol. 4 Fasc. 6 (1993). Disponible en:

<http://grasasyaceites.revistas.csic.es>

- Marroquín, G., Adela M. 2008.** Obtención del extracto tánico por maceración dinámica de la corteza de árboles jóvenes de cuatro especies forestales, a nivel laboratorio. Tesis licenciatura.
- Martínez-Flores, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., Tuñón, M. 2002.** Revisión Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* (2002). XVII (6) 271-278. ISSN 0212-1611. CODEN NUH0EQ. S.V.R. 318.
- Martínez-M., A. 2005.** Flavonoides. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín.
<http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001>
- Martínez-Flores, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., Tuñón, M. J. 2002.** Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr.Hosp* (2002) XVII (6) 271-278.
- Martino, V. 2000.** Los flavonoides como promisorios agentes preventivos y terapéuticos. *Acta Farm. Bonaerense* 19(4): 303-8 (2000). ISSN 0326-2383. Última consulta: 2013-05-08.
http://www.latamjpharm.org/trabajos/19/4/LAJOP_19_4_3_1_34V5L4749H.pdf
- Milagro-Granados, M. 2005.** Pudrición blanca de la cebolla: una enfermedad difícil de combatir. *Agronomía Costarricense*. Vol. 29(2). 2005. Disponible en:
<http://www.redalyc.org/toc.oa?id=436&numero=3666>
- Montes-Belmont, R., Prados-Ligero, A.M. 2006.** Influence of plant extracts on *Sclerotium cepivorum* development. *Plant Pathology Journal* 5(3): 373-377, 2006 [Abstract].
<http://www.scialert.net/abstract/?doi=ppj.2006.373.377>
- Montes-Belmont, R. 2009.** Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Micología* 29:73-82, 2009.
- Núñez Carlos E. cenunez.com.ar 2008.** Solventes y solubilidades. Consultado el 16 de abril de 2011 en:
<http://www.cenunez.com.ar>
- Oyoque-Salcedo, G. 2008.** Inducción de resistencia en jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) con extractos de bacterias patógenas. Instituto Politécnico Nacional.
- Palencia-Mendoza, Y. 1999.** Sustancias Bioactivas en Alimentos [en línea], Universidad de Zaragoza, España.
www.unizar.es/med_naturista/bioactivos%20en%20alimentos.pdf

- Papavizas-G., C. 1972.** Isolation and enumeration of propagules of *Sclerotium cepivorum* from soil. *Phytopathology* 62: 545-549.
- Pérez-Moreno, L., Olalde-Portugal, V., Vandemark, G. J., Martínez-de la Vega, O., Martínez-Soriano, J. P., Vázquez-Marrufo, G., Lara-Reyna, J. 2002.** Genetic Relationships among Isolates of *Sclerotium cepivorum* Berk. Based on RAPD Analysis. ISSN: 0185-3309.
- Pérez-Moreno, L., Plemón-Alberto, E., Ayvar-Serna, S., Cevallos-Ruíz, E. 2004.** Efecto de *Coniothyrium minitans* Campbell en esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. *Revista Mexicana de Fitopatología*. ISSN: 0185-3309.
- Pérez-Moreno, L., Plemón-Alberto, E., Ayvar-Serna, S., Cevallos-Ruíz, E. 2005.** Adaptación de cultivares de ajo morado y blanco (*Allium sativum* L.) en Acatlán, Guerrero, México. *Acta Universitaria* [On-line].
<http://redalyc.uaemex.mx/pdf/416/41615106.pdf>
- Pérez-Urria, C., Elena y Ávalos-García, A. 2009.** Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA*, 2 (3). pp. 119-145. ISSN 1989-3620.
- Pinto, C.M.F, L. A. Maffia, V. W. D. Csali and A. A. Cardoso. 1998.** In Vitro Effect of Plant Leaf Extracts on Mycelial Growth and Sclerotial Germination of *Sclerotium cepivorum*. Berlín: Universidad Federal de Vicoso [Abstract].
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0434.1998.tb04775.x/abstract>
- Quiroz-Sarmiento, V. F., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Lara-Hernández, M. E. 2008.** Antagonismo *in vitro* de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. *Rev. Mex. Mic* [online]. 2008, vol.26 [citado 2013-07-25], pp. 27-34. Disponible en:
<http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802008000100005&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0187-3180.
- Ramírez-Chávez, E., Lucas-Valdez, L., Virgen-Calleros, G., Molina-Torres, J. 1999.** Fungicidal activity of afinnin and *Heliopsis longipes* crude root extract on two *Sclerotium* species. *Agrociencia* 34:207-215, 2000.
<http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2000/mar-abr/art-10.pdf>
- Ramírez-Moreno, E. 2000.** Efecto de la temperatura y atmósferas controladas sobre el oscurecimiento y la calidad de ajo mínimamente procesado. Querétaro, Méx.

- Reyes-Pérez, N., Marbán-Mendoza, N., Delgadillo-Sánchez, T., y de la Torre-Almaráz, R. 2003.** Variabilidad en aislamientos de *Sclerotium cepivorum* Berk. y su relación con ARN de doble cadena. *Agrociencia* 37:495-502.2003.
- Rispail, N., Morris, P., Webb, K. J. 2005.** Phenolic compounds: extraction and analysis. *Lotus japonicas Handbook*. Chapter 7.5. Pp.349-355. [Online]
<http://www.springer.com/life+sci/plant+sciences/book/978-1-4020-3734-4>
- Rico, Lourdes. Royal Botanic Gardens. Kew, Richmond, UK. 2006.** [Online].
<http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOBA/Mimosoideae150.pdf>
- Rico-Arce, M. de L., Bachman, S. 2006.** Análisis del Jardín Botánico de Madrid. Vol. 63(2):189-244. ISSN:0211-1322. [Online].
<http://rjb.revistas.csic.es/index.php/rjb/issue/view/1>
- Rico-Arce, L., Rodríguez, A. 1998.** Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán Fascículo 20. Mimosaceae R. Br. Tribu Acacieae Benth. Instituto de Biología UNAM, Departamento de botánica. México, D.F. ISBN: 968-36-3108-8
- Rincón-Rosales, R. y Gutiérrez-Miceli F. A. 2008** Características biológicas de *Acaciella angustissima* (Mill.) Britton & Rose en su hábitat natural y evaluación de su potencial cortical en Chiapas, México. *Agrociencia* [online]. Ene-Feb [citado 27/10/2011]. [Online]
<http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2008/ene-feb/ene-feb-08.html>
- Rincón-Rosales, R. 2011** Aluminium tolerance in the tropical leguminous N^{sub} 2^{^-}-fixing shrub *Acaciella angustissima* (Mill.) Britton & Rose inoculated with *Sinorhizobium mexicanum*. [Online]
<http://www.readperiodicals.com/201107/2676174901.html#b#ixzz25USSVKw7>
- Rodríguez, S, Nereyda E.,** Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. **2011.** México. *Ra. Ximhai* 7(1): 153-170.
- Russo, M., Suraci, F., Postorino, S., Serra, D., Roccotelli, Agosteo, G. E. 2013.** Essential oil chemical composition and antigungal effects on *Sclerotium cepivorum* of *Thymus capitatus* wild populations from Calabria, southern Italy. *Brazilian Journal of Pharmacology* 23(2): 239-248. Disponible en:
<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v23n2/aop01513.pdf>

- Riveros-Angarita, A. S. 2010.** Inducción de resistencia en plantas. Interacción: Planta-patógeno. Universidad del Tolima Ibagué, Tolima Colombia. Costa Rica. 261 p.
- Salgado-Siclán, M. L. 2012.** Inductores de resistencia a TuMV en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas.
- Sánchez-Pale, J. R., Zavaleta-Mejía, E., Mora-Aguilera, G., Pérez-Moreno, Luis. 2001.** Patogenicidad de cuatro aislamientos mexicanos de *Sclerotium cepivorum* Berk. en tres cultivares de ajo (*Allium sativum* L.). *Agrociencia* 36:103-113. 2002.
- Sepúlveda-R. P., Larraín-S. P., Ormeño-N. J., Bruna-V. A., Guíñez-S. A. 2010.** Manejo fitosanitario del cultivo de ajos. *Boletín INIA* No. 213: ISSN 0717-4829.
- SIAP.** Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. Cultivos de interés. Ajo. 2012.
<http://www.siap.gob.mx/>
- Terán-Quiroga, O. 1997.** El cultivo del ajo. La Paz, Bolivia: Centro de Información para el Desarrollo. 80p.
- Vargas-Hernández, M. 2011.** Estudio del potencial biotecnológico de timbe (*Acaciella angustissima*) y Tepame (*Acacia pennatula*). Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro.
- Velázquez-Velle, R., López-Frías, L. C., Valle-García, P. 2001.** Manejo de la pudrición blanca del ajo en Aguascalientes. Fundación produce Aguascalientes, A.C.
- Velázquez-Valle, R., Medina-Aguilar, M. M. 2004a.** Persistencia de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. en suelos infestados de Aguascalientes y Zacatecas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. [Online].
<http://www.sociedadmexicanadefitopatologia.org/>
- Velázquez-Valle, R., Medina-Aguilar, M. M. 2004b.** Guía para conocer y manejar las enfermedades más comunes de la raíz del ajo en Aguascalientes y Zacatecas. Folleto para productores Núm.34. [Online]
<http://inifap-aguascalientes.gob.mx/>
- Velásquez, V. R. y Amador, R. M. D. 2009.** Enfermedades bióticas de ajo y chile en Aguascalientes y Zacaecas CIRNOC-INIFAP. 187 p.
- Veloz-García, R., Marín-Martínez, R., Veloz-Rodríguez, R., Rodríguez-Guerra, R., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M., Anaya-López, J., Guevara-Olvera, L., Feregrino-Pérez, A., Loarca-Piña, G., Guevara-González, G. 2010.** *Antimicrobial* activities of

cascalote (*Caesalpinia cacalaco*) phenolics-containing extract against fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Industrial Crops and Products*. 19:1035-1054.

Ulacio-Osorio, D., Zavaleta-Mejía, E., García-Espinosa, R., Delgadillo-Sánchez, F., Pedroza-Sandoval, A., Martínez-Garza, A. 2003. Materia orgánica y microorganismos antagonistas como estrategias de manejo de *Sclerotium cepivorum* Berk., y su impacto en el progreso de la pudrición blanca en ajo (*Allium sativum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol.21. No.003.

Young, N., Ashford, A. 1995. Apoplastic permeability of sclerotia of *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotium cepivorum* and *Rhizoctonia solani*. *New Phytol.* (1995), 131, 33-40.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.1995.tb03052.x/pdf>