



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE BOTÁNICA

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE
Pseudognaphalium luteoalbum (L.)
Hilliard & B.L. Burt

VÍCTOR IVÁN SOMBRA ARGÜELLES

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe, “**Víctor Iván Sombra Argüelles**”, Alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección de la Profesora “**Dra. Lucero del Mar Ruiz Posadas**”, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis “**Actividad antifúngica de *Pseudognaphalium luteoalbum* (L.) Hilliard & B.L. Burt**”, y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Texcoco, Estado de México, a 21 de junio de 2019

Víctor Iván Sombra Argüelles

Vo. Bo. de la Dra. Lucero del Mar Ruiz Posadas

La presente tesis titulada: “**Actividad antifúngica de *Pseudognaphalium luteoalbum* (L.) Hilliard & B.L. Burt**” realizada por el alumno: “**Víctor Iván Sombra Argüelles**” bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
BOTÁNICA

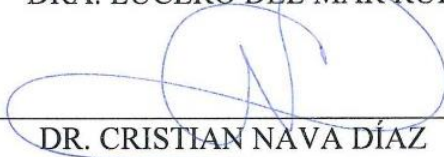
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



DRA. LUCERO DEL MAR RUIZ POSADAS

ASESOR



DR. CRISTIAN NAVA DÍAZ

ASESOR



DR. JULIÁN DELGADILLO MARTÍNEZ

ASESOR



M. C. RUBÉN SAN MIGUEL CHÁVEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, julio de 2019

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE *Pseudognaphalium luteoalbum* (L.) Hilliard & B.L Burt

Víctor Iván Sombra Argüelles, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2019

RESUMEN

Pseudognaphalium luteoalbum (L.) Hilliard & B.L. Burt. es una arvense de origen euroasiático y distribuida mundialmente. El género *Pseudognaphalium* incluye algunas especies conocidas con el nombre común de “gordolobo”, empleadas en la medicina tradicional. Aderogba *et al.* (2014) describieron un fuerte efecto antifúngico del extracto acetónico de *P. luteoalbum* contra *Fusarium oxysporum* Schdtl. Sin embargo, en ese estudio no se detallaron las condiciones ambientales a las que fueron sometidas las plantas durante su desarrollo. Debido a lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue describir la influencia de un factor de estrés, como lo es la colonización por hongos micorrícicos arbusculares (HMA), sobre algunas variables morfológicas y sobre la producción de compuestos fenólicos y la actividad antifúngica del extracto de *P. luteoalbum* contra el hongo fitopatógeno *F. oxysporum* Schldl. Se realizaron tres experimentos correspondientes a tres ciclos de cultivo de *P. luteoalbum* establecidos a partir de semilla, de los cuales, en dos ciclos, la mitad de los individuos fueron inoculados con el HMA *Rhizophagus irregularis*. Las pruebas de la actividad antifúngica se realizaron mediante el método de difusión de disco en agar para el micelio, una prueba de germinación de microconidios y una prueba de Riddell. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de compuestos fenólicos totales, ni entre las concentraciones de flavonoides totales, pero sí en algunas variables morfológicas de la planta cuando se comparan los tratamientos inoculados con *R. irregularis* con los no inoculados. En ninguna prueba se halló la actividad antifúngica.

Palabras clave: Hongos micorrícicos arbusculares, *Rhizophagus irregularis*, *Fusarium oxysporum*, ruderal, fitoquímica.

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *Pseudognaphalium luteoalbum* Hilliard & B.L. Burt

Víctor Iván Sombra Argüelles, M. Sc.
Colegio de Postgraduados, 2019

ABSTRACT

Pseudognaphalium luteoalbum (L.) Hilliard & B.L. Burt. is an eurasian weed worldwide distributed. The genus *Pseudognaphalium* includes some species known in Mexico by the common name “gordolobo”, used in traditional mexican medicine. Aderogba *et al.* (2014) reported a strong antifungal effect of the acetonic extract of *P. luteoalbum* against *Fusarium oxysporum* Schltld. However, in this study the environmental conditions in which the plants grew were not detailed. Due to the above, the aim of this research was to describe the influence of a stress factor, such as the colonization by arbuscular mycorrhizal fungi (HMA) on some morphological variables and on the production of phenolic compounds and the antifungal activity of the extract of *P. luteoalbum* against the phytopathogenic fungus *F. oxysporum* Schltld. (previously reported antifungal activity). Three experiments were carried out corresponding to three cultivation cycles of *P. luteoalbum* grown since seed, of which in two cycles half of the individuals were inoculated with *Rhizophagus irregularis*. The tests of the antifungal activity were carried out by means of the agar-disk diffusion method for the mycelium, a microconidia germination test and a Riddell test. No statistically significant differences were found between the concentrations of total phenolic compounds, neither the total flavonoid concentrations, but in some plant morphological variables when comparing treatments inoculated with *R. irregularis* with those not inoculated. There was not found antifungal activity in any of the tests.

Palabras clave: Arbuscular Mycorrhizal Fungi, *Rhizophagus irregularis*, *Fusarium oxysporum*, ruderal, phytochemistry.

Dedico con gran aprecio a las siguientes personas la realización de esta tesis:

A mí, por mi perseverancia.

A mi difunta hermanita Paola Guadalupe Sombra Argüelles, gracias a quien aprendí la importancia de aprender.

A mi difunto padre Enrique Sombra Rodríguez.

A mi hermano Enrique, a mi madre Virginia Argüelles Hernández, a mi tío Oscar Sombra Rodríguez, a Diana Irán Hernández González, Emilio Uriel Cortés y Vanessa Rupit.

A los movimientos esperantista, igualitarista de oportunidades, vegetariano, vegano, sensocentrista, librepensador, de protección ambiental, y de proposición de un sistema económico ideal.

Al conjunto de todo, que es dios.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a las siguientes personas e instituciones, que me permitieron obtener el grado y realizar este documento:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico de manutención que fue indispensable para obtener el grado

A la Dra. Lucero del Mar Ruiz Posadas, por la dirección de la tesis.

Al Dr. Cristian Nava Díaz, por su orientación y apoyo con recursos para las cuestiones relacionadas al hongo fitopatógeno.

Al Dr. Julián Delgadillo Martínez, por su orientación y apoyo con recursos para las cuestiones relacionadas con la especie micorrícica.

Al M.C. Rubén San Miguel Chávez por su orientación y apoyo con recursos en el análisis fitoquímico.

A Remigio Anastacio Guzmán Plazola por su apoyo como sinodal.

Al Colegio de Postgraduados, por permitirme ser alumno y dejar en mí nuevos aprendizajes.

CONTENIDO

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	v
AGRADECIMIENTOS	vii
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE GRÁFICAS	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo general.....	3
2.2 Objetivos particulares	3
3. HIPÓTESIS	3
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
4.1 <i>Pseudognaphalium luteoalbum</i> (L.) Hilliard & B.L. Burt.	4
4.1.1. Taxonomía y descripción de la especie	4
4.1.2. Distribución.....	5
4.1.3. Usos.....	5
4.2 Fitoquímica y actividad biológica de <i>P. luteoalbum</i>	6
4.2.1. Fitoquímicos y su actividad antifúngica.....	6
4.2.2. Fitoquímica de <i>P. luteoalbum</i>	7
4.2.3. Actividad biológica de <i>P. luteoalbum</i>	7
4.3 <i>Fusarium oxysporum</i> Schldl.....	10
4.3.1. Descripción básica.....	10
4.3.3. Hospederos	11
4.3.4. Ciclo de vida y ecología	11
4.3.4. Síntomas	12
4.3.5. Control tradicional de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y problemática	13
4.4 Micorrizas	14
4.4.1 Descripción general e importancia biológica	14
4.4.2. <i>Rhizophagus irregularis</i>	15

4.5 Efecto de las micorrizas sobre los fitoquímicos	16
5. LITERATURA CITADA.....	17
CAPÍTULO 1. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO DE <i>Pseudognaphalium</i> <i>luteoalbum</i> EN ACETONA EN FUNCIÓN DE LA MICORRIZACIÓN	25
RESUMEN	25
INTRODUCCIÓN	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
Comprobación de la colonización micorrícica	28
Cosecha y obtención de extractos.....	28
Prueba de toxicidad de los disolventes contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	29
Determinación del efecto antifúngico del extracto acetónico de <i>P. luteoalbum</i>	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
Comprobación de la colonización micorrícica.....	31
Prueba de toxicidad de los disolventes contra <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	32
Prueba antifúngica del extracto obtenido con acetona contra <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	34
CONCLUSIONES	34
LITERATURA CITADA	35
CAPÍTULO 2. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA SUCESIÓN DE EXTRACCIONES.....	37
RESUMEN	37
INTRODUCCIÓN	37
MATERIALES Y MÉTODOS	39
Prueba antifúngica de los extractos mediante difusión en agar	40
Prueba de germinación de microconidios.....	41
Prueba de Riddell.....	42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
Prueba antifúngica de los extractos mediante difusión en agar	43
Prueba de germinación de microconidios.....	44
CONCLUSIONES	46
LITERATURA CITADA	47
CAPÍTULO 3. CONTENIDO DE FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES Y	

VARIABILIDAD MORFOLÓGICA DE <i>Pseudoglyphium luteoalbum</i> EN FUNCIÓN DE SU MICORRIZACIÓN.....	49
RESUMEN	49
INTRODUCCIÓN	50
MATERIALES Y MÉTODOS	51
Cuantificación de algunos compuestos mediante HPLC.....	53
Cuantificación de fenoles totales	53
Cuantificación de flavonoides totales	54
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
Comprobación de la colonización micorrízica	56
Variables morfológicas	57
Altura.....	57
Días necesarios para la fructificación.....	58
Materia seca de la parte aérea	58
“Altura compuesta”	59
Cabezuelas totales	61
Diámetro de cobertura.....	61
Número de hojas.....	62
Número de ramas	63
Variables fitoquímicas (parte aérea).....	64
Rendimiento del extracto	64
Cuantificación de fenoles totales.....	64
Cuantificación de flavonoides totales	68
Variación de algunos flavonoides cuantificados mediante HPLC	71
CONCLUSIONES	72
LITERATURA CITADA	72
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES	75
CONCLUSIONES	75
RECOMENDACIONES	76
ANEXOS.....	77
DEL CAPÍTULO 1.....	77

Anexo 1.1. Porcentajes de colonización micorrícica observados tras tinción con azul de tripano en <i>P. luteoalbum</i> para tratamientos cosechados en la fase vegetativa y reproductiva con y sin inoculación micorrícica.....	77
Anexo 1.2. Datos obtenidos del experimento de la toxicidad de los disolventes a diferentes concentraciones contra Fol 3. Diámetros del micelio y crecimientos promedio del radio (cm).....	78
DEL CAPÍTULO 2	80
Anexo 2.1. Diámetros de inhibición para las pruebas de difusión en agar de los extractos obtenidos con diferentes disolventes contra <i>Fusarium oxysporum</i> f sp. <i>lycopersici</i> raza 3.	80
Anexo 2.2. Porcentajes de germinación de microconidios a las 36 h de los extractos obtenidos con diferentes disolventes contra <i>Fusarium oxysporum</i> f sp. <i>lycopersici</i> raza 3.	80
DEL CAPÍTULO 3	81
Anexo 3.1. Porcentajes de colonización micorrícica observados tras tinción con azul de tripano en <i>P. luteoalbum</i> para tratamientos con y sin inoculación. Para el análisis de varianza y prueba de Tukey estos datos posteriormente fueron transformados con el arcoseno de su raíz cuadrada.	81
Anexo 3.2. Variables morfológicas de la parte aérea de <i>P. luteoalbum</i> para tratamientos con y sin inoculación con HMA	81
Anexo 3.3. Variables fitoquímicas de la parte aérea de <i>P. luteoalbum</i> para tratamientos con y sin inoculación con HMA	83
Anexo 3.4. Curva de calibración para cuantificación de fenoles libres totales	85
Anexo 3.5. Curva de calibración para cuantificación de flavonoides totales.....	85
Anexo 3.6. Diagrama de cuantificación de fenoles/flavonoides totales.....	86
Anexo 3.7. Observaciones sobre <i>P. luteoalbum</i>	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplar de <i>Pseudognaphalium luteoalbum</i>	1
Figura 2. Inflorescencias de <i>Pseudognaphalium luteoalbum</i>	5
Figura 3. Ejemplos de metabolitos primarios y secundarios.....	6
Figura 4. Estructura química del kaempferol	9
Figura 5. Vistas macro y microscópica de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	10
Figura 6. Síntomas causados por la infección en jitomate de <i>Fusarium</i>	133
Figura 7. Esporas de <i>Rhizophagus irregularis</i>	155
Figura 1.1. Germinación de <i>Pseudognaphalium luteoalbum</i> en espuma Ultrafoam	277
Figura 1.2. Planta de <i>P. luteoalbum</i> inoculada con <i>R. irregularis</i>	288
Figura 1.3. Colocación de discos de Fol 3 en diferentes concentraciones de solventes.	299
Figura 1.4. Disposición de la prueba antifúngica por difusión en PDA.....	30
Figura 2.1. Secado en horno de los ejemplares de <i>P. luteoalbum</i>	399
Figura 2.2. Extractos redisueltos, obtenidos de la sucesión de extracciones	41
Figura 2.3. Actividad antifúngica del Captan y extractos.	433
Figura 3.1. Olla empleada para la esterilización del sustrato	51
Figura 3.2. Germinación de <i>P. luteoalbum</i> directamente en el sustrato.....	52
Figura 3.3. Eliminación de disolvente de extracto de <i>P. luteoalbum</i> mediante rotavapor.....	533
Figura 3.4. Obtención de curva de calibración para estimación de compuestos fenólicos	544
Figura 3.5. Obtención de curva de calibración para estimación de flavonoides	555

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1.1. Porcentaje promedio de colonización micorrícica (VI y VNI).....	31
Gráfica 1.2. Disco de micelio grande con diferentes concentraciones de solventes	32
Gráfica 1.3. Disco de micelio chico con diferentes concentraciones de solventes.....	33
Gráfica 1.4. Crecimiento medio de discos con diferentes concentraciones de solventes.....	33
Gráfica 2.1. Promedios de porcentajes de germinación de microconidios.....	444
Gráfica 2.2. Resultados de la prueba de microcultivo de Riddell	455
Gráfica 3.1. Porcentaje promedio de colonización micorrícica (I y NI)	566
Gráfica 3.2. Altura promedio de la rama central	577
Gráfica 3.3. Promedios de días transcurridos de la siembra a la fructificación.....	588
Gráfica 3.4. Promedios de materia seca	599
Gráfica 3.5. Promedios de "altura compuesta"	60
Gráfica 3.6. Correlación entre la materia seca y la "altura compuesta"	60
Gráfica 3.7. Promedios de número de cabezuelas por planta.....	61
Gráfica 3.8. Promedios de diámetros de cobertura.....	62
Gráfica 3.9. Promedios de número de hojas por planta.....	622
Gráfica 3.10. Promedios de número de ramas por planta.....	633
Gráfica 3.11. Rendimiento de extracto promedio	644
Gráfica 3.12. Concentración promedio de compuestos fenólicos (extracto crudo).....	655
Gráfica 3.13. Cantidad promedio de compuestos fenólicos por planta.....	666
Gráfica 3.14. Concentración promedio de compuestos fenólicos (materia seca).....	677
Gráfica 3.15. Concentración promedio de flavonoides (extracto crudo)	688
Gráfica 3.16. Cantidad promedio de flavonoides por planta.....	699
Gráfica 3.17. Concentración promedio de flavonoides (materia seca)	70
Gráfica 3.18. Porcentajes complementarios entre concentraciones de miricetina y naringenina.....	71

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Pseudognaphalium luteoalbum (L.) Hilliard & B.L. Burt. es una arvense de origen euroasiático distribuida mundialmente (Calderón y Rzedowski, 2005:841) (Figura 1). El género *Pseudognaphalium*, incluye a algunas especies conocidas por el nombre común de “gordolobo”, como lo son *P. oxyphyllum* DC. y *P. viscosum* Kunth. (Pérez, 2009), especies anteriormente clasificadas dentro del género *Gnaphalium*. A pesar de la amplia distribución de la especie y de presentar diferentes usos en la medicina tradicional (Gani, 2003, citado por Akter *et al.*, 2014), desde el punto de vista fitoquímico sólo se han reportado algunos compuestos fenólicos (principalmente flavonoides) y la presencia del terpenoide estigmasterol-3-O- β -glucopiranosido (Di Modica y Tira, 1963, citados por Drury (1970); Mericli y Eczacilik, 1980, citados por Zheng *et al.* (2013: 8300-8303); Cuadra, Harborne y Waterman (1997); y Aderogba *et al.*, (2014)).

Por otro lado, *Fusarium oxysporum* es la quinta especie más importante (científica y económicamente) de hongos fitopatógenos de acuerdo a autores, revisores y editores de la revista *Molecular Plant Pathology* (Dean *et al.*, 2012). Particularmente la forma especial del jitomate *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) provoca que en ocasiones campos enteros de jitomate mueran o sean dañados severamente antes de que pueda realizarse la primera cosecha (Agrios, 2005).



Figura 1. Ejemplar de *Pseudognaphalium luteoalbum*.

Aderogba *et al.* (2014) reportaron un fuerte efecto antifúngico del extracto acetónico de *P. luteoalbum* contra *F. oxysporum*; desafortunadamente, en este estudio no se detallaron las condiciones ambientales a las que fueron sometidas las plantas utilizadas para la extracción. Esta información es importante, ya que se ha reportado que los factores ambientales son muy importantes en la producción de metabolitos secundarios que realizan las plantas (Sangwan *et al.*, 2001; Naghdi Badi *et al.*, 2004; Usano Alemany, 2012; Kaya, Arslan y Rusu, 2013; Riahi *et al.*, 2015; Sombra, 2015) y que varios metabolitos secundarios presentan actividad antifúngica (Quiroga, Sampietro y Vattuone, 2001); la variación de su concentración en las plantas es determinante para el nivel de efectividad de los aceites esenciales o extractos de plantas que los contienen.

Debido a lo anterior, es conveniente conocer el efecto de algunos factores ambientales sobre la concentración de los compuestos secundarios como los compuestos fenólicos (y por consiguiente el efecto antifúngico) de *P. luteoalbum*, lo que permitirá a futuro y con apoyo de otras investigaciones, realizar inducciones sobre su utilización práctica para controlar a *F. oxysporum* y otros organismos y contribuir en el entendimiento de la función de los metabolitos secundarios en general. Uno de estos factores ambientales es la colonización micorrícica, la cual es una relación simbiótica entre una planta y un hongo del suelo. La influencia de este factor se ha demostrado en múltiples estudios, como el realizado en geranio (*Pelargonium graveolens*), donde el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides se incrementaron gracias a la micorrización con *Funneliformis mosseae* y *Rhizophagus irregularis* (Amiri, Nikbakht y Etemadi, 2015). Particularmente *R. irregularis* se ha convertido en un modelo para los investigadores, ya que puede ser cultivado *in vitro* en un sistema muy parecido al utilizado para su producción comercial a gran escala (Ceballos *et al.*, 2013). Además, este hongo micorrícico arbuscular fue elegido para ser el primero en secuenciarse su genoma debido a que se encuentra presente en diferentes ecosistemas, templados y tropicales, alrededor del mundo (Martin *et al.*, 2008).

Debido a lo anteriormente planteado, el presente trabajo de investigación se planteó los siguiente objetivos e hipótesis:

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar la variación de la actividad antifúngica y los compuestos fenólicos y flavonoides de *P. luteoalbum* en función de la micorrización.

2.2 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de la colonización micorrícica con *Rhizohagus irregularis* sobre la actividad antifúngica del extracto de *P. luteoalbum* contra *F. oxysporum*.
- Evaluar el efecto de la colonización micorrícica con *Rhizohagus irregularis* sobre la cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides de *P. luteoalbum*.
- Determinar la actividad antifúngica de diferentes extractos de *P. luteoalbum*.

3. HIPÓTESIS

- La actividad antifúngica del extracto de *P. luteoalbum* contra *F. oxysporum* aumenta con la colonización micorrícica de *Rhizohagus irregularis*.
- La cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides totales producidos por *P. luteoalbum* aumenta con la colonización micorrícica de *Rhizohagus irregularis*.
- Los extractos de *P. luteoalbum* obtenidos con metanol, acetona, cloruro de metileno o hexano y/o la mezcla de ellos tienen actividad antifúngica contra *F. oxysporum*.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 *Pseudognaphalium luteoalbum* (L.) Hilliard & B.L. Burt.

P. luteoalbum (L.) Hilliard & B.L. Burt. es una arvense de origen euroasiático distribuida mundialmente (Calderón y Rzedowski, 2005). El género *Pseudognaphalium*, incluye a algunas especies conocidas por el nombre común de “gordolobo”, como lo son *P. oxyphyllum* DC. y *P. viscosum* Kunth., especies anteriormente clasificadas dentro del género *Gnaphalium* (Pérez, 2009) y que se utilizan en la medicina tradicional (Gani, 2003, citado por Akter *et al.*, 2014). En México, *P. luteoalbum* se reporta en el Estado de México y la Ciudad de México (Calderón y Rzedowski, 2005), en altitudes de 2250 a 2500 msnm.

4.1.1. *Taxonomía y descripción de la especie*

La mayoría de las especies mexicanas que originalmente pertenecían al género *Gnaphalium* fueron transferidas al género *Pseudognaphalium* por Anderberg en el año 1991 (Hinojosa-Espinosa y Villaseñor, 2014). La segunda especie presente en México que fue transferida a este género fue la entonces conocida como *Gnaphalium luteoalbum* (Hilliard y Burt, 1981), y fue colocada en el subgénero *Laphangium*, siendo *Laphangium luteoalbum* una sinonimia de la especie de acuerdo con Tzvelev, 1993 (citado por Landcare Research, (2018)).

La descripción de la especie se puede consultar en “Flora Fanerogámica del Valle de México” (Calderón y Rzedowski, 2005: 850). Se trata de una hierba anual de 15 a 50 cm de alto, ramificada desde la base y con hojas sésiles. Al ser una planta perteneciente a la familia Asteraceae, sus flores se agregan en conjuntos llamados cabezuelas (Figura 2) y los frutos se llaman aquenios o cipselas, que son secos, sólo tienen una semilla y se dispersan mediante el viento gracias a unos pelos llamados vilano. Por pertenecer al género *Pseudognaphalium*, sus hojas y tallos están cubiertos por un indumento lanoso.

Una característica muy útil para diferenciar esta especie de otras originalmente clasificadas en el género *Gnaphalium* es el color de los ápices de las corolas, que es morado cuando las flores son jóvenes y café cuando son senescentes (Mondragón y Vibrans, 2009).



Figura 2. Inflorescencias de *Pseudognaphalium luteoalbum* (Pérez, 2009)

4.1.2. Distribución

Pseudognaphalium luteoalbum es una especie silvestre que generalmente crece en lugares húmedos y soleados (Demirci, Baser y Duman, 2009). Se recomienda sembrar esta especie al final de la primavera, y sólo cubrir un poco la semilla. Su floración se reporta de junio a agosto, y es polinizada por moscas y abejas (PFAF, 2012).

Se ha reportado esta especie en las áreas verdes urbanas de Portugal (Barrico *et al.*, 2012), en varios estados de Estados Unidos de América (Nesom, 2004), en Bangladesh (Niger, 2016), Angola (Bruschi *et al.*, 2017) y en terrenos arenosos y basureros de Reino Unido (Clapham, Tootin y Warburg, 1962, citados por (PFAF, 2012)). En América se considera una especie naturalizada (Nesom, 2004); en el resto de los continentes (excepto la Antártida) se considera nativa (USDA, 2018).

4.1.3. Usos

A pesar de que en México no se reporta algún uso medicinal, en otros países sí se han reportado algunos usos:

Como planta medicinal hay reportes de su uso contra el cáncer de mama (Duke y Ayensu, 1985, citados por Demirci, Baser y Duman, 2009), contra padecimientos estomacales (Lassak y McCarthy, 1983, citados por PFAF, 2012), para mejorar la lactación (Sahu, 1984), para curar fracturas (Niger, 2016) y como emenagogo (Saggese, 1959, citado por (Demirci, Baser y

Duman, 2009)). Las hojas se reportan como astringentes, colagogas, diuréticas, febrífugas, hemostáticas y vulnerarias (Chopra, Nayar y Chopra, 1986, citados por PFAF, 2012). El sitio Plants For A Future (PFAF, 2012) califica con un punto de cinco a su valor como planta medicinal y comestible.

Las hojas se pueden comer crudas o cocidas (Kunkel, 1984, citado por PFAF, 2012;) y se pueden utilizar como yesca (Duke y Ayensu, 1985, citados por PFAF 2012). En un mercado de Laos se encontró comercializada como planta comestible (Kosaka *et al.*, 2013).

4.2 Fitoquímica y actividad biológica de *P. luteoalbum*

4.2.1. Fitoquímicos y su actividad antifúngica

Los metabolitos secundarios vegetales, también referidos como fitoquímicos, son compuestos de diversas estructuras y clases que no se requieren para el metabolismo básico de la planta, sino para sus interacciones con el medio ambiente (Sbrana, Avio y Giovannetti, 2014). La mayoría de los metabolitos secundarios se pueden clasificar por su origen biosintético en tres grupos principales: a) Flavonoides y compuestos fenólicos y polifenólicos afines, b) Terpenoides y c) Alcaloides y compuestos que contienen azufre, si bien esta clasificación puede volverse más específica. Muchos de ellos presentan actividad antifúngica en ensayos *in vitro* (Pusztahelyi, Holb y Pócsi, 2015).

Metabolitos primarios	Metabolitos secundarios
Carbohidratos	Compuestos fenólicos
Fructosa Glucosa	Ácidos fenólicos y derivados
Almidón Sacarosa	Ácido cafeico Ácido ferúlico
Ácidos orgánicos	Ácido gálico Ácido rosmarínico
Citrato Fumarato	Flavonoides Quercetina
Isocitrato Malato	Taninos
Succinato	Antraquinonas Hipericina
Derivados de ácidos grasos	Terpenos Aceites esenciales
Ácido jasmónico	Monoterpenos Sesquiterpenos
Aminoácidos	Diterpenos Triterpenos
Ácido 4-amino-butanoico	Carotenoides Luteína
Ácido aspártico	Alcaloides A. indolizínicos
Ácido glutámico	Alcaloides indol-monoterpénicos
Proteínas	

Figura 3. Ejemplos de metabolitos primarios y secundarios de las plantas (Basado en Sbrana, Avio y Giovannetti 2014).

Los fitoquímicos suelen tener importancia en la salud humana cuando se encuentran en los alimentos o bien pueden tener algún tipo de actividad farmacológica (Sbrana, Avio y Giovannetti, 2014). Debido a esto, el uso de plantas y productos derivados de ellas para combatir diferentes hongos patógenos proviene desde el comienzo de la civilización humana, ya que son fuentes importantes de una gran diversidad de metabolitos antifúngicos, y adicionalmente suelen no tener efectos secundarios y estar al alcance del común de la gente (Razzaghi-Abyaneh y Rai, 2013). Estos productos naturales pueden ser empleados como pesticidas verdes, en la agricultura ambientalmente amigable (Morcia, Tumino y Terzi, 2013).

Por ejemplo, Rosado A. *et al.*, (2014) encontraron que el extracto de espárragos (*Asparagus officinalis* L.) enriquecido con flavonoides presentó actividad antifúngica contra algunas formas especiales de *F. oxysporum*.

4.2.2. Fitoquímica de P. luteoalbum

Se han determinado algunos compuestos específicos de *P. luteoalbum*, todos ellos compuestos fenólicos y generalmente flavonoides, los cuales se mencionan a continuación: Ácido cafeico (Di Modica y Tira, 1963), apigenina, 7-O- β -D-glucopiranosido de apigenina, luteolina, 4'-O- β -D-glucopiranosido de luteolina, 7-O- β -D-glucopiranosido de luteolina, jaceosidina, gnafalina (Merikli y Eczacilik, 1980 citados por (Zheng *et al.*, 2013), kaempferol, quercetina, 3-glucósido de quercetina, 7-glucósido de quercetina (Saleh *et al.*, 1988), calicopterina, 3'-metoxi-calicopterina (Cuadra, Harborne y Waterman, 1997), 7-O-glucopiranosido de hispidulina y 3-O- β -glucopiranosido de estigmasterol (Aderogba *et al.*, 2014).

4.2.3. Actividad biológica de P. luteoalbum

En el ámbito de la actividad antimicrobiana de *P. luteoalbum*, únicamente se ha publicado un estudio, en el cual se reporta una fuerte actividad antifúngica del extracto de las hojas obtenido con acetona contra *F. oxysporum* y *Phytophthora nicotianae*, con concentraciones mínimas inhibitorias inferiores o iguales al antibiótico anfotericina B. En el mismo estudio se probó la inocuidad del extracto tras haberse probado dosis de hasta 200 μ g/ml en células Vero (Aderogba

et al., 2014). En otro estudio se analizó la actividad citotóxica del extracto de las hojas obtenido con metanol contra varias líneas de células, entre las que cabe destacar la línea de células de cáncer de mama MCF-7, arrojando para ésta una concentración inhibitoria media (IC₅₀) de 0.34 mg/ml, mientras que resultó virtualmente nula para las células Vero (Akter *et al.*, 2014).

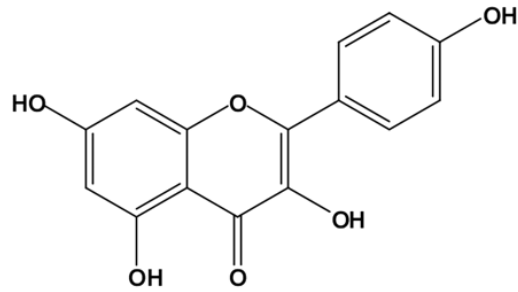
Actividad antifúngica de los fitoquímicos de *P. luteoalbum*.

El ácido cafeico inhibe el crecimiento de *Fusarium oxysporum* en 33% a una concentración de 1 mg/ml; es por tanto la Mínima Concentración Inhibitoria superior a 1 mg/ml (Zabka y Pavela, 2013). Esta baja efectividad coincide con el reporte de Korukluoglu, Sahan y Yigit, (2008), quienes no encontraron inhibición a 1% de concentración. Otros estudios han reportado el efecto del ácido cafeico contra otras especies, generalmente bacterias, pero también contra algunos otros hongos filamentosos, generalmente del género *Aspergillus* (Binutu, Adesogan y Okogun, 1996; Aziz *et al.* 1998; y Merkl *et al.*, 2010).

La apigenina no tuvo un efecto negativo sobre la germinación de microconidios de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* a concentraciones de hasta 0.1 mM (Steinkellner y Mammerler, 2007).

El 7-O-β-D-glucopiranosido de apigenina fue probado contra cuatro especies de hongos fitopatógenos, de los cuales los mejores resultados ocurrieron contra *Sclerotium rocsii* y *Alternaria mali.*, presentando alrededor de 40 y 60% de inhibición del crecimiento del micelio (Chen, Song y Xu, 2012).

El kaempferol no afectó la germinación de los microconidios de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* a concentraciones de hasta 0.1 mM (Steinkellner y Mammerler, 2007). Sin embargo este flavonoide mostró actividad antifúngica contra el crecimiento de *F. oxysporum* mediante el método del disco de papel (difusión en agar o Kirby-Bauer) (Yamada *et al.*, 1999). Sati *et al.* (2018) también hallaron un efecto antifúngico del kaempferol contra el crecimiento de *F. oxysporum*, a una concentración de 1 mg/ml.



Kaempferol

Figura 4. Estructura química del kaempferol (Jang *et al.*, 2011)

La luteolina presentó una concentración inhibitoria media (IC₅₀) contra el crecimiento del micelio de *F. graminearum* igual a 0.056 mg/ml (Wang *et al.*, 2010); sin embargo, incrementó ligeramente (hasta máximo 16.8%) el porcentaje de germinación de los microconidios de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* a partir de la concentración 25 µM (Steinkellner y Mammerler, 2007).

De la jaceosidina no se ha encontrado actividad antifúngica.

La gnafalina A o 5,7-dihidroxi-3,8-dimetoxiflavona presentó la mayor actividad contra el crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea* de entre 12 flavonoides estudiados (Cotoras *et al.*, 2001). Sin embargo no se ha reportado actividad antifúngica contra alguna especie de *Fusarium* sp.

La quercetina no afectó la germinación de los microconidios de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* a concentraciones de hasta 0.1 mM (Steinkellner y Mammerler, 2007), pero sí el crecimiento de *F. oxysporum* a una concentración de 0.1 mg/ml (Mythili y Ravindhran, 2012).

A la fecha no hay reportes de la actividad antifúngica del 7-O-β-D-glucopiranosido de luteolina, del 4'-O-β-D-glucopiranosido de luteolina, del 3-glucósido de quercetina, del 7-glucósido de quercetina, de la calicopterina, de la 3'-metoxi-calicopterina, del 7-O-glucopiranosido de hispidulina ni del 3-O-β-glucopiranosido de estigmasterol.

4.3 *Fusarium oxysporum* Schltdl.

4.3.1. Descripción básica

El género *Fusarium* se encuentra en todos los ambientes. Sus especies son saprófitas y patógenas de plantas y animales. De todas las enfermedades causadas por *Fusarium*, probablemente la más importante es la marchitez vascular que causa *F. oxysporum*. Este hongo ataca un grupo diverso de plantas cultivadas como jitomate, col, lino, plátano, chícharo, camote, lenteja, tabaco, melón, sandía y algodón (Nelson, 1981: 51).

Fusarium oxysporum es la quinta especie más importante (científica y económicamente) de hongos fitopatógenos de acuerdo a autores, revisores y editores de la revista *Molecular Plant Pathology* (Dean *et al.*, 2012). Se trata de un ubicuo fitopatógeno del suelo que provoca marchitez vascular en un amplio rango de plantas, y produce como síntomas el oscurecimiento vascular, la epinastia foliar, el retraso en el desarrollo, la marchitez progresiva y la muerte de las plantas (Agrios 2005, citado por Dean *et al.*, 2012). *F. oxysporum* contiene más de 120 *formae speciales* que causan severas pérdidas en muchos cultivos (Michielse y Rep, 2009). En el ámbito forestal, es uno de los hongos más comunes y dañinos de los viveros, y puede causar la muerte de más del 40% de las plántulas (García, Cibrián y Alvarado, 2007).

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* produce microconidios unicelulares y macroconidios en forma de media luna con un máximo de 3 a 4 divisiones, así como clamidosporas de anchas paredes, intercalares o terminales, en cadenas o solas. Sus colonias crecen rápido, son blancas al principio y con la edad se tornan rosa oscuro a morado (Blancard, 2012).

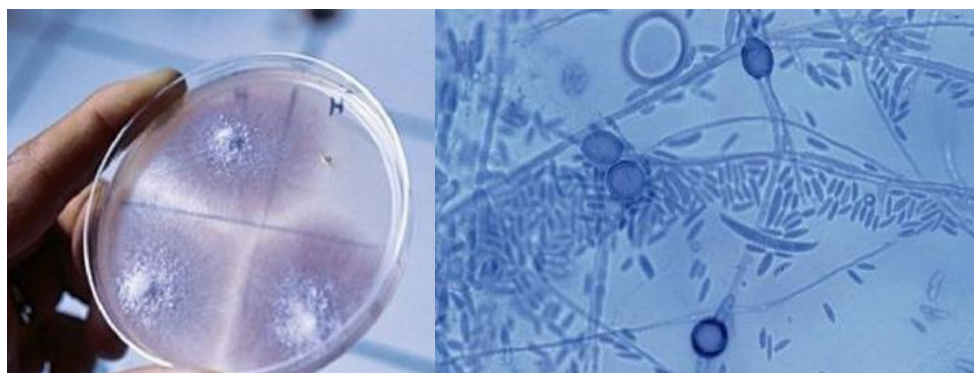


Figura 5. Vistas macro y microscópica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Blancard, 2012)

4.3.3. Hospederos

F. oxysporum contiene más de 120 *formae speciales*, y ataca distintos hospedantes, que incluyen jitomate, melón, frijol, plátano, algodón, garbanzo y palma aceitera, causando severas pérdidas en muchos cultivos (Michielse y Rep, 2009).

En México *F. oxysporum* es un problema importante en jitomate, cultivo al que afecta, entre otros hongos, *F. oxysporum* (Schlecht) f. sp. *radicis-lycopersici* (Sacc.) Jarvis y Shoemaker pudiendo causar pérdidas de rendimiento superiores al 50% (Cruz, Mendoza y Romero, 2000).

4.3.4. Ciclo de vida y ecología

F. oxysporum se dispersa por el viento, el agua, los animales o el uso de material de propagación. La mayoría de las formas especiales de *F. oxysporum* permanecen latentes como clamidosporas hasta recibir un estímulo para germinar, el cual puede provenir de raíces hospederas o no hospederas, o bien por el contacto con piezas de desechos frescos de plantas no colonizadas. Las plantas pueden requerir estar o no heridas para ser infectadas por *F. oxysporum*, según su especie. Una vez que esto ocurre, el hongo se desplaza al tejido vascular para comenzar con la colonización (Nelson, 1981: 55-60).

Las clamidosporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* pueden sobrevivir en los restos de las plantas por más de 10 años hasta a 80 cm de profundidad en el suelo. Este hongo puede sobrevivir como saprófito (Blancard, 2012). Usualmente, una vez que un área se infecta, permanece así indefinidamente (Agrios, 2005).

Esta forma especial puede entrar a los haces vasculares mediante lesiones naturales como las que se presentan para la emergencia de las raíces secundarias u otro tipo de lesiones. Su temperatura óptima de desarrollo es aproximadamente 28° C. La enfermedad se ve favorecida por los suelos arenosos, ácidos y con poca humedad, por los días cortos, los bajos niveles de luz y las deficiencias de nitrógeno, fósforo y calcio en los tejidos vegetales, así como el uso excesivo de fertilizantes (Blancard, 2012).

Fusarium oxysporum en viveros forestales se ve favorecido por suelos pesados con deficiencia de drenaje, alta humedad ambiental, temperaturas medias a altas y sombra continua durante varias horas o días (García, Cibrián y Alvarado, 2007).

4.3.4. Síntomas

Los síntomas en las plantas herbáceas consisten de una incipiente marchitez seguida generalmente por una recuperación de 3 a 4 días, especialmente en las hojas bajas, seguida de su marchitez permanente. Estos síntomas van subiendo gradualmente por la planta, generalmente ocurriendo en un solo lado de la misma. Eventualmente la parte dañada se marchita y muere. Los síntomas de *F. oxysporum* son muy variados dependiendo del hospedero (Nelson, 1981: 64). En la soya, la raíz principal y los tallos desarrollan una decoloración café, mientras que en su parte más interna (haces vasculares) puede verse de color rosáceo (Hershman, 1993). En plantas forestales se presenta muerte descendente, las bases de las acículas afectadas tienen una coloración violácea y se presenta pudrición de las raíces desde la periferia hacia el cuello. El tejido interno se torna de color café oscuro y la muerte de las plántulas se presenta en manchones (García, Cibrián y Alvarado, 2007). Los síntomas también puede variar de acuerdo a la forma especial: En jitomate, las dos formas especiales *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) y *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) sólo pueden distinguirse mediante los síntomas y mediante marcadores moleculares (Carbonell *et al.*, 1994). Por ejemplo, en el cuello de las plantas de jitomate dañadas por Forl se aprecia una necrosis que se extiende hacia lo alto y en el interior del tallo el oscurecimiento vascular se puede prolongar hasta 20 cm sobre el suelo. Al principio las plantas afectadas muestran marchiteces transitorias, las cuales se agravan progresivamente. Por otro lado, los síntomas de Fol se pueden observar en un solo lado de la planta o en ciertas hojas como amarillamiento y necrosis internerviales, los cuales se extienden de abajo hacia arriba, además de que los haces vasculares de las plantas enfermas se cubre de un negro rojizo en estrías longitudinales (Messiaen *et al.*, 1994).

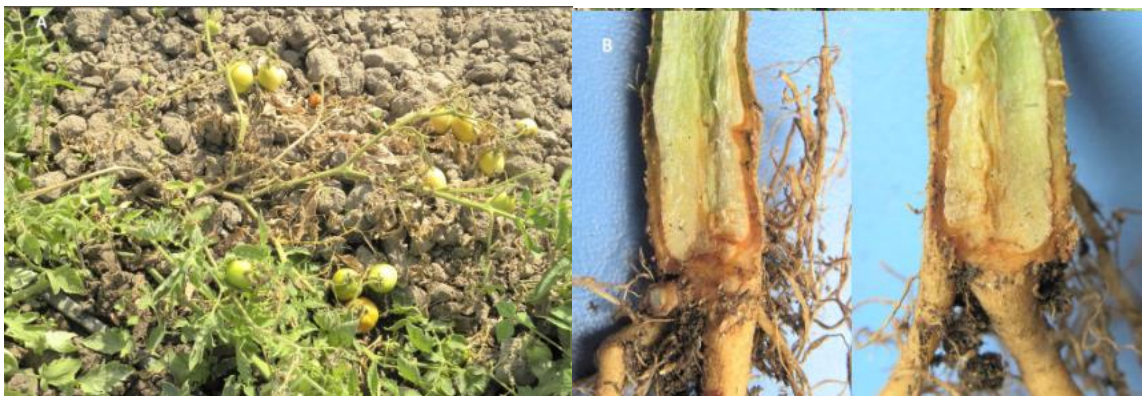


Figura 6. Síntomas causados por la infección de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en jitomate (Gómez et al., 2011).

Otros síntomas que presentan las plantas jóvenes de invernadero atacadas por Fol incluyen el aclaramiento de las nervaduras y la epinastia de los peciolos; mientras que para las plantas cultivadas en campo el primer síntoma es el amarillamiento de las hojas inferiores, el cual progresa hacia hojas superiores mientras que las inferiores van muriendo muy a menudo sólo en algunas ramas o en algún lado de la planta, además de observarse un prominente oscurecimiento vascular al cortar los tallos o peciolos (Nelson, 1981: 64).

4.3.5. Control tradicional de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y problemática

El daño que *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) puede causar varía dependiendo de la raza y la variedad del cultivo. Se han desarrollado variedades de cultivos resistentes a las diferentes razas que se han ido generando, las cuales son: la raza 1, descrita en 1886, se encuentra ampliamente distribuida en el mundo; la raza 2, reportada en 1945, se ha convertido en un problema serio en muchos países como México, Estados Unidos de América, Brasil, Venezuela, Australia, Reino Unido, Países Bajos, Israel, Marruecos, Iraq, Taiwán y China; y raza 3, descrita en 1978 en Australia, está presente en Brasil, Estados Unidos, México y Japón (Blancard, 2012: 511). Agrios (2005) menciona que en ocasiones campos enteros de jitomate mueren o son dañados severamente antes de que pueda raelizarse la primera cosecha.

Si bien algunas cepas de *Fusarium oxysporum* presentes en los viveros forestales pueden ser tratadas con los fungicidas metalaxil y clorotalonil o mediante agentes de control biológico con

Trichoderma harzianum o *T. lignorum* (García, Cibrián y Alvarado, 2007), actualmente no hay un método de control o producto que pueda controlar efectivamente la enfermedad causada por Fol 3 durante el cultivo. Se ha utilizado himexazol y metil tiofanato pero suelen resultar costosos y poco efectivos (Blancard, 2012: 513).

Ante este panorama, se han buscado alternativas en los metabolitos secundarios vegetales para el control de Fol 3. Por ejemplo, Villa *et al.* (2015) encontraron una inhibición superior al 95% del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) *in vitro* de los extractos hidroalcohólico al 30% y acuoso de *Acacia farnesiana*. Por su parte, Singha *et al.* (2011) encontraron que la aplicación del extracto obtenido con cloroformo de *Piper betle* aplicado a plántulas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) infectadas con Fol, reduce los síntomas de la enfermedad causada por este patógeno. Finalmente, el polvo de las semillas de Nim (*Azadirachta indica*) también mostró reducir la severidad de la enfermedad causada por Fol 3 en jitomate, de 85% (control) a 12% (Hadian *et al.*, 2011).

En los últimos años, el control biológico de Fol ha dado resultados alentadores con la inoculación de cepas no patogénicas de *Fusarium* spp., o con el uso de hongos antagonistas como *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* spp., o las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia*. Sin embargo, ninguno de estos biocontroladores son usados ampliamente de manera comercial.

4.4 Micorrizas

4.4.1 Descripción general e importancia biológica

La micorriza es una asociación simbiótica -mutualista- entre raíces y hongos, siendo los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) los que más comúnmente forman micorrizas con plantas en nuestra agricultura. Mediante una variedad de procesos como el incremento en la absorción de nutrientes, la estabilización de los agregados del suelo o la producción de metabolitos, los HMA pueden ayudar a las plantas a soportar de mejor manera condiciones de estrés (Nadeem *et al.*, 2014). Se estima que 80% de las especies de plantas terrestres forman asociaciones micorrícicas, siendo los HMA los predominantes en estas plantas (Wang y Qiu, 2006).

4.4.2. *Rhizophagus irregularis*

Rhizophagus irregularis (originalmente llamado *Glomus intraradices*, posteriormente renombrado *Rhizophagus intraradices* y finalmente como *R. irregularis*, UniProt, 2019), es el hongo micorrízico arbuscular que puede ser producido biotecnológicamente de manera más eficiente a gran escala y que puede ser altamente concentrado en un sustrato portador estéril. Además, éste HMA se ha convertido en un modelo para los investigadores, ya que puede ser cultivado *in vitro* en un sistema muy parecido al utilizado para su producción comercial a gran escala (Ceballos *et al.*, 2013).



Figura 7. Esporas de *Rhizophagus irregularis*, dentro y fuera de fragmentos de raíces (West Virginia University, 2017)

R. irregularis fue elegido para ser el primer HMA en secuenciarse su genoma debido a que se encuentra presente en diferentes ecosistemas, templados y tropicales, alrededor del mundo (Martin *et al.*, 2008); debido a que toma, transfiere y facilita la asimilación de fósforo y nitrógeno a su hospedero (Toussaint, St-Arnaud y Charest, 2004) y debido a la facilidad con la que coloniza varias especies vegetales, muchas de ellas de importancia agronómica (Martin *et al.*, 2008). También fue elegido para ser el primer HMA en secuenciarse su transcriptoma a gran escala (Tisserant *et al.*, 2012).

Las esporas de *Rhizophagus irregularis* son casi hialinas a amarillas marrones, globosas, subglobosas, ovoides, oblongas o lo suficientemente irregulares para parecer nudosas; su eje más largo mide de 70 a 165 μm, se transportan individualmente o en agregados de varias esporas, y la especie forma esporas intrarradicales (West Virginia University, 2017), siendo ésta su característica típica (van Aarle y Olsson, 2003).

4.5 Efecto de las micorrizas sobre los fitoquímicos

Las rutas metabólicas que producen a los metabolitos secundarios se activan conforme a la etapa fenológica, pero también se aceleran ante estrés medioambiental como las heridas, la radiación ultravioleta, el ataque de patógenos o ante microorganismos rizosféricos o simbióticos, puesto que se involucran en reacciones de defensa de la planta, fungen como señalizadores para la interacción con otros organismos y en la protección contra agentes dañinos (oxidativos) producidos en las mismas células (Sbrana, Avio y Giovannetti, 2014).

El efecto de las micorrizas sobre la producción natural de fitoquímicos ha sido estudiado para varios casos y diferentes especies. Bagheri *et al.*, (2014) encontraron un incremento en la concentración de aceite esencial de las flores de menta ante la inoculación por *Glomus etunicatum* y *Funneliformis mosseae*, en tres genotipos de menta. López, Delgadillo y Ruiz (2015) descubrieron que la colonización micorrícica altera la cantidad de los componentes esenciales de tomillo, así como la presencia de otros. En frutos de fresa (*Fragaria × ananassa*), el contenido de antocianinas y compuestos fenólicos varió o permaneció constante con la aplicación del inóculo de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* conforme al momento de la inoculación y a la variedad de la planta, sin observarse algún patrón específico (Cecatto *et al.*, 2016). Gerlach *et al.* (2015) estudiaron la respuesta de la concentración de terpenoides en función de la inoculación con *Rhizophagus irregularis*, en hojas fuente (de carbohidratos) de maíz, donde los dos terpenoides estudiados mostraron un incremento.

Sin embargo, los compuestos encontrados hasta el momento para *P. luteoalbum* han sido compuestos fenólicos y se han encontrado en su parte vegetativa; en este sentido también se han estudiado algunas variaciones de compuestos fenólicos en función de la micorrización en gran diversidad de especies: En plantas de cebolla (*Allium cepa* L.), Bettoni *et al.* (2014) descubrieron que la concentración de compuestos fenólicos totales en las hojas incrementó ante la inoculación con HMA. Haghighi, Mozafariyan y Abdolahipour (2015) mostraron incrementos en concentraciones de compuestos fenólicos en hojas de pepino (*Cucumis sativus*) micorrizado con *Funneliformis mosseae* en condiciones de estrés por temperaturas altas y bajas. En geranio (*Pelargonium graveolens*), el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides se incrementó gracias a la micorrización con *Funneliformis mosseae* y *Rhizophagus irregularis*, en conjunto y

por separado; sin embargo, este aumento disminuye ante condiciones de estrés hídrico (Amiri, Nikbakht y Etemadi, 2015). Para *Viola tricolor*, la micorrización provocó un incremento en la cantidad del compuesto fenólico ácido p-hidroxibenzoico y el flavonoide rutina con la especie *Rhizophagus irregularis* pero no con *Funneliformis mosseae*, y con ninguna de estas especies incrementó la concentración de vitexina (Zubek *et al.*, 2015).

5. LITERATURA CITADA

- van Aarle, I. M. y P. A. Olsson. 2003. Fungal Lipid Accumulation and Development of Mycelial Structures by Two Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 6762-6767.
- Aderogba, M. A., L. J. McGaw, V. P. Bagla, J. N. Eloff y B. M. Abegaz. 2014. In vitro antifungal activity of the acetone extract and two isolated compounds from the weed, *Pseudognaphalium luteoalbum*. *South African Journal of Botany* 94: 74-78.
- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. 5th ed. Elsevier Academic Press, Massachusetts.
- Akter, R., S. J. Uddin, I. D. Grice y E. Tiralongo. 2014. Cytotoxic activity screening of Bangladeshi medicinal plant extracts. *Journal of Natural Medicines* 68: 246-252.
- Amiri, R., A. Nikbakht y N. Etemadi. 2015. Alleviation of drought stress on rose geranium [*Pelargonium graveolens* (L.) Herit.] in terms of antioxidant activity and secondary metabolites by mycorrhizal inoculation. *Scientia Horticulturae* 197: 373-380.
- Aziz, N. H., S. E. Farag, L. A. Mousa y M. A. Abo-Zaid. 1998. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios* 93: 43-54.
- Bagheri, S., M. A. Ebrahimi, S. Davazdahemami y J. Minooyi. 2014. Terpenoids and Phenolic Compounds Production of Mint Genotypes in Response to Mycorrhizal Bio- Elicitors. 11.
- Barrico, L., A. M. Azul, M. C. Morais, A. Pereira Coutinho, H. Freitas y P. Castro. 2012. Biodiversity in urban ecosystems: Plants and macromycetes as indicators for conservation planning in the city of Coimbra (Portugal). *Landscape and Urban Planning* 106: 88-102.
- Bettoni, M. M., A. F. Mogor, V. Pauletti y N. Goicoechea. 2014. Growth and metabolism of onion seedlings as affected by the application of humic substances, mycorrhizal inoculation and elevated CO₂. *Scientia Horticulturae* 180: 227-235.
- Binutu, O. A., K. E. Adesogan y J. I. Okogun. 1996. Antibacterial and Antifungal Compounds

- from *Kigelia pinnata*. *Planta Medica* 62: 352-353.
- Blancard, D. 2012. *Tomato Diseases : Identification, Biology and Control: A Colour Handbook*. CRC Press.
- Bruschi, P., V. Urso, D. Solazzo, M. Tonini y M. A. Signorini. 2017. Traditional knowledge on ethno-veterinary and fodder plants in South Angola: an ethnobotanic field survey in Mopane woodlands in Bibala, Namibe province. *Journal of Agriculture and Environment for International Development*.
- Calderón, G. y J. Rzedowski. 2005. *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2a ed. Comisión Nacional para el Estudio de la Biodiversidad e Instituto de Ecología, Michoacán, México.
- Carbonell, C., D. Cifuentes, J. Tello y J. L. Cenis. 1994. Diferenciación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y F. o. f. sp. *radicis-lycopersici* y su detección en planta mediante marcadores RAPD. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 20: 919-926.
- Ceballos, I., M. Ruiz, C. Fernández, R. Peña, A. Rodríguez y I. R. Sanders. 2013. The In Vitro Mass-Produced Model Mycorrhizal Fungus, *Rhizophagus irregularis*, Significantly Increases Yields of the Globally Important Food Security Crop Cassava. *PLOS ONE* 8: e70633.
- Cecatto, A. P., F. M. Ruiz, E. O. Calvete, J. Martínez y P. Palencia. 2016. Mycorrhizal inoculation affects the phytochemical content in strawberry fruits. *Acta Scientiarum. Agronomy* 38: 227.
- Chen, W.-Q., Z.-J. Song y H.-H. Xu. 2012. A new antifungal and cytotoxic C-methylated flavone glycoside from *Picea neoveitchii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22: 5819-5822.
- Cotoras, M., C. García, C. Lagos, C. Folch y L. Mendoza. 2001. Antifungal activity on *Botrytis cinerea* of flavonoids and diterpenoids isolated from the surface of *Pseudognaphalium* spp. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* 46: 433-440.
- Cruz A., A., C. Mendoza Z. y S. Romero C. 2000. Identificación de hongos del suelo que causan pudriciones de raíz y cuello del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el sureste del Estado de México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 6: 25-32.
- Cuadra, P., J. B. Harborne y P. G. Waterman. 1997. Increases in surface flavonols and photosynthetic pigments in *Gnaphalium luteo-album* in response to UV-B radiation. *Phytochemistry* 45: 1377-1383.

- Dean, R., J. A. Van Kan, Z. A. Pretorius, K. E. Hammond-Kosack, A. Di Pietro, P. D. Spanu, J. J. Rudd, et al. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology* 13: 414–430.
- Demirci, B., K. H. C. Baser y H. Duman. 2009. The essential oil composition of *Gnaphalium luteo-album*. *Chemistry of Natural Compounds* 45: 446-447.
- Di Modica, G. y S. Tira. 1963. Chromatographic comparison of flavonoid pigments from *Inuleae*. *Annali di Chimica* 53: 764-773.
- Drury, D. G. 1970. A fresh approach to the classification of the genus *Gnaphalium* with particular reference to the species present in New Zealand (inuleae-compositae). *New Zealand Journal of Botany* 8: 222-248.
- García D., S. E., D. Cibrián T. y D. Alvarado R. 2007. Damping off y pudrición de raíz por *Fusarium: Fusarium oxysporum* Schltdl. (Moniliales, Moniliaceae). En *Enfermedades forestales en México*, pp. 587. Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México, México.
- Gerlach, N., J. Schmitz, A. Polatajko, U. Schlüter, H. Fahnenstich, S. Witt, A. R. Fernie. 2015. An integrated functional approach to dissect systemic responses in maize to arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant, Cell & Environment* 38: 1591-1612.
- Gómez J., R., L. M. Hernández F., L. E. Cossio V., J. G. López A. y R. Sánchez L. 2011. *Enfermedades fungosas y bacterianas del cultivo de tomate en el estado de Nayarit*. 1a Ed. INIFAP.
- Hadian, S., K. Rahnama, S. Jamali y A. Eskandari. 2011. Comparing Neem extract with chemical control on *Fusarium oxysporum* and *Meloidogyne incognita* complex of tomato. 6.
- Haghighi, M., M. Mozafariyan y B. Abdolahipour. 2015. Effect of cucumber mycorrhiza inoculation under low and high root temperature grown on hydroponic conditions. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 18: 89-96.
- Hershman, D. E. 1993. *Kentucky Plant Disease Management Guide for Soybeans*. University of Kentucky.
- Hilliard, O. M. y B. L. Burtt. 1981. Some generic concepts in Compositae – Gnaphaliinae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 82: 181-232.
- Hinojosa-Espinosa, O. y J. L. Villaseñor. 2014. Nuevas combinaciones en *Pseudognaphalium* (Gnaphalieae-Asteraceae) de México. *Botanical Sciences* 92: 489-491.

- Jaimes, R. G., L. Martín, H. Fuentes y L. E. Cossio. Enfermedades fungosas y bacterianas del cultivo de tomate en el estado de Nayarit. 85.
- Jang, Y. J., J. Kim, J. Shim, J. Kim, S. Byun, M.-H. Oak, K. W. Lee y H. J. Lee. 2011. Kaempferol Attenuates 4-Hydroxynonenal-Induced Apoptosis in PC12 Cells by Directly Inhibiting NADPH Oxidase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 337: 747-754.
- Kaya, D. A., M. Arslan y C. Rusu. 2013. Effects of harvesting hour on essential oil content and composition of *Thymus vulgaris*. 61: 10.
- Korukluoglu, M., Y. Sahan y A. Yigit. 2008. Antifungal Properties of Olive Leaf Extracts and Their Phenolic Compounds. *Journal of Food Safety* 28: 76-87.
- Kosaka, Y., L. Xayvongsa, A. Vilayphone, H. Chanthavong, S. Takeda y M. Kato. 2013. Wild Edible Herbs in Paddy Fields and Their Sale in a Mixture in Houaphan Province, the Lao People's Democratic Republic. *Economic Botany* 67: 335-349.
- Landcare Research. 2018. New Zealand Flora. New Zealand Flora. Disponible en: <https://nzflora.landcareresearch.co.nz/default.aspx?selected=NameDetails&NameId=8466A49A-968B-45FB-8E7F-ED6EF783C0AF&StateId=&Sort=&TabNum=0> [Accedido 10 de noviembre de 2018].
- López A., R. M., J. Delgadillo M. y L. M. Ruiz P. 2015. Rendimiento y calidad de aceite de *Thymus vulgaris* L., por efecto de hongos micorrícicos, rizobacterias y fitorreguladores. *Agroproductividad* 8: 3-11.
- Martin, F., V. Gianinazzi- Pearson, M. Hijri, P. Lammers, N. Requena, I. R. Sanders, Y. Shachar- Hill, et al. 2008. The long hard road to a completed *Glomus intraradices* genome. *New Phytologist* 180: 747-750.
- Merkl, R., I. Hrádková, V. Filip y J. Šmidrkal. 2010. Antimicrobial and antioxidant properties of phenolic acids alkyl esters. *Czech Journal of Food Sciences* 28: 275-279.
- Messiaen, C. M., D. Blancard, F. Rouxel y R. Lafon. 1994. Enfermedades de las hortalizas. 3a Ed. Grupo Mundi-Prensa, Madrid, ES.
- Michielse, C. B. y M. Rep. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology* 10: 311-324.
- Mondragón P., J. y H. Vibrans. 2009. *Gnaphalium luteo-album* - ficha informativa. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/gnaphalium-luteo->

album/fichas/ficha.htm [Accedido 22 de abril de 2018].

- Morcía, C., G. Tumino y V. Terzi. 2013. Plant bioactive metabolites for cereal protection against fungal pathogens. En *Antifungal Metabolites from Plants*, pp. 401–427. Springer.
- Mythili, T. y R. Ravindhran. 2012. Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Sesbania sesban* (L.) Merr. 5: 5.
- Nadeem, S. M., M. Ahmad, Z. A. Zahir, A. Javaid y M. Ashraf. 2014. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances* 32: 429-448.
- Naghdi Badi, H., D. Yazdani, S. M. Ali y F. Nazari. 2004. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products* 19: 231-236.
- Nelson, P. E. 1981. Life Cycle and Epidemiology of *Fusarium oxysporum*. En Mace, M. E., Bell, Beckman, C. H. (eds.), *Fungal Wilt Diseases of Plants*, pp. 51-78. Academic Press, Nueva York, US.
- Nesom, G. L. 2004. Notes on the distribution of *Pseudognaphalium luteoalbum* (Asteraceae: Gnaphalieae). *SIDA, Contributions to Botany* 21: 463-464.
- Niger, M. T. 2016. Inhibitory effect of plant leaf extracts on carbohydrate digestive enzyme: a case study on some woody plants species collected in Bangladesh and Japan. Tesis Doctoral. Kochi University, Kochi, Japón.
- Pérez, P. M. 2009. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 1607 - 6079.
- PFAF. 2012. *Gnaphalium luteoalbum* Jersey Cudweed PFAF Plant Database. Plants For A Future. Disponible en: <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Gnaphalium+luteoalbum> [Accedido 23 de abril de 2018].
- Pusztahelyi, T., I. J. Holb y I. Pócsi. 2015. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in Plant Science* 6: 573.
- Quiroga, E. N., A. R. Sampietro y M. A. Vattuone. 2001. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 74: 89-96.
- Razzaghi A., M. y M. Rai. 2013. *Antifungal Metabolites from Plants*. Springer, Londres, UK.
- Riahi, L., H. Ghazghazi, B. Ayari, C. Aouadhi, I. Klay, H. Chograni, A. Cherif y N. Zoghalmi. 2015. Effect of environmental conditions on chemical polymorphism and biological activities among *Artemisia absinthium* L. essential oil provenances grown in Tunisia.

Industrial Crops and Products 66: 96-102.

Rosado A., C., L. Molinero R., R. Rodríguez A. y M. J. Basallote U. 2014. Antifungal activity of asparagus extracts against phytopathogenic *Fusarium oxysporum*. *Scientia Horticulturae* 171: 51-57.

Sahu, T. R. 1984. Less known uses of weeds as medicinal plants. *Ancient Science of Life* 3: 245-249.

Saleh, N. A. M., R. M. A. Mansour, Z. A. R. El-Kareemy y A. A. Fayed. 1988. The chemosystematics of local members of the subtribe gnaphaliinae (Compositae). *Biochemical Systematics and Ecology* 16: 615-617.

Sangwan, N. S., A. H. A. Farooqi, F. Shabih y R. S. Sangwan. 2001. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation* 34: 3-21.

Sati, P., P. Dhyani, I. Dutt-Bhatt y A. Pandey. 2018. *Ginkgo biloba* flavonoid glycosides in antimicrobial perspective with reference to extraction method. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* January. S/n.

Sbrana, C., L. Avio y M. Giovannetti. 2014. Beneficial mycorrhizal symbionts affecting the production of health-promoting phytochemicals. *Electrophoresis* 35: 1535-1546.

Singha, I. M., Y. Kakoty, B. G. Unni, M. C. Kalita, J. Das, A. Naglot, S. B. Wann y L. Singh. 2011. Control of *Fusarium* wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* using leaf extract of *Piper betle* L.: a preliminary study. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 2583.

Sombra A., V. I. 2015. Influencia del riego, el sustrato y la fertilización sobre el desarrollo y la concentración de flavonoides en árnica (*Heterotheca inuloides* Cass.). Tesis Lic. Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México, México.

Steinkellner, S. y R. Mhammerler. 2007. Effect of flavonoids on the development of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of Plant Interactions* 2: 17-23.

Tisserant, E., A. Kohler, P. Dozolme- Seddas, R. Balestrini, K. Benabdellah, A. Colard, D. Croll. 2012. The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytologist* 193: 755-769.

Toussaint, J.-P., M. St-Arnaud y C. Charest. 2004. Nitrogen transfer and assimilation between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck & Smith and Ri T-DNA

- roots of *Daucus carota* L. in an in vitro compartmented system. *Canadian Journal of Microbiology* 50: 251-260.
- Uddin, M. S., G. M. S. Uddin, M. M. Begum, Y. Begum, O. Herrera-Calderon, M. M. Islam y M. M. Abdel-Daim. 2017. Inspection of Phytochemical Content and In Vitro Antioxidant Profile of *Gnaphalium luteoalbum* L.: An Unexplored Phytomedicine. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences* 7: 136-146.
- UniProt. 2019. *Rhizophagus irregularis* (Arbuscular mycorrhizal fungus) (*Glomus intraradices*). UniProt. Disponible en: <https://www.uniprot.org/taxonomy/4876> [Accedido 16 de marzo de 2019].
- Usano A., J. 2012. Estudio del efecto de los factores ambientales y agronómicos sobre la producción de los aceites esenciales de *Salvia lavandulifolia* VAHL. Ph.D. Thesis. Servicio de Publicaciones, Universidad Complutense de Madrid.
- USDA. 2018. Germplasm Resources Information Network (GRIN-Taxonomy) v 1.10.2.8. Germplasm Resources Information Network. Disponible en: <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?411038> [Accedido 24 de abril de 2018].
- Villa M., A., R. Pérez-Leal, H. A. Morales-Morales, M. Basurto-Sotelo, J. M. Soto-Parra y E. Martínez-Escudero. 2015. Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica* 64: 194-205.
- Wang, B. y Y.-L. Qiu. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299-363.
- Wang, X., X. Wei, Y. Tian, L. Shen y H. Xu. 2010. Antifungal Flavonoids from *Ficus sarmentosa* var. *henryi* (King) Corner. *Agricultural Sciences in China* 9: 690-694.
- West Virginia University. 2017. *Rhizophagus irregularis*. International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mychorrhizal Fungi. Disponible en: http://fungi.invam.wvu.edu/the-fungi/classification/glomaceae/rhizophagus/rhizophagus_irregularis.html [Accedido 21 de octubre de 2018].
- Yamada, Y., A. Yamamoto, N. Yoneda y N. Nakatani. 1999. Identification of Kaempferol from the Leaves of *Diospyros kaki* and its Antimicrobial Activity against *Streptococcus mutans*. *Biocontrol Science* 4: 97-100.
- Zabka, M. y R. Pavela. 2013. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere* 93: 1051-1056.

Zheng, X., W. Wang, H. Piao, W. Xu, H. Shi y C. Zhao. 2013. The Genus *Gnaphalium* L. (Compositae): Phytochemical and Pharmacological Characteristics. *Molecules* 18: 8298-8318.

Zubek, S., K. Rola, A. Szewczyk, M. L. Majewska y K. Turnau. 2015. Enhanced concentrations of elements and secondary metabolites in *Viola tricolor* L. induced by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 390: 129-142.

CAPÍTULO 1. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO DE *Pseudognaphalium luteoalbum* EN ACETONA EN FUNCIÓN DE LA MICORRIZACIÓN

RESUMEN

Pseudognaphalium luteoalbum es una arvense de origen euroasiático y se encuentra distribuida mundialmente. En un estudio se describió el efecto antifúngico del extracto obtenido con propanona de esta planta contra *Fusarium oxysporum* Schdtl, sin embargo, en este estudio no se detallaron las condiciones ambientales a las que fueron sometidas las plantas. Debido a esto en el presente estudio se consideró la inoculación con Hongos Micorrícicos Arbusculares (HMA) como un factor ambiental para conocer la manera en que influye el estado de la planta sobre su actividad antifúngica a través de la producción de metabolitos secundarios. Se propagaron plantas de *Pseudognaphalium luteoalbum* de origen silvestre y se sometieron a tratamientos de: cosecha en fase vegetativa con inoculación de hongos micorrícicos arbusculares (HMA), cosecha en fase vegetativa sin inoculación de HMA, cosecha en fase reproductiva con inoculación de HMA y cosecha en fase reproductiva sin inoculación de HMA, con 12 repeticiones. Para la inoculación se realizó el conteo de esporas, y se midió la colonización micorrícica tras la cosecha. Se llevó a cabo una extracción con acetona y los extractos se probaron mediante el método de difusión en agar contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3 (Fol 3). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de colonización micorrícica, pero no se observó actividad antifúngica hasta una concentración de 2.5 mg/mL. Paralelamente se realizó una prueba de toxicidad de los disolventes acetona y dimetilsulfóxido, los cuales mostraron retrasar el crecimiento de Fol 3. El extracto obtenido con acetona de *P. luteoalbum* no presentó actividad antifúngica, esto pudo deberse a algún otro factor ambiental, a la variación genética de las especies empleadas o a problemas metodológicos en el estudio original. No se recomienda utilizar extracto alguno de *P. luteoalbum* para controlar a *F. oxysporum* f. *lycopersici* raza 3 en el Valle de México.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos contra los compuestos utilizados para su control hace un llamado para obtener nuevos antibióticos, agentes químico-terapéuticos, y agroquímicos que sean efectivos, posean menor toxicidad y tengan un impacto ambiental menor (Strobel y Daisy, 2003). Particularmente, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* provoca una de las enfermedades más dañinas y prevalentes del jitomate (Agrios, 2005). Se han reportado tres razas de este hongo, mismas que han surgido en respuesta a los diferentes cultivares de jitomate resistentes a otras razas (McGrath, Gillespie y Vawdrey, 1987; Blancard, 2012: 511).

Aderogba *et al.*, (2014) probaron el extracto obtenido con acetona de la arvense *Pseudognaphalium luteoalbum* contra *Fusarium oxysporum*, encontrando inhibición a una concentración del extracto de 0.16 mg/mL, lo que mostró su potencial como fungicida. Esta planta es de origen eurasiático y que actualmente se encuentra distribuida mundialmente (Calderón y Rzedowski, 2005:841), y puesto que es ruderal y que en ocasiones crece en manchones, sería factible su recolección en grandes cantidades o bien cultivarse fácilmente, y reemplazar el uso de agroquímicos en el control de *Fusarium*. Por su origen exótico, el uso de muchos individuos de esta especie no pondría en riesgo las poblaciones de alguna planta nativa o endémica.

Por otro lado, es bien sabido que diversos factores, entre ellos la colonización micorrícica (Sbrana, Avio y Giovannetti, 2014), pueden afectar la concentración de metabolitos secundarios en una planta (Bennett y Wallsgrove, 1994). Considerando que las condiciones de México son diferentes a las presentes en el lugar de colecta del estudio de Aderogba *et al.* (2014), se decidió realizar el cultivo de la especie modificando algunas variables para encontrar posibles variaciones de la actividad antifúngica previamente reportada. Los factores elegidos fueron el nivel de colonización micorrícica y la etapa fenológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante la primera semana de mayo fueron recolectadas semillas de una planta silvestre de un área verde del campus Montecillo del Colegio de Postgraduados, (coordenadas 19.4673°, -98.8967°). El 5 de mayo del 2017 fueron colocadas para germinación alrededor de 650 semillas sobre espuma agrícola (Ultrafoam) y regadas diariamente con agua corriente. En cada unidad de los germinadores de espuma se colocaron 3 semillas, dos en la parte superior y uno en el hoyo prefabricado. Los germinadores se colocaron en un lugar con resolana, las semillas se pusieron a germinar con una mezcla de mitad solución Steiner al 10% y mitad agua corriente. El riego fue constante reemplazando la cantidad de la mezcla que se evaporaba. A partir del sexto día el riego se realizó con una mezcla compuesta con 50% agua corriente y 50% agua destilada, con el fin de usar un agua con cierto grado de pureza y al mismo tiempo ahorrar costos.



Figura 1.1. Plántulas *Pseudognaphalium luteoalbum* germinadas en espuma Ultrafoam.

En la primera semana de agosto 48 plantas sobrevivientes y más homogéneas se trasplantaron en un sustrato compuesto de 70:30 v/v, tezontle: suelo agrícola, en bolsas para vivero de 20 x 20 cm. Estas plantas se dividieron posteriormente en 4 tratamientos (con 12 repeticiones): fase vegetativa con inoculación de HMA (VI), fase vegetativa sin inoculación de HMA (VNI), fase reproductiva con inoculación de HMA (RI) y fase reproductiva sin inoculación de HMA (RNI).

Para obtener el inóculo de *R. irregularis* se cortaron las raíces de una planta (*Plectranthus* sp.) previamente inoculada en fragmentos menores a 1 cm de longitud y se mezclaron con la arena en la cual se propagó el inóculo y se homogeneizó. Mediante un conteo de esporas, se estimaron alrededor de 1000 esporas viables por gramo de arena. Se prepararon 30 dosis de 10 g de inóculo cada una. Veinticuatro plantas fueron inoculadas en los respectivos tratamientos el 31 de agosto del 2017.



Figura 1.2. Planta de *P. luteoalbum* inoculada con *R. irregularis*.

Comprobación de la colonización micorrícica

Para la comprobación de la colonización micorrícica de los tratamientos se utilizó el método descrito por Phillips y Hayman (1970) con modificaciones. Se cortaron las raíces, se lavaron con agua corriente, se colocaron en cápsulas que permiten la entrada de líquidos y se colocaron en KOH a 10%. Al siguiente día se retiró el KOH y se colocó nuevo. Después de 48 h en KOH las raíces se lavaron con agua corriente para ser incubadas durante 10 min en agua oxigenada. Después se lavaron con agua corriente para ser transferidas a ácido clorhídrico al 10% durante 10 min, se retiró y sin enjuagar se sumergieron las raíces en azul de tripano durante 1 h. Finalmente se retiró el azul de tripano y se enjuagaron segmentos de aproximadamente 1 cm de largo de las raíces en ácido láctico a 50% para montarse alrededor de 20 de ellos en 1 portaobjetos. Este procedimiento se realizó para las raíces de todos los tratamientos. La cosecha de la etapa vegetativa se realizó el día 20 de septiembre, mientras que la de la etapa reproductiva se realizó el 30 de octubre.

Cosecha y obtención de extractos

El 20 de septiembre del 2017, un día después de que la primera planta floreciera, se cosecharon la mitad de las plantas, correspondientes a los tratamientos de etapa vegetativa inoculadas y no inoculadas (VI y VNI). Tras secarse en estufa durante 48 h, se pesaron y se cortaron finamente con tijeras y cada tratamiento se colocó en un frasco y se añadió acetona hasta cubrir el material. Se agitó y se decantó al día siguiente. Se agregó más acetona, se agitó y un día más tarde se decantó nuevamente. Ambos decantados se juntaron y se filtraron con papel

filtro Wathman #1. El extracto filtrado se concentró en rotaevaporador a 40° C.

Prueba de toxicidad de los disolventes contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Para la elección del disolvente a utilizarse en la prueba antifúngica, se realizó una prueba de solubilidad del extracto (Anexo: Observaciones sobre *P. luteoalbum*: Solubilidad del extracto obtenido con acetona) y una prueba de toxicidad de los disolventes contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3 (Fol 3), permitiendo éstas últimas pruebas determinar el efecto del disolvente sobre el hongo para evitar confundirlo con algún efecto antifúngico. De la prueba de solubilidad se concluyó que sólo es posible disolver el extracto en acetona o en dimetilsulfóxido.

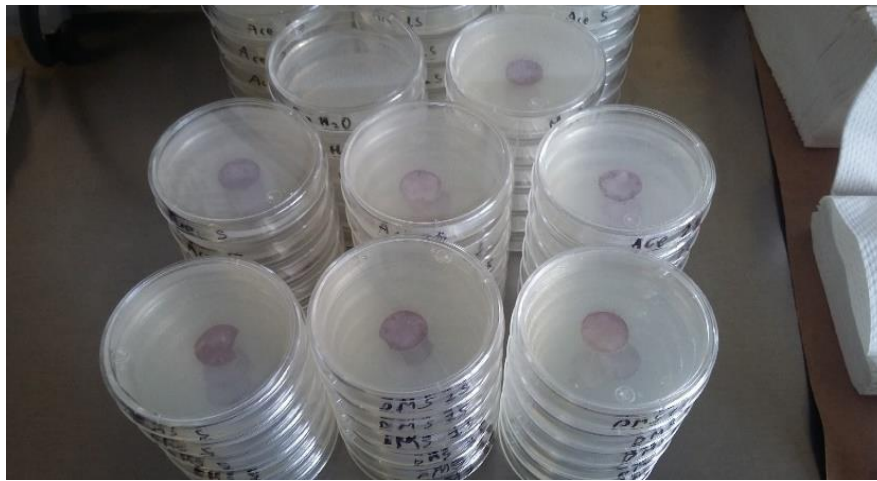


Figura 1.3. Colocación de discos de Fol 3 en diferentes concentraciones de solventes.

Para determinar el efecto tóxico del disolvente se preparó agar con papa y dextrosa (PDA) conforme a las instrucciones del fabricante. El agar, antes de solidificarse, fue mezclado con algún porcentaje del disolvente a probar, para obtener las concentraciones de acetona a 25%, 15% y 5%; y dimetilsulfóxido a 25%, 15% y 5%. El medio de cultivo puro se utilizó como testigo. Cada uno de estos siete tratamientos fue repetido 3 veces en cajas Petri de 5 cm de diámetro con discos de PDA con micelio de Fol 3 de 1.5 cm de diámetro al centro de la caja (“disco de micelio grande”) y 3 repeticiones más con discos con micelio de Fol 3 de 0.2 cm de diámetro (“disco de micelio pequeño”). Se dejaron a una temperatura ambiental de alrededor de 27° C el 16 de octubre del 2017 a las 17:00 h. Cada 24 h se registró el diámetro promedio de la creciente mancha de micelio, hasta que el micelio del testigo negativo superó los 4 cm de diámetro, es decir, al cuarto día.

Determinación del efecto antifúngico del extracto acetónico de *P. luteoalbum*

Se prepararon 16 cajas Petri de aprox. 9 cm de diámetro con PDA. Se pesaron 2.5 mg del extracto obtenido de las plantas inoculadas y no inoculadas cosechadas durante la fase vegetativa (VI y VNI). Los 2.5 mg se colocaron en tubos de microcentrífuga y se le añadió a cada uno 1 ml de acetona. Los tubos se agitaron durante 5 min en agitador Heidolph Multi Reax. De estas mezclas se tomaron 125 μ l, que fueron colocados en un nuevo tubo de microcentrífuga para ser aforado a 1 ml. El proceso se repitió para finalmente obtener las siguientes concentraciones: 0.312 mg/mL, 0.039 mg/mL y la concentración original de 2.5 mg/mL. Cada caja Petri con medio de cultivo ya solidificado se dividió radialmente en 5 partes: En 3 de ellas se colocaron discos de papel filtro (Whatman #1) donde se depositaron 7 μ L de las diferentes concentraciones del extracto. En las otras dos secciones se colocaron los discos de papel donde se depositaron 7 μ L de acetona y agua, respectivamente. Se colocaron 4 cajas de Petri como repeticiones para cada tratamiento (VI y VNI). Al centro de cada caja de Petri se colocó un disco de PDA con micelio de Fol 3 de aproximadamente 0.75 cm de diámetro. Las cajas se incubaron a 28° C con el fin de observar, posterior al crecimiento del hongo, los halos de inhibición que se podrían dar alrededor de los discos de papel.



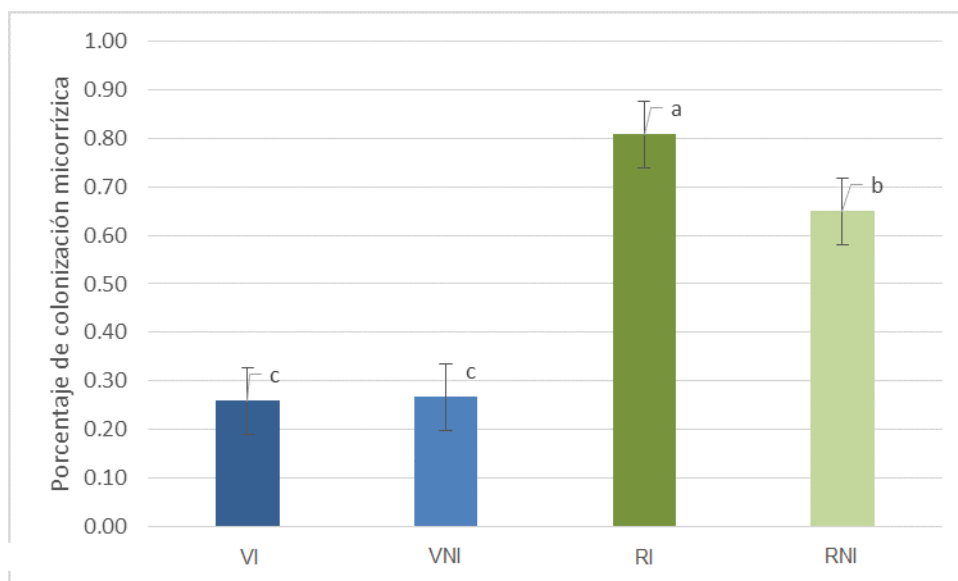
Figura 1.4. Cajas de Petri para la evaluación de la actividad antifúngica del extracto obtenido de plantas de *P. luteoalbum* inoculadas (dos cajas, lado izquierdo) y no inoculadas (dos cajas, lado derecho) con *R. irregularis*.

A los datos obtenidos se le aplicaron, cuando fue posible, las pruebas de homogeneidad de varianzas conforme a la prueba de Levene y de normalidad de Shapiro-Wilks, para posteriormente ejecutar el análisis de varianza de una vía y finalmente la comparación de medias de Tukey mediante el programa informático InfoStat y las herramientas de Microsoft Office Excel.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comprobación de la colonización micorrícica

Los datos obtenidos para la comprobación de la colonización micorrícica se resumen en el Anexo 1.1. Los datos muestran homogeneidad de varianzas conforme a la prueba de Levene, y una distribución normal conforme a la prueba de Shapiro-Wilks. La comparación de las medias se representa en el siguiente gráfico.



Gráfica 1.1. Porcentaje promedio de colonización micorrícica para los tratamientos fase vegetativa con (Vi) y sin inoculación de HMA (VNI) y fase reproductiva con (RI) y sin inoculación de HMA (RNI). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas conforme a la prueba de comparación de medias de Tukey

Si bien originalmente el diseño utilizado fue un modelo factorial 2x2, hubo una interacción estadísticamente significativa entre el factor de inoculación micorrícica y el factor de fase fenológica, por lo que cada uno de los cuatro tratamientos debió analizarse separadamente en la comparación de medias. La comparación de medias de Tukey nos indica que las diferencias de porcentajes de colonización micorrícica sólo son notables cuando las plantas se encuentran en su fase reproductiva, fase en la cual el tratamiento con inoculación micorrícica presentó un

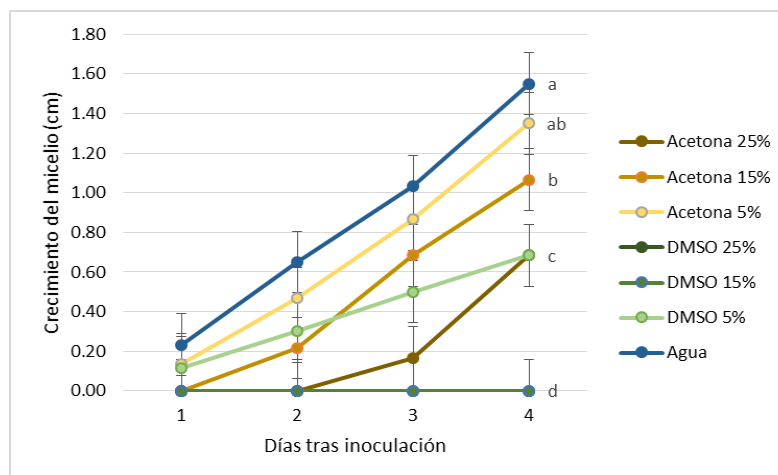
porcentaje mayor de colonización. Jansa, Smith y Smith (2008) encontraron que en puerro (*Allium porrum*) y carretilla (*Medicago truncatula*) la colonización micorrícica alcanzó su máximo nivel cuatro y cinco semanas después de la inoculación por *Rhizophagus irregularis*.

Cabe destacar que a pesar de que 70% del volumen del sustrato se compuso de tezontle, la colonización micorrícica no fue muy diferente entre los tratamientos con y sin inoculación, lo cual indica que las micorrizas presentes de manera natural en el suelo fueron suficientes para obtener más de 60% de colonización micorrícica y por lo tanto la inoculación puede no ser necesaria dependiendo de la cantidad de esporas en el suelo.

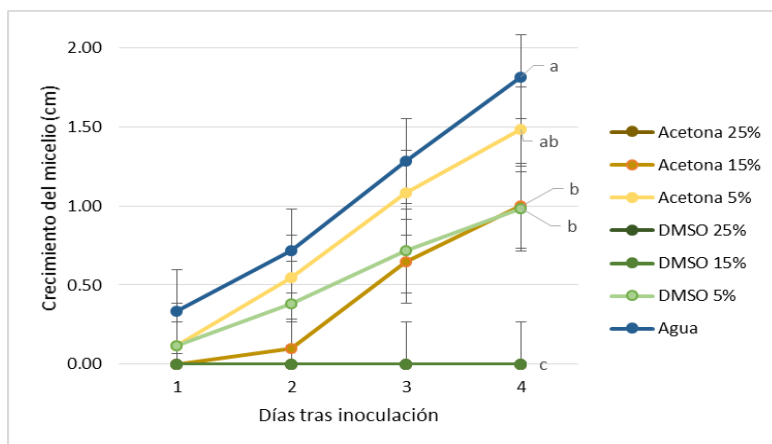
Se concluye que no hay diferencias entre los tratamientos cosechados en la fase vegetativa y que la mayor colonización micorrícica se obtiene con la inoculación en la fase reproductiva.

Prueba de toxicidad de los disolventes contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

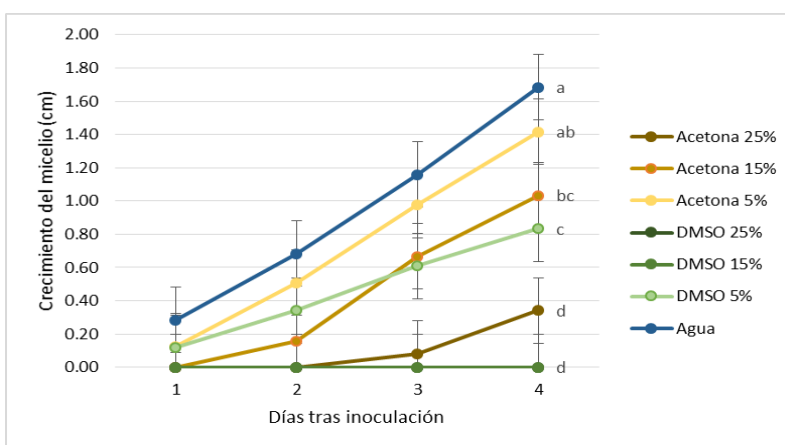
Los datos obtenidos del experimento de toxicidad de disolventes se encuentran en el Anexo 1.2. Los resultados se sintetizan en las siguientes tres gráficas: En la primera de ellas utilizando un disco de micelio grande (Gráfica 1.2), en la segunda un disco de micelio pequeño (Gráfica 1.3) y en la tercera promediando las repeticiones con discos grandes y pequeños (Gráfica 1.4).



Gráfica 1.2. Crecimiento del micelio de Fol 3 a partir de un disco de micelio grande (1.5 cm), en agar de papa y dextrosa con diferentes concentraciones de acetona y dimetilsulfóxido (DMSO). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas conforme a la prueba de comparación de medias de Tukey. Las gráficas de DMSO a 25% y 15% están superpuestas.



Gráfica 1.3. Crecimiento del micelio de Fol 3 a partir de un disco de micelio pequeño (0.2 cm), en agar de papa y dextrosa con diferentes concentraciones de acetona y dimetilsulfóxido (DMSO). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas conforme a la prueba de comparación de medias de Tukey. Las gráficas DMSO a 25%, 15% y acetona a 25% están superpuestas.



Gráfica 1.4. Crecimiento del micelio de Fol 3 a partir de discos de micelio grandes y pequeños, en agar de papa y dextrosa con diferentes concentraciones de acetona y dimetilsulfóxido (DMSO). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas conforme a la prueba de comparación de medias de Tukey. Las gráficas DMSO a 25% y 15% están superpuestas.

Todos los tratamientos con acetona y dimetilsulfóxido a diferentes concentraciones retrasaron el crecimiento de Fol 3, y a mayor concentración de disolvente esta inhibición se incrementó. El dimetilsulfóxido mantiene esta inhibición por más tiempo (la pendiente de la recta es menor), lo cual puede deberse a que la evaporación del dimetilsulfóxido es más lenta (189° C es el punto de ebullición del dimetilsulfóxido, O'Neil, 2013, citado por Pubchem, 2018, contra 56° C de la acetona, ILO-ICSC, 2018).

Los resultados son muy similares entre las repeticiones realizadas con discos de micelio grandes y las realizadas con discos de micelio pequeños. Sin embargo, el tratamiento de acetona a 25% con uso de discos de micelio pequeños impidió el crecimiento del hongo durante cuatro días, en comparación con el mismo tratamiento pero con disco pequeño, en el cual el crecimiento apareció a partir del tercer día de incubación. Es posible que esto se deba a que el disco grande haya absorbido parte de la acetona, diluyendo así ligeramente su concentración.

Los resultados obtenidos difieren de los reportados por Aderogba *et al.* (2014), quienes mencionaron que la acetona a una concentración de 25% no es tóxica para los hongos. Dicha afirmación es una generalización apresurada de un estudio realizado con sólo cinco especies de hongos patógenos de animales, las cuales fueron inhibidas en su crecimiento cuando la concentración de la acetona fue en promedio de 51% (Eloff, Masoko y Picard, 2007). El efecto tóxico o fungistático del disolvente pudo afectar los resultados obtenidos en el estudio original.

Prueba antifúngica del extracto obtenido con acetona contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

El rendimiento obtenido del extracto para el tratamiento de las plantas cosechadas en la fase vegetativa con inoculación micorrícica (VI) fue de 28.6 mg/planta y 132 mg/g de materia seca, mientras que para las plantas cosechadas en la fase reproductiva sin micorrización (VNI) el rendimiento del extracto fue de 22.8 mg/planta y 101.4 mg/g de materia seca.

En nuestros experimentos se observó nula inhibición alrededor de los discos de papel filtro para todas las repeticiones. Se ha sugerido que individualmente las flavonas y flavanonas no sustituidas muestran mayor actividad antifúngica que los flavonoides hidroxilados (Örnker y Jha, 1993). Esto sería relevante considerando que la mayoría de los flavonoides encontrados hasta el momento en *P. luteoalbum* son hidroxilados.

CONCLUSIONES

Todos los tratamientos, incluyendo los de las plantas no inoculadas, presentaron un porcentaje de micorrización, debido a que el sustrato no fue esterilizado y a la posible deposición de inóculo debida al viento.

La inoculación sólo modificó la colonización micorrícica en las plantas de *P. luteoalbum*

cosechadas durante la fase reproductiva, lo que indica que es necesario cierto tiempo para que la colonización se complete. Además, la diferencia entre estos tratamientos fue mínima, por lo que habría que analizar si realmente vale la pena realizar la inoculación, lo cual posiblemente depende de la cantidad de esporas de HMA nativos en el suelo.

Los extractos de las plantas cosechadas en la fase vegetativa mostraron nula actividad antifúngica contra Fol 3, mientras que por otro lado se demostró que la acetona a concentraciones de 25% e incluso inferiores afectan el crecimiento de Fol 3. Estas dos últimas afirmaciones se contraponen a lo establecido por Aderogba *et al.* (2014). Es posible que algunas diferencias en la composición fenotípica de los individuos estudiados o en los factores ambientales expliquen la ausencia de compuestos con actividad antifúngica, por lo que son necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis.

LITERATURA CITADA

- Aderogba, M. A., L. J. McGaw, V. P. Bagla, J. N. Eloff y B. M. Abegaz. 2014. In vitro antifungal activity of the acetone extract and two isolated compounds from the weed, *Pseudognaphalium luteoalbum*. South African Journal of Botany 94: 74-78.
- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press, Massachussets.
- Bennett, R. N. y R. M. Wallsgrave. 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. New Phytologist 127: 617-633.
- Blancard, D. 2012. Tomato Diseases : Identification, Biology and Control: A Colour Handbook. CRC Press.
- Calderón, G. y J. Rzedowski. 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Comisión Nacional para el Estudio de la Biodiversidad e Instituto de Ecología, Michoacán, México.
- Eloff, J. N., P. Masoko y J. Picard. 2007. Resistance of animal fungal pathogens to solvents used in bioassays. South African Journal of Botany 73: 667-669.
- ILO-ICSC. 2018. ICSC 0087 - Acetone. International Labour Organization. Disponible en: http://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_version=2&p_card_id=0087 [Accedido 7 de septiembre de 2018].
- Jansa, J., F. A. Smith y S. E. Smith. 2008. Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? New Phytologist 177: 779-789.
- McGrath, D. J., D. Gillespie y L. Vawdrey. 1987. Inheritance of resistance to *Fusarium*

- oxysporum* f. sp. *lycopersici* races 2 and 3 in *Lycopersicon pennellii*. Australian Journal of Agricultural Research 38: 729-733.
- Örner, M. W. y H. C. Jha. 1993. Antifungal activity of flavonoids and their mixtures against different fungi occurring on grain. Pesticide Science 38: 347-351.
- Phillips, J. M. y D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society 55: 158-161.
- Pubchem. 2018. Dimethyl sulfoxide. Open Chemistry Database. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/679> [Accedido 7 de septiembre de 2018].
- Sbrana, C., L. Avio y M. Giovannetti. 2014. Beneficial mycorrhizal symbionts affecting the production of health-promoting phytochemicals. Electrophoresis 35: 1535-1546.
- Strobel, G. y B. Daisy. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67: 491-502.

CAPÍTULO 2. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA SUCESIÓN DE EXTRACCIONES

RESUMEN

Pseudognaphalium luteoalbum (L.) Hilliard & B.L. Burt. es una arvense de origen euroasiático y se encuentra distribuida mundialmente. En un estudio se describió el efecto antifúngico del extracto obtenido con propanona de *P. luteoalbum* contra *Fusarium oxysporum* Schdtl; sin embargo, la elección de la propanona como disolvente ideal para la extracción no se justificó adecuadamente en ese estudio. Debido a lo anterior se decidió evaluar los extractos obtenidos con hexano, cloruro de metileno, acetona, metanol en términos de su actividad antifúngica contra Fol 3. Se realizaron las pruebas de difusión en agar, medición del porcentaje de germinación de microconidios y una prueba de cultivo en portaobjetos (prueba de Riddell). Ninguno de los extractos mostró actividad antifúngica contra Fol 3, esto pudo deberse a la variación genética de las especies o a problemas metodológicos respecto al estudio original. No se recomienda usar extracto alguno de *P. luteoalbum* para controlar a *F. oxysporum* en el Valle de México.

INTRODUCCIÓN

El extracto *Pseudognaphalium luteoalbum* obtenido con acetona fue probado por Aderogba *et al.* (2014) contra *Fusarium oxysporum*, encontrando una inhibición del hongo a una concentración del extracto de 0.16 mg/mL. La planta en cuestión es de origen eurasiático pero se encuentra distribuida mundialmente (Calderón y Rzedowski, 2005), y puesto que es ruderal y que en ocasiones crece en grandes manchones, podría recolectarse en grandes cantidades o bien cultivarse fácilmente, sin necesidad de agroquímicos o cuidados especiales. Sin embargo, en un experimento llevado anteriormente (Capítulo 1) se observó que el extracto no tenía actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3 (Fol 3).

Considerando que en el estudio de Aderogba *et al.* (2014) la elección de acetona como extractante obedeció a un artículo en el que se comparaban resultados obtenidos de únicamente dos especies (Eloff, 1998), se decidió evaluar los extractos obtenidos con otros disolventes. Por lo anterior el objetivo del presente Capítulo fue evaluar la posible actividad antifúngica de los

extractos obtenidos con hexano, cloruro de metileno, acetona y metanol sobre la actividad antifúngica contra Fol 3, ya que estos disolventes son de uso común y se encuentran bien distribuidos en la escala de polaridad (Snyder, 1974).

La mayor parte de los fitoquímicos reportados en *P. luteoalbum* son flavonoides o ácidos fenólicos (Di Modica y Tira, 1963; Mericli y Eczacilik, 1980, citados por Zheng *et al.*, 2013; Saleh *et al.*, 1988; Cuadra, Harborne y Waterman, 1997; y Aderogba *et al.*, 2014). En pistache (*Pistacia vera*), se encontró que el agua y el metanol son los mejores solventes para obtener extractos con la mayor cantidad de compuestos fenólicos (Goli, Barzegar y Sahari, 2005). Otros investigadores han encontrado resultados similares, como el realizado en tres especies de plantas aromáticas, en el cual se reporta la mayor cantidad de compuestos fenólicos totales en el extracto obtenido con metanol (Roby *et al.*, 2013). Por lo tanto el extracto obtenido con metanol fue uno de los más importantes en ser considerado.

En el artículo elaborado por Aderogba *et al.* (2014) no se especifica si el inóculo utilizado fue micelio o bien una suspensión de conidios, aunque se menciona que fue cultivado durante la noche, por lo que podría sobreentenderse que se utilizó micelio. El tipo de estructura fúngica sobre la que se realiza la prueba y el tipo de prueba son otros factores que podrían hacer variar los resultados. Se ha encontrado que el efecto antifúngico sobre los hongos puede diferir dependiendo de la estructura predominante en el inóculo, particularmente si se trata de hifas o de conidios, lo cual podría deberse al diferente grosor de la pared que presentan estas estructuras (Fernández, Inza y Guarro, 2003). En algunos casos se ha reportado que los flavonoides pueden estimular la germinación de microconidios, como es el caso de la luteolina que en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* incrementó ligeramente el porcentaje de germinación de los microconidios a partir de la concentración 25 μ M (Steinkellner y Mammerler, 2007).

Por lo anterior, en el presente estudio se probaron los extractos obtenidos con los diferentes disolventes y la mezcla de todos ellos en una prueba de difusión en agar, una de medición del porcentaje de germinación de microconidios y, para los extractos obtenidos con acetona y cloruro de metileno, una prueba antifúngica de cultivo en portaobjetos similar a la propuesta por Riddell (1950), ya que permite observar alteraciones en las estructuras microscópicas de los hongos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El origen de las semillas fue una planta de *P. luteoalbum* localizada a la orilla de un camino de una parcela en el Campus Montecillos del Colegio de Postgraduados, en las coordenadas 19.4670°, -98.9188°. El 9 de octubre del 2017 se sembraron 10 semillas en cada una de 40 bolsas para vivero de 30 x 30 cm que contenían una mezcla de tezontle y suelo (70:30 v/v). El sustrato fue previamente humedecido y durante el primer mes se mantuvo la humedad regando dos o tres veces al día con atomizador. Posteriormente los riegos se espaciaron gradualmente a cada dos o tres días, conforme a las condiciones ambientales y la edad de la planta.

A los 158 días después de la siembra, en una etapa tardía de la floración, se cosecharon las plantas, cortando la parte aérea de todas excepto una, que fue utilizada para producir semilla para el siguiente experimento. Este follaje se colocó en bolsas de papel kraft y dentro de un horno marca Blue M a 45° C. Para favorecer el secado las bolsas se cortaron y se utilizaron como base. Veintiseis días después de la cosecha el material vegetal se sacó del horno al alcanzar un peso constante.



Figura 2.1. Secado en horno de los ejemplares de *P. luteoalbum*.

Posteriormente el material vegetal se trituró dos veces en un molino. Se determinó su masa (254.3 g) y fue colocado en frascos para aforarlo con hexano para la primera extracción, y se

agitó. Los frascos se agitaron nuevamente al día siguiente. Tras tres días más de maceración, los extractos se filtraron con papel filtro de poro grueso. El material vegetal se dejó secar del hexano durante cinco horas para posteriormente aforar con cloruro de metileno para el nuevo extracto. El extracto filtrado se procesó mediante rotaevaporador a 45° C y entre 20 y 30 cmHg. El extracto crudo se recogió en un frasco previamente etiquetado y pesado, donde se dejó evaporar. El procedimiento de extracción se repitió de manera similar para los disolventes hexano, cloruro de metileno, acetona y metanol, en ese orden (dejando macerar siempre por al menos dos días y agitando los frascos), salvo que las temperaturas y presiones negativas para rotaevaporar los extractos fueron: 40° y alrededor de 20 cmHg, 45° y alrededor de 10 cmHg, y 60° y de 0 a 30 cmHg para cloruro de metileno, acetona y metanol, respectivamente.

Prueba antifúngica de los extractos mediante difusión en agar

Se utilizó la técnica de difusión en agar (o Kirby-Bauer) contra *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersici* raza 3 (Fol 3). Para ello, se utilizaron los 4 extractos obtenidos (con hexano, con cloruro de metileno, con acetona y con metanol), además de un testigo positivo (fungicida Captan), una mezcla de los 4 extractos en partes iguales, cada disolvente o mezcla de disolventes como testigos negativos y agua. Para poder mezclar los cuatro extractos se encontró que una mezcla de cloruro de metileno y metanol 1:1 (v/v) logra disolver todos los extractos, además de que esta mezcla de disolventes se evapora rápidamente, en menos de un minuto si se coloca en papel filtro seco. Se utilizaron cajas Petri de 5 cm de diámetro, en las cuales se colocó por un lado el papel filtro impregnado de 10 µl del respectivo tratamiento y del lado opuesto se colocó un disco de agar de papa y dextrosa (PDA) con micelio de Fol 3 de aproximadamente 2 mm de diámetro. Se realizaron 3 repeticiones. Después de 5 días de incubación a 25° C se cuantificaron los halos de inhibición.



Figura 2.2. Extractos disueltos, obtenidos de la sucesión de extracciones y testigos (De izquierda a derecha y de arriba a abajo: Agua, hexano, cloruro de metileno, acetona, metanol, mezcla de disolventes, Captan, extracto obtenido con hexano, extracto obtenido con cloruro de metileno, extracto obtenido con acetona, extracto obtenido con metanol y mezcla de extractos)

Prueba de germinación de microconidios

Para este experimento se probaron los siguientes tratamientos: Los 4 extractos obtenidos con hexano, cloruro de metileno, acetona y metanol; un testigo positivo (fungicida Captan); la mezcla de los cuatro extractos; y agua, cada disolvente y la mezcla de disolventes como testigos negativos. Para cada tratamiento se realizaron 4 repeticiones. Los extractos fueron disueltos a una concentración de 100 mg/mL con el disolvente utilizado para su extracción, el fungicida Captan se disolvió en agua a una concentración de 30 mg/mL y la mezcla se compuso de partes iguales de los cuatro extractos disueltos en una mezcla de cloruro de metileno y metanol (1:1 v/v).

Para cada repetición se colocó en un portaobjetos 100 μ L de agar esterilizado no solidificado (caliente), procurando esparcirlo en un círculo. Una vez solidificado se colocaron 10 μ L del extracto o tratamiento en este círculo.

Una vez evaporado el disolvente de los tratamientos se adicionaron 10 μ L de una suspensión de microconidios a una concentración aproximada de $1 \cdot 10^5$ microconidios/mL.

Los portaobjetos fueron cubiertos e incubados durante 36 h a 28° C antes de evaluar la germinación de microconidios bajo microscopio compuesto a 40x, contando el número de microconidios germinados de un total de 100 por cada repetición, con el fin de obtener porcentajes de germinación.

Prueba de Riddell

Derivado de las pruebas de difusión en agar, no se encontraron halos, sin embargo en una repetición del tratamiento con acetona y en una del tratamiento con cloruro de metileno se observó un aparente ligero retraso del crecimiento del hongo al atravesar el disco de papel filtro. Debido a ello se decidió realizar una prueba de Riddell (1950) o cultivo en portaobjetos (microcultivo, “slide culture technique”), ya que es más sensible para la detección de actividad antifúngica de compuestos. En esta prueba se realizaron 3 repeticiones por tratamiento, y los tratamientos probados fueron el extracto obtenido y disuelto con acetona (100 mg/mL), el extracto obtenido y disuelto con cloruro de metileno (100 mg/mL), el disolvente acetona (testigo negativo) y el fungicida Captan disuelto en agua (30 mg/mL, testigo positivo).

Por cada repetición se esterilizó una caja Petri, una varilla de vidrio en forma de “u” o “v”, un portaobjetos, un cubre objetos, un disco de papel filtro, 10 μ L del tratamiento a probar y 15 mL de glicerol al 10%. También se prepararon cajas Petri con medio de cultivo PDA, para obtener discos de medio solidificado de 1 cm de diámetro por repetición.

En una campana de extracción en condiciones de esterilidad para cada repetición se colocó la varilla de vidrio dentro de la caja de Petri, y encima de la varilla se colocó el portaobjetos, se vertió el glicerol al 10% procurando que no toque la parte superior del portaobjetos, posteriormente se colocó el disco de PDA al centro del portaobjetos y en un extremo de este disco se colocó el disco de papel filtro y a éste se le aplicaron 10 μ L del tratamiento a probar, mientras que en el extremo opuesto del disco se colocó un conjunto de hifas de Fol 3.

Se observó el crecimiento del hongo cada 12 h. A las 36 h se observó al microscopio para determinar si había inhibición del crecimiento o algún daño o modificación en el hongo ocasionado por los tratamientos.

Para la evaluación los efectos se agruparon en cuatro categorías: Sin inhibición (al observarse al microscopio que las hifas hayan pasado con normalidad la zona con la sustancia), inhibición no evidente (macroscópicamente no se vería inhibición pero microscópicamente podrían haber alteraciones en las hifas), inhibición evidente (macroscópicamente y microscópicamente se observaría la inhibición) e inhibición total (las hifas no crecerían o casi no crecerían desde haber sido colocadas debido a una buena toxicidad y difusión de la sustancia).

A los datos obtenidos se le aplicaron, cuando fue posible, las pruebas de homogeneidad de

varianzas conforme a la prueba de Levene y de normalidad de Shaphiro-Wilks, para posteriormente ejecutar el análisis de varianza de una vía y finalmente la comparación de medias de Tukey mediante el programa informático InfoStat y las herramientas de Microsoft Office Excel.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 254.3 g de materia seca del total de las plantas cultivadas de *P. luteoalbum*.

Se obtuvieron los siguientes rendimientos de la sucesión de extracciones: 1.6 mg/g de materia seca para el extracto obtenido con hexano, 7.6 mg/g de materia seca para el extracto obtenido con cloruro de metileno, 9.6 mg/g de materia seca para el extracto obtenido con acetona y 30.1 mg/g de materia seca para el extracto obtenido con metanol. De este último disolvente se obtuvo el mayor rendimiento de extracto, con un incremento de más de 200% comparado con la acetona.

Prueba antifúngica de los extractos mediante difusión en agar

Ninguno de los extractos utilizados en la prueba de difusión en agar mostró actividad sobre Fol, únicamente el testigo positivo que contenía Captan, como se muestra en la Figura 2.3 y en el Anexo 2.1.

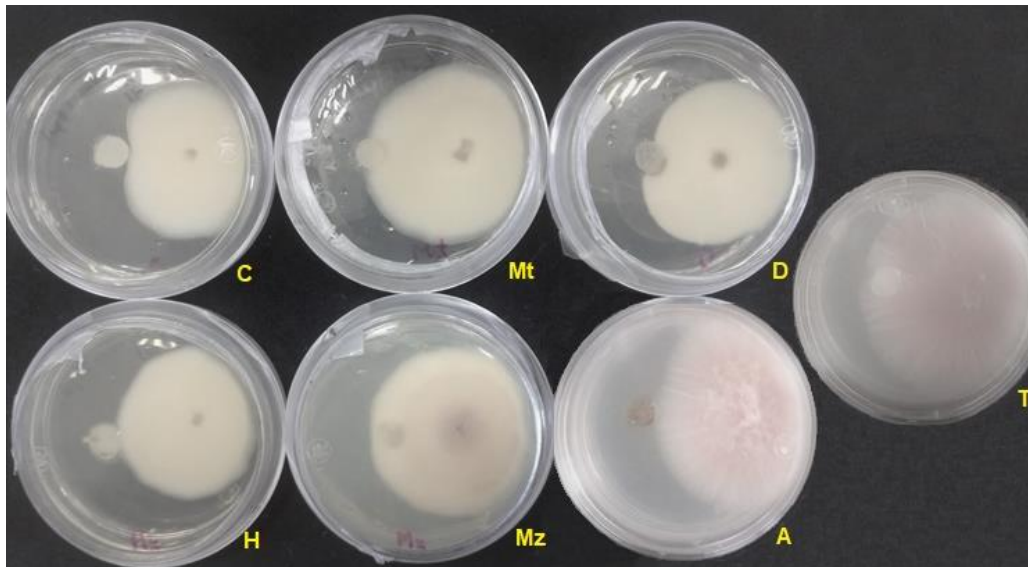
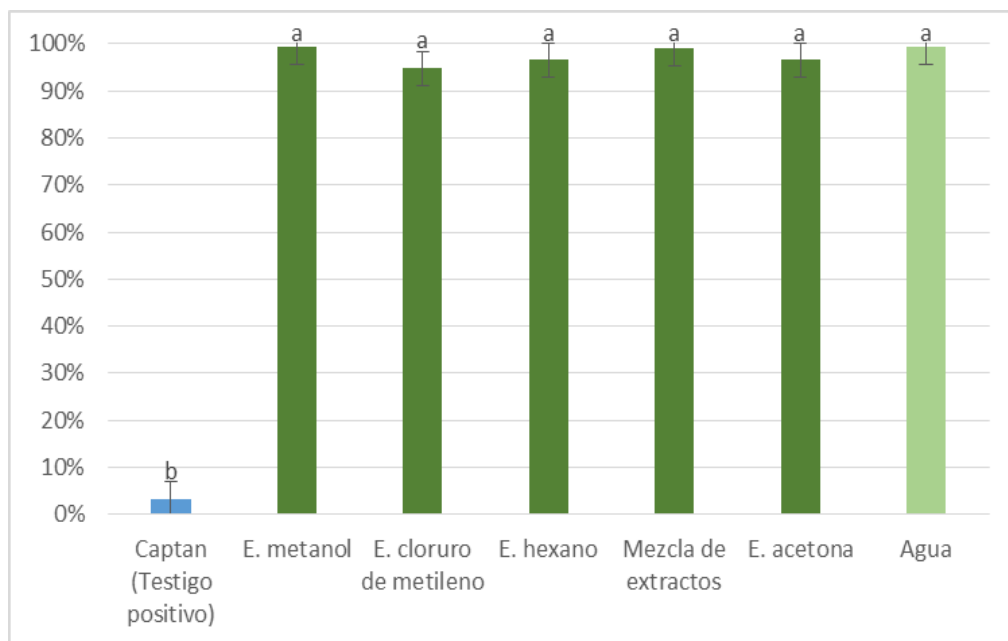


Figura 2.3. Actividad antifúngica de los extractos obtenidos con metanol (Mt), cloruro de metileno (D), hexano (H), acetona (A) y la mezcla de todos los extractos (Mz) (C: Captán; T: Testigo negativo, agua).

Es posible que ninguno de los extractos presentara actividad contra Fol debido a diferentes condiciones ambientales, a la variación genética de las plantas, o a algún fallo o cambio en la metodología. Respecto a este último factor, se puede considerar por ejemplo lo mencionado por Harborne (1984), que al evaporarse un extracto obtenido con etanol (para componentes solubles en agua) casi todos los lípidos y clorofila permanecen a un lado del matraz, pudiéndose recuperar con pipeta únicamente el concentrado acuoso al fondo del matraz. Esta práctica no se realizó en la obtención de los extractos del presente estudio, sino que se redisolviéron y mezclaron los concentrados, mientras que en el estudio de Aderogba *et al.* (2014) no se menciona si estas fracciones fueron separadas o no.

Prueba de germinación de microconidios

Los resultados de la prueba de germinación de microconidios se pueden consultar en el anexo 2.2 y en la siguiente gráfica. No se realizó la prueba de Shaphiro Wilk ni de homogeneidad de varianzas debido al bajo número de repeticiones.



Gráfica 2.1. Promedios de porcentajes de germinación de microconidios a las 36 h de los extractos obtenidos con diferentes disolventes contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3 (“E.”=Extracto obtenido con). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas conforme a la prueba de comparación de medias de Tukey.

En la prueba para determinar el efecto sobre la germinación de microconidios microconidios no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre todos los tratamientos, a excepción del fungicida Captan, el cual inhibió casi por completo la germinación de los microconidios. Nuestros resultados muestran una nula actividad de los extractos sobre la germinación de microconidios de Fol. Esto sugiere que el tipo de inóculo no es la causa de la discrepancia hallada en pruebas anteriores del presente estudio (en las que se trabajó con micelio) respecto a lo reportado por Aderogba *et al.* (2014).

Prueba de Riddell

Los resultados fueron constantes en las tres repeticiones de cada uno de los tratamientos y se resumen en la Gráfica 2.2.

Extracto obtenido con acetona	Extracto obtenido con cloruro de metileno	Acetona, sin extracto (testigo negativo)	Captan (testigo positivo)
Sin inhibición (3/3 repeticiones)	Sin inhibición (3/3 repeticiones)	Sin inhibición (3/3 repeticiones)	<u>Inhibición total</u> (3/3 repeticiones)

Gráfica 2.2. Resultados de la prueba de microcultivo de Riddell modificada contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3 (Fol 3).

Como se puede observar, la técnica de Riddell muestra que ninguno de los extractos tiene actividad antifúngica contra Fol 3.

Los resultados obtenidos en el presente Capítulo y los obtenidos en el Capítulo 1 son congruentes entre sí, confirmando que ningún extracto obtenido de *P. luteoalbum* presentó actividad antifúngica contra el micelio ni sobre la germinación de microconidios de Fol. La ausencia de actividad antifúngica por parte de todos los extractos puede deberse a diferencias ambientales, diferencias genéticas importantes, o algún fallo o cambio en la metodología. Tras realizar tres metodologías diferentes, resulta menos probable que este último factor sea el causante de la discrepancia entre el presente estudio y el de Aderogba *et al.* (2014). También se reduce la probabilidad de que los factores ambientales influyan tanto como para nulificar la actividad antifúngica, pues se han realizado dos cultivos en diferentes tiempos, con suelos

esterilizado, con colonización micorrícica inoculada y con colonización micorrícica natural; aunque aún es posible que la radiación solar o algún otro factor haya afectado este resultado. Las diferencias genéticas del hongo (en el estudio de referencia no se especifica cepa, forma especial o raza de *F. oxysporum*) o de la planta también pueden ser explicativas, sin embargo, la completa nulificación de la actividad antifúngica parece improbable, a menos que las diferencias sean tan grandes que quizás valga la pena estudiar estos ejemplares con mayor detenimiento y posiblemente establecer la presencia de variedades o subespecies en el caso de la planta, o en el caso del hongo identificar la cepa específica con la que trabajaron Aderogba y colaboradores.

Derivado de lo anterior, no hay que descartar un posible error en el estudio de Aderogba *et al.* (2014). En el mismo se menciona que la concentración de acetona al 25% no es tóxica para *F. oxysporum*, sin embargo, lo contrario se demostró en el Capítulo 1. Es posible que los autores realmente no hayan probado los testigos negativos requeridos (sólo acetona, sin extracto), y que la actividad antifúngica observada realmente haya provenido de la toxicidad de la acetona. Esto es probable considerando la evidencia de la toxicidad de la acetona presentada en el capítulo 1, además de que la observación de la disminución en la actividad biológica fue cualitativa, mediante el uso de violeta p-iodonitrotetrazolio, por lo que la comparación más objetiva entre la tonalidad de color es lógico que se haya dado entre celdas adyacentes, referidas a diferentes concentraciones del extracto (diluciones) y por lo tanto del disolvente. La realización de los testigos negativos significaría haber utilizado una placa entera de reactivos e inóculos con resultados casi iguales (se esperarían el crecimiento normal del hongo bajo la premisa de que el disolvente acetona no es tóxico), por lo que es posible que se haya preferido economizar en materiales y tiempos no realizando este procedimiento.

CONCLUSIONES

Las pruebas antifúngicas realizadas en el presente Capítulo mostraron que ningún extracto obtenido de *P. luteoalbum* presentó actividad antifúngica. La ausencia de actividad antifúngica por parte de todos los extractos puede deberse a: Posibles diferencias ambientales, diferencias genéticas importantes, o algún fallo o cambio en las metodologías. Sin embargo, estas posibilidades disminuyen al observarse nula actividad antifúngica, al estudiarse dos ciclos de cultivo diferentes y con al menos tres metodologías diferentes, y al estudiar otros extractos y su mezcla.

LITERATURA CITADA

- Aderogba, M. A., L. J. McGaw, V. P. Bagla, J. N. Eloff y B. M. Abegaz. 2014. In vitro antifungal activity of the acetone extract and two isolated compounds from the weed, *Pseudognaphalium luteoalbum*. South African Journal of Botany 94: 74-78.
- Calderón, G. y J. Rzedowski. 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Comisión Nacional para el Estudio de la Biodiversidad e Instituto de Ecología, Michoacán, México.
- Cuadra, P., J. B. Harborne y P. G. Waterman. 1997. Increases in surface flavonols and photosynthetic pigments in *Gnaphalium luteo-album* in response to UV-B radiation. Phytochemistry 45: 1377-1383.
- Di Modica, G. y S. Tira. 1963. Chromatographic comparison of flavonoid pigments from Inuleae. Annali di Chimica 53: 764-773.
- Eloff, J. N. 1998. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? Journal of Ethnopharmacology 60: 1-8.
- Fernández T., B., I. Inza y J. Guarro. 2003. Comparison of In Vitro Antifungal Susceptibilities of Conidia and Hyphae of Dermatophytes with Thick-Wall Macroconidia | Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Antimicrobial agents and chemotherapy 47: 3371-3372.
- Goli, A. H., M. Barzegar y M. A. Sahari. 2005. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. Food Chemistry 92: 521-525.
- Harborne, J. B. 1984. Phenolic Compounds. En Harborne, J. B. (ed.), Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis, pp. 37-99. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Riddell, R. W. 1950. Permanent Stained Mycological Preparations Obtained by Slide Culture. Mycologia 42: 265-270.
- Roby, M. H. H., M. A. Sarhan, K. A.-H. Selim y K. I. Khalel. 2013. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. Industrial Crops and Products 43: 827-831.
- Saleh, N. A. M., R. M. A. Mansour, Z. A. R. El-Kareemy y A. A. Fayed. 1988. The

chemosystematics of local members of the subtribe gnaphaliinae (Compositae). *Biochemical Systematics and Ecology* 16: 615-617.

Snyder, L. R. 1974. Classification of the solvent properties of common liquids. *Journal of Chromatography A* 92: 223-230.

Steinkellner, S. y R. Mhammerler. 2007. Effect of flavonoids on the development of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of Plant Interactions* 2: 17-23.

Zheng, X., W. Wang, H. Piao, W. Xu, H. Shi y C. Zhao. 2013. The Genus *Gnaphalium* L. (Compositae): Phytochemical and Pharmacological Characteristics. *Molecules* 18: 8298-8318.

CAPÍTULO 3. CONTENIDO DE FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES Y VARIABILIDAD MORFOLÓGICA DE *Pseudognaphalium luteoalbum* EN FUNCIÓN DE SU MICORRIZACIÓN

RESUMEN

Pseudognaphalium luteoalbum (L.) Hilliard & B.L. Burt. es una arvense de origen euroasiático y se encuentra distribuida mundialmente. Aderogba *et al.* (2014) describieron actividad antifúngica del extracto de esta planta contra *Fusarium oxysporum*. La mayor parte de los fitoquímicos cuya presencia ha sido descrita en los extractos de *P. luteoalbum* son flavonoides o ácidos fenólicos. Considerando que la respuesta de las plantas a la micorrización puede variar siendo altamente mutualista o altamente parasítica respecto, se decidió analizar algunas variables morfológicas y fitoquímicas en *P. luteoalbum* con el fin de encontrar posible estrés o mejora de vigor que influya en la calidad del extracto. Se propagaron plantas de *Pseudognaphalium luteoalbum* de origen silvestre y se sometieron a tratamientos con y sin inoculación micorrícica. La calidad del inoculante se evaluó realizando el conteo de esporas en el sustrato donde yacían las raíces de las plantas trampa. Se midió la colonización micorrícica al momento de la cosecha. Se midieron variables morfológicas de *P. luteoalbum* como altura de la planta, diámetro de cobertura y número de hojas, y se obtuvieron los extractos con metanol para cuantificar el contenido de flavonoides y fenoles totales mediante métodos colorimétricos y la posible variación de algunos flavonoides específicos mediante HPLC. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las variables altura, días necesarios para la fructificación, materia seca de la parte aérea, "altura compuesta" y número de cabezuelas para la colonización micorrícica, indicando un posible estrés en la planta debido a la inoculación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de fenoles (1.7 mg/g de materia seca) ni flavonoides (0.6 mg/g de materia seca) totales. Un mejor desarrollo de la planta mostró una mayor cantidad de metabolitos secundarios por planta debido a su mayor crecimiento, por lo que se sugiere cultivar a la planta en condiciones favorables.

INTRODUCCIÓN

Pseudognaphalium luteoalbum es una arvense de origen eurasiático que se encuentra distribuida mundialmente (Calderón y Rzedowski, 2005:841). Su origen ruderal podría facilitar su cultivo, sin necesidad de agroquímicos. Aderogba *et al.*, (2014) describieron actividad antifúngica del extracto obtenido con acetona contra *Fusarium oxysporum* y otros hongos. Sin embargo, información generada en nuestro país (Capítulos 1 y 2) demuestra lo contrario.

Se ha observado que el disolvente del cual se obtiene mayor rendimiento de extracto (30.1 mg/g de materia seca) es el metanol, con un incremento de más de 200% comparado con la acetona. Además, la mayor parte de los fitoquímicos cuya presencia ha sido descrita en *P. luteoalbum* son flavonoides o ácidos fenólicos (Di Modica y Tira (1963), Mericli y Eczacilik (1980) citados por Zheng *et al.* (2013), Saleh *et al.* (1988), Cuadra, Harborne y Waterman (1997) y Aderogba *et al.* (2014)), y éstos suelen ser más abundantes en los extractos obtenidos con metanol (Goli, Barzegar y Sahari (2005), Roby *et al.* (2013)). También Benites *et al.* (2014) mencionaron que el extracto metanólico permite identificar metabolitos de polaridad variada como esteroides, alcaloides, flavonoides y taninos. Por lo tanto, el extracto obtenido con metanol fue elegido para la realización de las pruebas fitoquímicas.

Klironomos (2003) describió que la respuesta de las plantas a la micorrización puede variar desde altamente mutualista hasta ser altamente parasítica respecto a su crecimiento, por lo que se decidió analizar algunas variables morfológicas en *P. luteoalbum* con el fin de encontrar posible estrés o mejora de vigor debido a la inoculación micorrícica. También se decidió analizar variables fitoquímicas, con el fin de encontrar posibles cambios que pudieran explicar los resultados contradictorios de la actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum* cuando existe algún factor de estrés, fenómeno que ha sido reportado en numerosos estudios con otras especies vegetales (Bennett y Wallsgrove, 1994; Bettoni *et al.*, 2014; Sbrana, Avio y Giovannetti, 2014; Gerlach *et al.*, 2015; Haghghi, Mozafariyan y Abdolahipour, 2015; entre otros).

Por lo tanto se estableció como objetivo medir algunas variables morfológicas de *P. luteoalbum* como altura de la planta, diámetro de cobertura y número de hojas, y se obtuvieron los extractos con metanol para cuantificar el contenido de flavonoides y fenoles totales mediante métodos colorimétricos y algunos flavonoides específicos mediante HPLC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se esterilizó sustrato con composición en volumen de 70% tezontle y 30% suelo en un tambo cerrado para esterilización con vapor durante 6 h.



Figura 3.1. Tambo empleado para la esterilización del sustrato

El día lunes 28 de mayo del 2018 se sembraron alrededor de 400 semillas de una planta del ciclo anterior (Capítulo 2) en 40 bolsas de 30 x 30 cm con 2.5 L de sustrato esterilizado. Se regó a capacidad de campo y a las bolsas se les realizaron 5 perforaciones para eliminar el exceso de agua. En cada bolsa se hizo un canal con forma de U, donde se depositaron al menos 10 semillas, distribuyéndolas. Después las plantas fueron regadas con aspersor dos o tres veces al día y cubriendo con costales en los momentos del día con mayor radiación solar. Después de 4 días la mayoría de las semillas germinaron y emergieron. Posteriormente se realizaron los primeros riegos con recipiente, procurando que no cayera el agua sobre las plántulas debido a su fragilidad.

El 14 de julio del 2018 se inoculó con 20 g de inóculo de *R. irregularis* a 20 de las 40 plantas, correspondientes al tratamiento con inoculación con HMA (I). Para ello a aproximadamente 2-3 centímetros del tallo se realizó un orificio de aproximadamente 5 cm de profundidad con un abatelenguas donde se colocaron 20 g de inóculo y se retiró el abatelenguas para cubrir nuevamente el orificio. Para las plantas correspondientes al tratamiento sin inoculación (NI) también se realizó

un orificio, pero no se agregó inóculo.



Figura 3.2. Germinación de *P. luteoalbum* directamente en el sustrato (70:30 v/v, tezontle: suelo agrícola).

Después de la inoculación, se realizó el riego a capacidad de campo cada 2 a 4 días según las condiciones ambientales. Se realizó el deshierbe de las plantas durante su crecimiento.

Se registró el día de fructificación de cada planta. Un día antes de la cosecha se evaluaron las siguientes variables: Altura, número y altura de las ramas, número de cabezuelas por rama, diámetro de cobertura promedio y número de hojas. La “altura compuesta” se consideró una variable más como un indicador del crecimiento de la planta, y consiste de la suma de la altura de todas las ramas. Si bien se contó el número de hojas, la cobertura promedio y la materia seca como indicadores del crecimiento, éste indicador parece ser muy bueno para medir el crecimiento ligado al bienestar de esta planta y podría aplicarse a plantas no etioladas de la especie o quizás incluso del mismo género.

Las plantas se cosecharon a los 78 días de la siembra, cuando el último individuo floreció, cortando la parte aérea a la altura del tallo, se pesó cada planta y se colocó en un horno de aire forzado marca Blue M a 45 ° C. Una vez alcanzado un peso constante, se volvieron a pesar las plantas para obtener sus materias secas. Se trituraron finamente en molino y cada repetición (dos plantas) se colocó en frascos de 200 mL donde añadió acetona hasta cubrir el material. La mezcla se agitó, se dejó reposar un día, se agitó nuevamente y se dejó reposar otro día. Los extractos se decantaron y se filtraron con papel filtro de poro grueso. Posteriormente se concentraron en rotaevaporador a 45° C y a un máximo de 40 mmHg, y se colocaron en frascos ámbar previamente

pesados para determinar su rendimiento.



Figura 3.3. Eliminación de disolvente de extracto de *P. luteaalbum* mediante rotavapor

Cuantificación de algunos compuestos mediante HPLC

Los extractos fueron se pasaron por un filtro acrodisco, con membrana de politetrafluoroetileno (PTF) y tamaño del poro de 0.45 μm antes de ser procesados por medio de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés): El análisis de flavonoides sé realizó con una columna Hewlett Packard Hypersil ODS (125x40 mm) con un gradiente de H_2O a un pH de 2.5 con ácido trifluoroacético y acetonitrilo, y los siguientes parámetros: flujo, 1 mL/min; temperatura, 30° C; volumen de inyección, 20 μL ; y tiempo de análisis, 25 min.

Los estándares utilizados fueron rutina, florizina, miricetina, naringenina, quercetina, floretina y galangina.

Cuantificación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se llevó a cabo por medio del procedimiento de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton, Orthofer, y Lamuela-Raventós (1999) modificado. Para ello se depositaron en tubos de ensayo alícuotas por duplicado de 0 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 μL

de ácido gálico a una concentración de $0.024 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se aforaron con agua destilada a $500 \mu\text{L}$. Posteriormente se agregaron $25 \mu\text{L}$ del reactivo Folin-Ciocalteu 1:1 (v/v) y $975 \mu\text{L}$ de una solución de carbonato de sodio a 2.5%. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante una h y se cuantificó la absorbancia del contenido de estos tubos de ensayo en espectrofotómetro a 740 nm , utilizando el tubo sin ácido gálico como blanco. Se llevó a cabo una regresión lineal simple con la que fue posible inferir a partir de una absorbancia determinada la cantidad de fenoles totales en una muestra por comparación a las cantidades conocidas de ácido gálico.

Por otro lado, en otros tubos de ensayo se colocaron $10 \mu\text{L}$ de cada extracto a una concentración de $50 \text{ mg}/\text{mL}$ (10 extractos para cada uno de los dos tratamientos, con y sin inoculación), y cada uno se aforó a $500 \mu\text{L}$ (con $490 \mu\text{L}$ de agua). Posteriormente se agregaron $25 \mu\text{L}$ del reactivo Folin-Ciocalteu 1:1 (v/v) y $975 \mu\text{L}$ de una solución de carbonato de sodio a 2.5%. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante una hora y se leyó la absorbancia a 740 nm . Los datos de absorbancia obtenidos se transformaron a microgramos de compuestos fenólicos mediante la ecuación obtenida previamente.

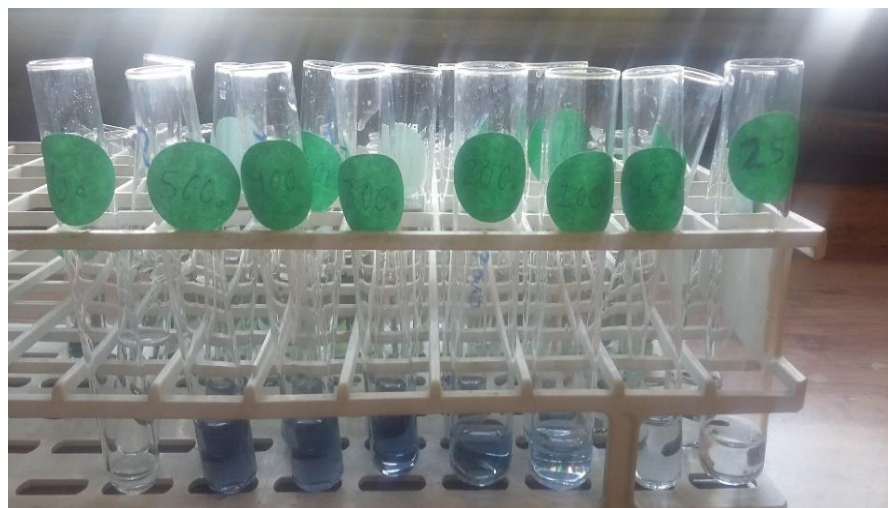


Figura 3.4. Curva de calibración con cantidades conocidas ácido galico para la estimación de compuestos fenólicos en muestras de campo.

Cuantificación de flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides totales se llevó a cabo por medio del procedimiento colorimétrico con cloruro de aluminio propuesto por Chang *et al.* (2002) con modificaciones. Para ello se depositaron en tubos de ensayo alícuotas por duplicado de 0, 25, 50, 125, 200, 300,

400 y 500 μL de quercetina a una concentración de 0.024 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se aforaron con metanol a 80% a 500 μL . Posteriormente se agregaron 100 μL del reactivo cloruro de aluminio al 10% y 100 μL de una solución acetato de potasio 1 M. Se aforó con 300 μL a 1 mL y se agregaron 4 mL más de agua destilada mediante pipeta graduada. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 40 min y se cuantificó la absorbancia del contenido de estos tubos de ensayo en espectrofotómetro a 415 nm, utilizando el tubo sin quercetina como blanco. Se llevó a cabo una regresión lineal simple con la que fue posible inferir a partir de una absorbancia determinada la cantidad de flavonoides totales en una muestra por comparación a las cantidades conocidas de quercetina.

Por otro lado, en otros tubos de ensayo se colocaron 10 μL de cada extracto a una concentración de 50 mg/mL (10 extractos para cada uno de los dos tratamientos, con y sin inoculación micorrícica), y cada uno se aforó a 500 μL (con 490 μL de metanol a 80%). Posteriormente se agregaron 100 μL del reactivo cloruro de aluminio a 10% y 100 μL de una solución acetato de potasio 1 M. Se aforó con 300 μL a 1 mL y se agregaron 4 mL más de agua destilada mediante pipeta graduada. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 40 min y se leyó la absorbancia a 415 nm. Los datos de absorbancia obtenidos se transformaron a microgramos de flavonoides mediante la ecuación obtenida previamente.

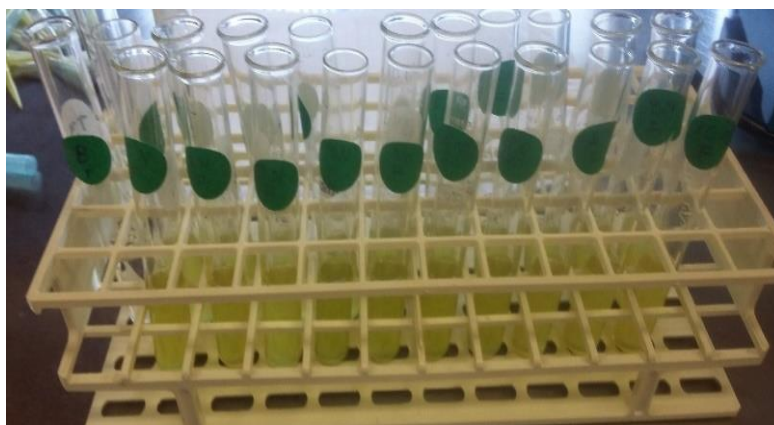


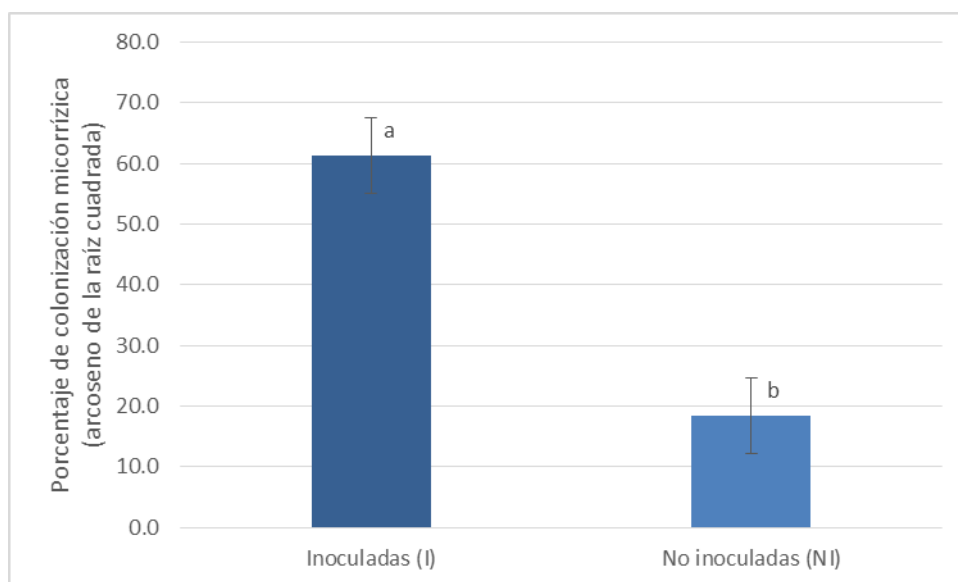
Figura 3.5. Curva de calibración con cantidades conocidas de quercetina para la estimación de flavonoides en muestras de campo

A los datos se le aplicarán las pruebas de homogeneidad de varianzas conforme a la prueba de Levene y de normalidad de Shaphiro-Wilks, para posteriormente ejecutar el análisis de varianza de una vía y finalmente la comparación de medias de Tukey

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comprobación de la colonización micorrícica

Los datos obtenidos para la comprobación de la colonización micorrícica se resumen en el Anexo 3.1. Los datos obtenidos muestran homogeneidad de varianzas conforme a la prueba de Levene, sin embargo no presentan una distribución normal conforme a la prueba de Shapiro-Wilks. Debido a esto los datos se transformaron por medio del arcoseno de su raíz cuadrada antes de realizar el análisis de varianza. La comparación de las medias se representa en la Gráfica 3.1.



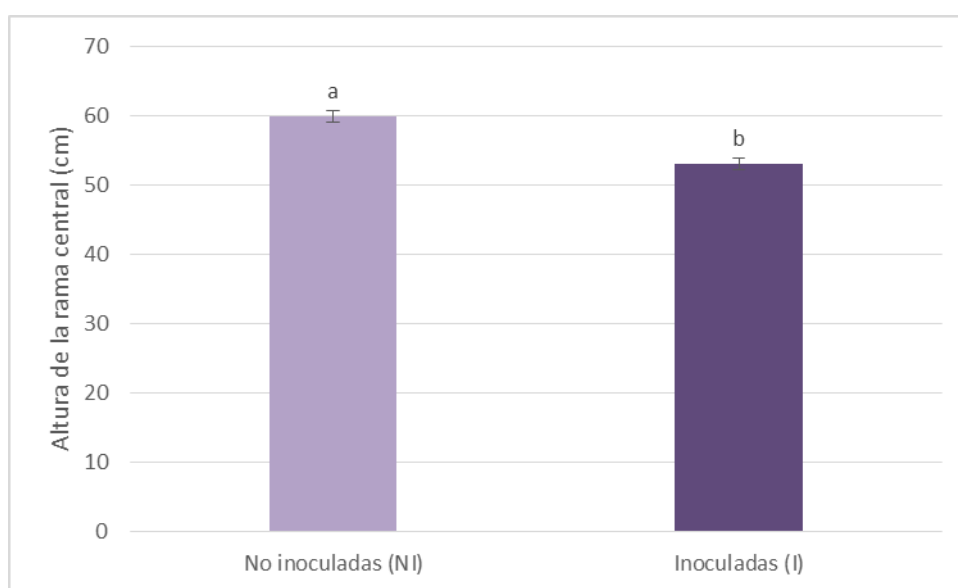
Gráfica 3.1. Porcentaje promedio de colonización micorrícica para los tratamientos con (I) y sin inoculación micorrícica (NI). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas conforme a la prueba de comparación de medias de Tukey.

La comparación de las medias de Tukey nos indica que las diferencias de porcentajes de colonización micorrícica son estadísticamente significativas. Es evidente que la gran diferencia entre las medias (58.7 %) se debe a la previa esterilización del sustrato pero también a la inoculación abundante del tratamiento con inoculación con HMA (I). En teoría, no debió producirse micorrización en ninguna planta del tratamiento sin micorrización (N), pero es posible que algunas esporas hayan sobrevivido a la esterilización o la entrada de propágulos micorrícicos por vía aérea.

Variables morfológicas

Altura

La altura del tallo o rama central coincidió en todos los casos con la altura de la parte aérea de la planta, ya que ésta es la primera en desarrollarse. Los datos obtenidos para la altura se resumen en el Anexo 3.2. Los datos muestran homogeneidad de varianzas conforme a la prueba de Levene y una distribución normal conforme a la prueba de Shapiro-Wilk. La comparación de medias se muestra en la Gráfica 3.2.

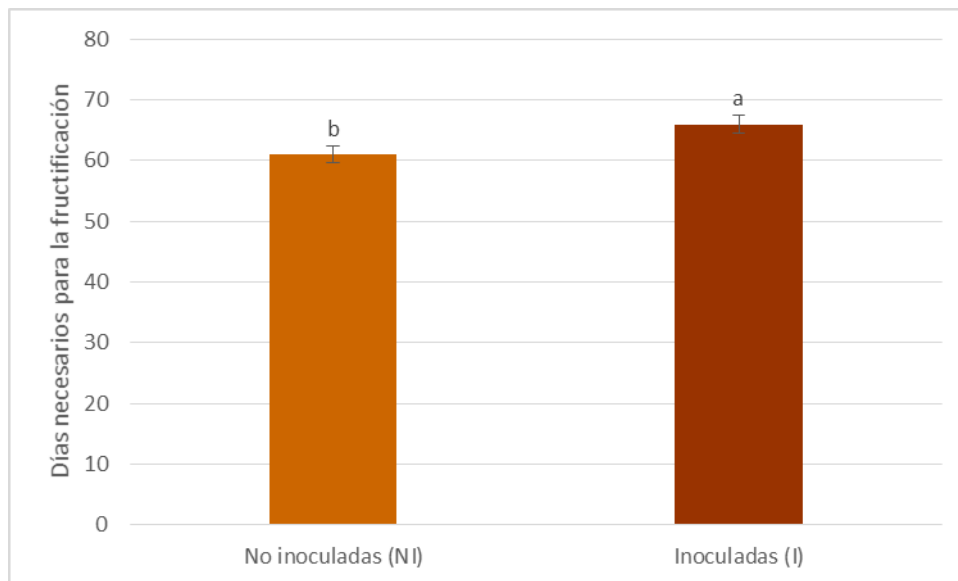


Gráfica 3.2. Altura promedio de la rama central para los tratamientos con (I) y sin inoculación (NI). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas conforme a la prueba de comparación de medias de Tukey.

La comparación de las medias de Tukey nos indica que las diferencias de altura de la rama central o altura general de la parte aérea de la planta son estadísticamente significativas. El menor crecimiento de las plantas inoculadas podría interpretarse como un ligero estrés debido a una condición de mayor micorrización.

Días necesarios para la fructificación

Se llevó un registro del día en el que fructificó la primera inflorescencia de cada planta para calcular el tiempo necesario para fructificación desde la siembra. Los datos obtenidos para la altura se resumen en el Anexo 3.2. Los datos muestran homogeneidad de varianzas conforme a la prueba de Levene y una distribución normal conforme a la prueba de Shapiro-Wilk. La comparación de medias se muestra en la Gráfica 3.3.



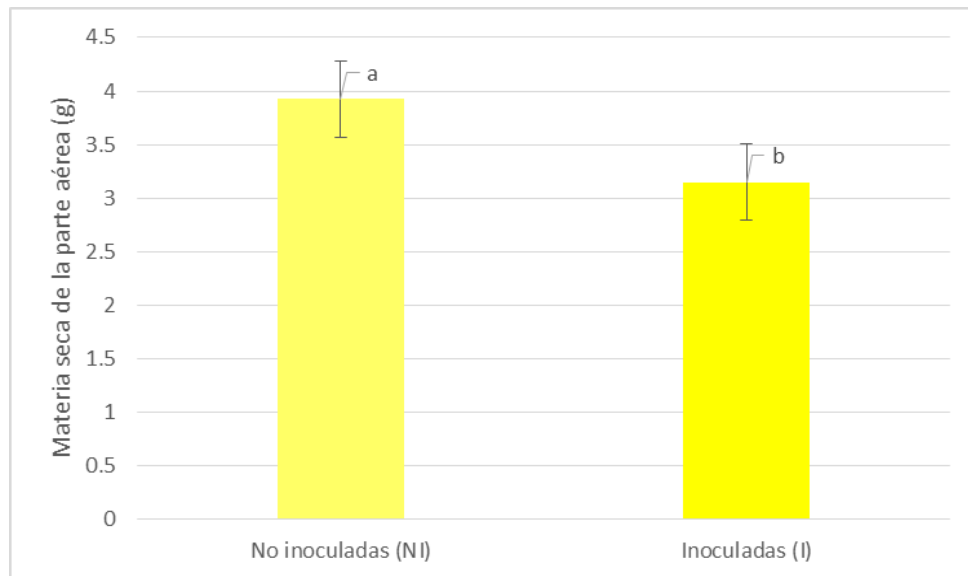
Gráfica 3.3. Promedios de días transcurridos desde la siembra hasta la fructificación de la primera inflorescencia de cada planta, para los tratamientos con (I) e inoculación (NI). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas conforme a la prueba de comparación de medias de Tukey

La comparación de las medias de Tukey nos indica que las diferencias en el tiempo de fructificación de las plantas son estadísticamente significativas. El retraso en la fructificación en las plantas inoculadas podría interpretarse como un ligero estrés debido a esta condición de mayor micorrización.

Materia seca de la parte aérea

Los datos obtenidos para materia seca de la parte aérea se resumen en el Anexo 3.2. Los datos muestran homogeneidad de varianzas conforme a la prueba de Levene y una distribución normal

conforme a la prueba de Shapiro-Wilk. La comparación de medias se muestra en la Gráfica 3.4.

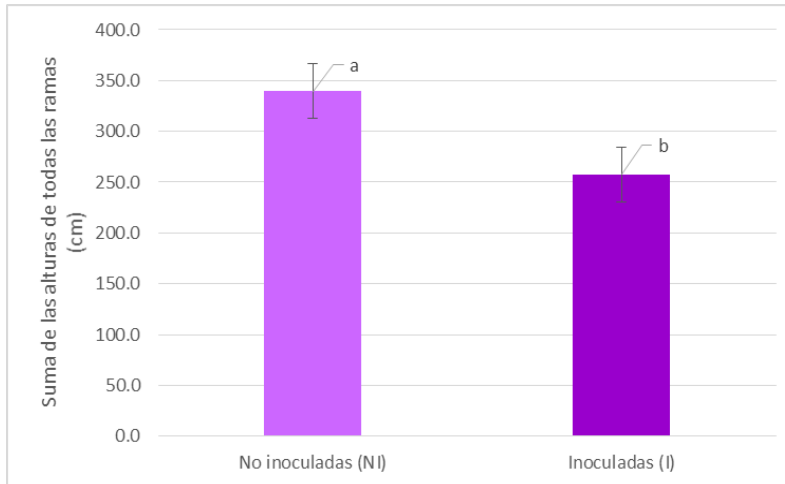


Gráfica 3.4. Promedios de materia seca para los tratamientos con (I) y sin inoculación (NI). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas conforme a la prueba de comparación de medias de Tukey.

La comparación de las medias de Tukey nos indica que las diferencias entre las materias secas de la parte aérea en los tratamientos son estadísticamente significativas. La disminución de las materias secas en las plantas inoculadas podría interpretarse como un ligero estrés debido a las demandas energéticas de la simbiosis.

“Altura compuesta”

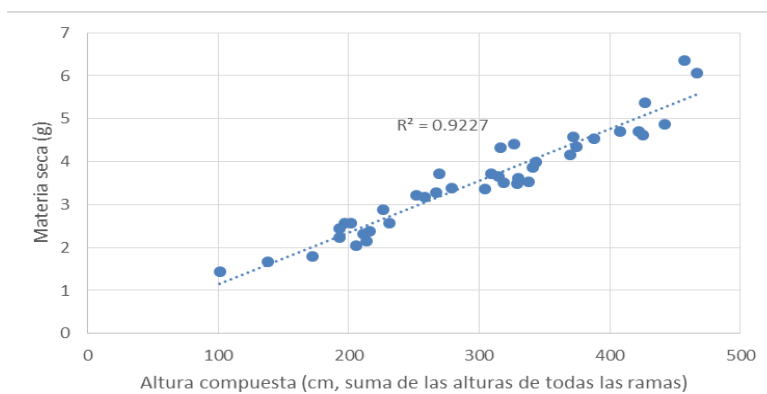
Los datos obtenidos para altura compuesta se resumen en el Anexo 3.2. Los datos muestran homogeneidad de varianzas conforme a la prueba de Levene y una distribución normal conforme a la prueba de Shapiro-Wilk. La comparación de medias se muestra en la Gráfica 3.5.



Gráfica 3.5. Promedios de “altura compuesta” para los tratamientos con (I) y sin inoculación (NI). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas conforme a la prueba de comparación de medias de Tukey

La comparación de las medias de Tukey nos indica que las diferencias entre las alturas compuestas son estadísticamente significativas. La disminución de la altura compuesta en las plantas inoculadas podría interpretarse como un ligero estrés debido a esta condición de mayor micorrización.

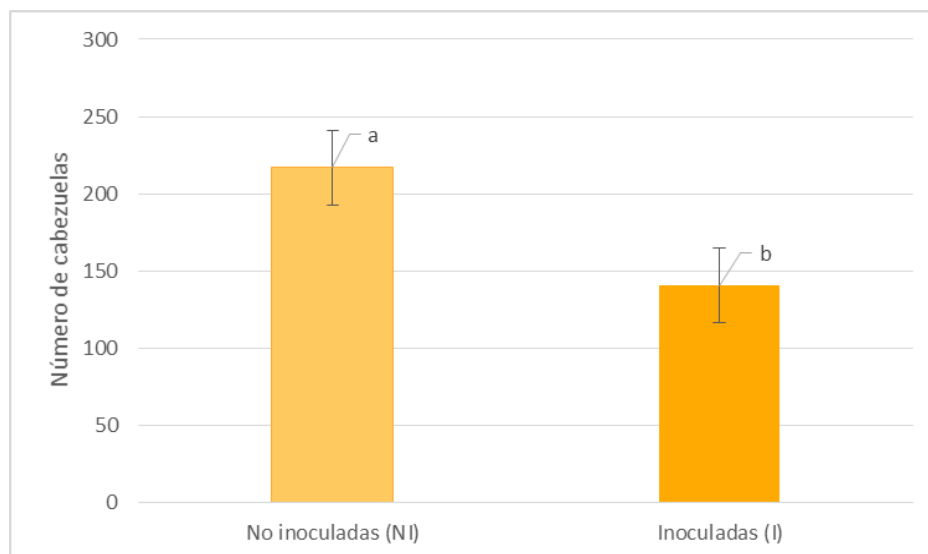
Se encontró que la altura compuesta tiene un coeficiente de correlación de 0.96 respecto a la materia seca de la parte aérea ($R^2=0.92$). De este modo, fue la variable morfológica con mejor correlación en relación a la materia seca, y cabe señalar que el coeficiente de correlación para la materia fresca fue de 0.97, pero ésta medición es destructiva para la parte aérea. El diagrama de dispersión se presenta a continuación.



Gráfica 3.6. Diagrama de dispersión que muestra la correlación entre la materia seca de la parte aérea en gramos y la suma de las alturas de todas las ramas en centímetros (“altura compuesta”). El coeficiente de correlación de Pearson fue de 0.96.

Cabezuelas totales

Los datos obtenidos para el número total de cabezuelas por planta se resumen en el Anexo 3.2. Los datos muestran homogeneidad de varianzas conforme a la prueba de Levene y una distribución normal conforme a la prueba de Shapiro-Wilk. La comparación de medias se muestra en la Gráfica 3.7.

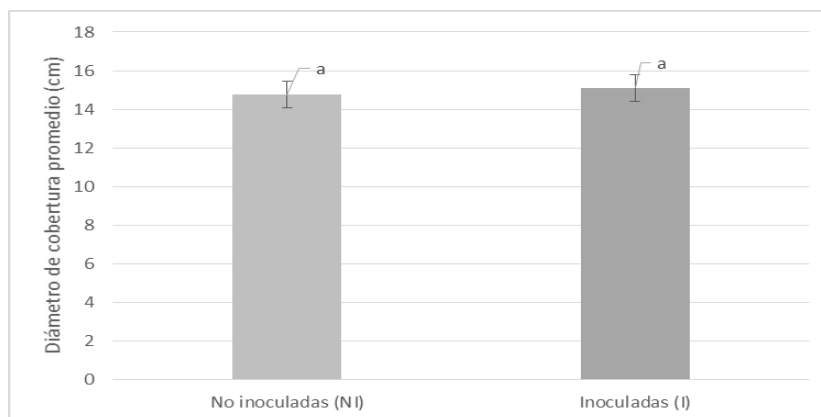


Gráfica 3.7. Promedios de número de cabezuelas por planta para los tratamientos con (I) y sin inoculación (NI). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas conforme a la prueba de comparación de medias de Tukey.

La comparación de las medias de Tukey nos indica que las diferencias entre la cantidad de cabezuelas por planta son estadísticamente significativas. La disminución del número de cabezuelas por planta en las plantas inoculadas podría interpretarse como un estrés debido a esta condición de mayor micorrización, o bien puede ser otra manera de interpretar el retraso en su desarrollo.

Diámetro de cobertura

Los datos obtenidos para diámetro de cobertura se resumen en el Anexo 3.2. Los datos muestran homogeneidad de varianzas conforme a la prueba de Levene y una distribución normal conforme a la prueba de Shapiro-Wilk. La comparación de medias se muestra en la Gráfica 3.8.

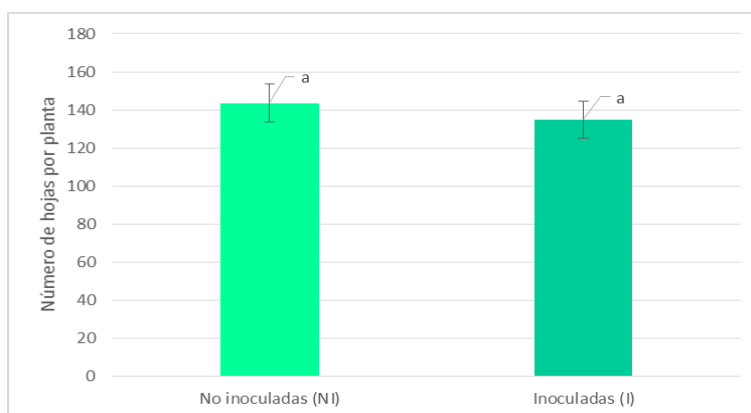


Gráfica 3.8. Promedios de diámetros de cobertura para los tratamientos con (I) y sin inoculación (N). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas conforme a la prueba de comparación de medias de Tukey.

La comparación de las medias de Tukey nos indica que las diferencias entre los diámetros de cobertura no son estadísticamente significativas. Es posible que el diámetro de cobertura no sea un buen indicador del desarrollo de la planta, ya que este indicador generalmente es constante, sin importar el número de ramas o la altura de éstas.

Número de hojas

Los datos obtenidos para el número de hojas por planta se resumen en el Anexo 3.2. Los datos muestran homogeneidad de varianzas conforme a la prueba de Levene y una distribución normal conforme a la prueba de Shapiro-Wilk. La comparación de medias se muestra en la Gráfica 3.9.

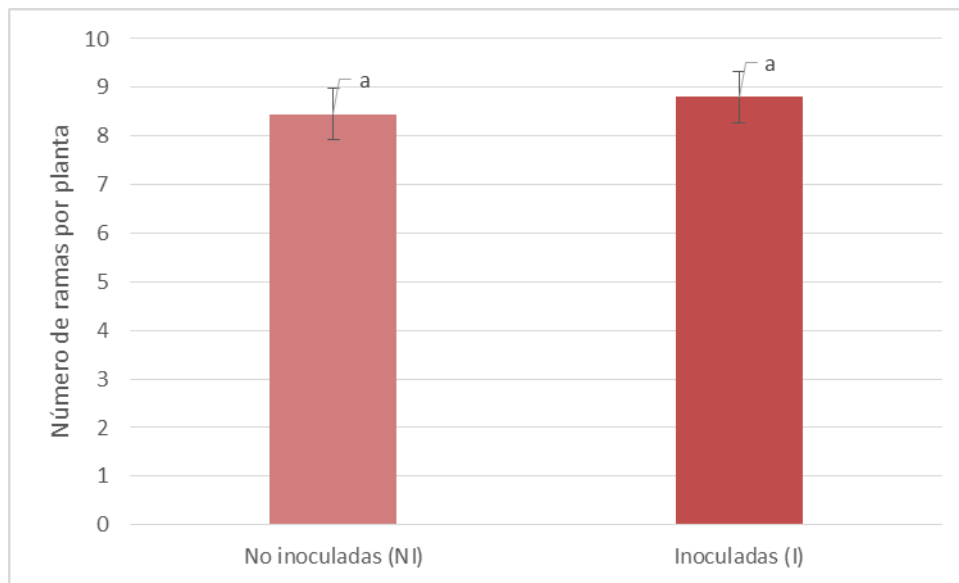


Gráfica 3.9. Promedios de número de hojas por planta para los tratamientos con (I) y sin inoculación (NI). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas conforme a la prueba de comparación de medias de Tukey.

La comparación de las medias de Tukey nos indica que las diferencias entre los números de hojas por planta no son estadísticamente significativas. Es posible que el número de hojas no sea un buen indicador del desarrollo de la planta, ya que este indicador no considera el tamaño de las hojas ni el número de hojas muertas; además, implica un mayor tiempo de trabajo para su obtención.

Número de ramas

Los datos obtenidos para el número de ramas por planta se resumen en el Anexo 3.2. Los datos muestran homogeneidad de varianzas conforme a la prueba de Levene y una distribución normal conforme a la prueba de Shapiro-Wilk. La comparación de medias se muestra en la Gráfica 3.10.



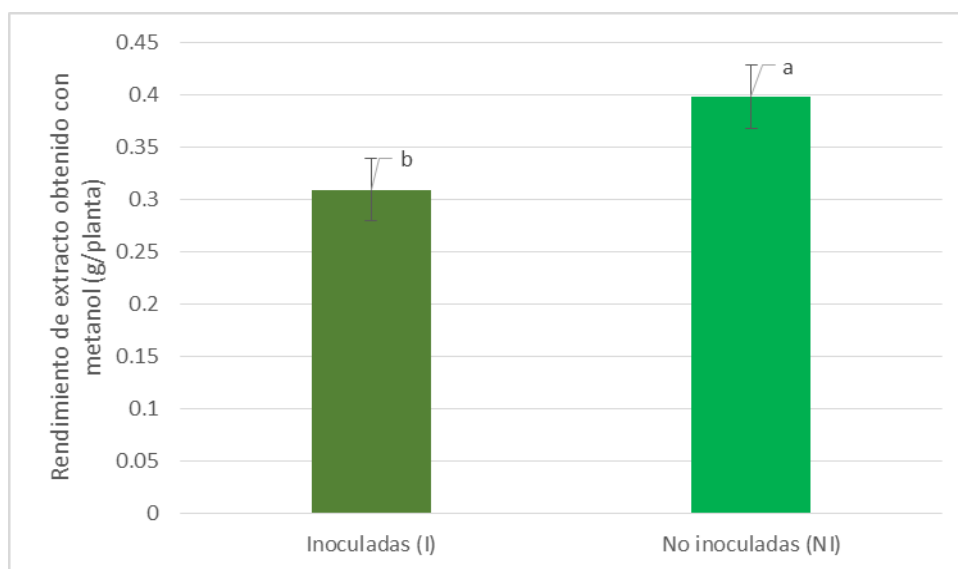
Gráfica 3.10. Promedios de número de ramas por planta para los tratamientos con (I) y sin inoculación (NI). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas conforme a la prueba de comparación de medias de Tukey

La comparación de las medias de Tukey nos indica que las diferencias entre los números de ramas por planta no son estadísticamente significativas. Es posible que el número de hojas no sea un buen indicador del desarrollo de la planta, ya que este indicador no considera el tamaño o altura de las ramas.

Variables fitoquímicas (parte aérea)

Rendimiento del extracto

Los datos obtenidos para el rendimiento del extracto se encuentran en el Anexo 3.3 y fueron obtenidos mediante el pesado diferencial de los frascos vacíos y con el extracto crudo de dos plantas, dividido entre dos para obtener el rendimiento estimado por planta. Los datos muestran homogeneidad de varianzas conforme a la prueba de Levene y una distribución normal conforme a la prueba de Shapiro-Wilk. La comparación de medias se muestra en la Gráfica 3.11.



Gráfica 3.11. Rendimiento de extracto promedio para los tratamientos con (I) y sin inoculación (NI). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas conforme a la prueba de comparación de medias de Tukey

La comparación de las medias de Tukey nos indica que las diferencias entre los rendimientos de extracto por planta son estadísticamente significativas; probablemente esto obedezca a que las plantas inoculadas mostraron tener un menor crecimiento (materia seca, altura) que las no inoculadas. De ser así, la concentración de extracto por gramo de materia seca sería similar en ambos tratamientos.

Cuantificación de fenoles totales

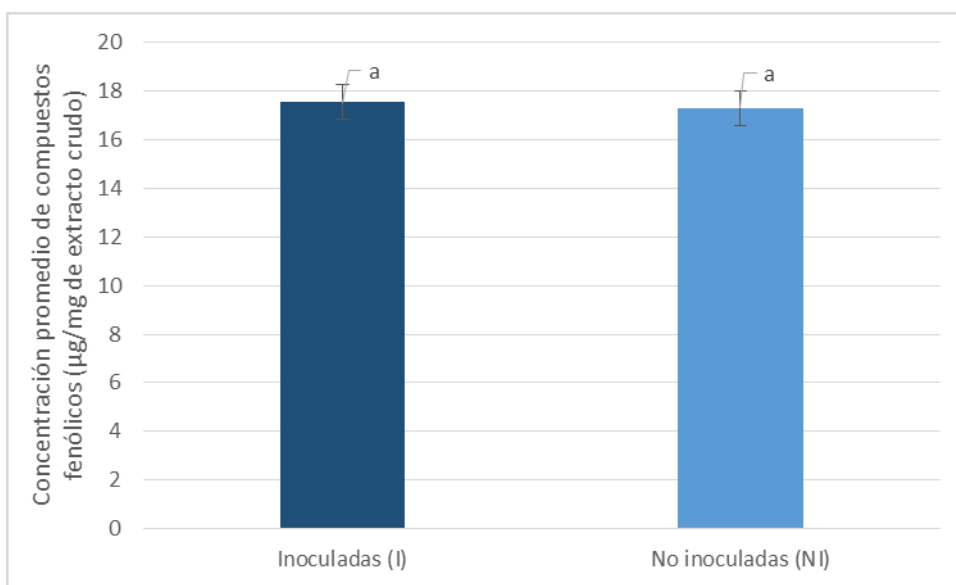
La curva obtenida para la cuantificación de compuestos fenólicos totales se presenta en el Anexo 3.4, junto con la ecuación utilizada, donde “y” es la absorbancia a 740 nm y “x” es la cantidad de ácido gálico presente en cada repetición, resultante de multiplicar la alícuota

empleada por la concentración de 0.024 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Mediante el despeje de “x”, se conoció la concentración de fenoles totales para una determinada cantidad de extracto obtenido con metanol (10 μl de extracto a una concentración de 50 mg/ml). Esta cantidad se multiplicó por 100 (veces que caben 10 μl en 1 ml) y se dividió entre 50 (mg que habían en 1 ml) para obtener la cantidad de compuestos fenólicos que hay en cada mg de extracto crudo. Este último dato puede extrapolarse al total de la planta, y posteriormente se puede obtener la concentración de compuestos fenólicos por gramo de materia seca.

Concentración en relación al extracto crudo

Los datos de compuestos fenólicos por mg de extracto crudo se encuentran en el Anexo 3.3 y muestran homogeneidad de varianzas conforme a la prueba de Levene y una distribución normal conforme a la prueba de Shapiro-Wilk. La comparación de medias se presenta en la Gráfica 3.12.

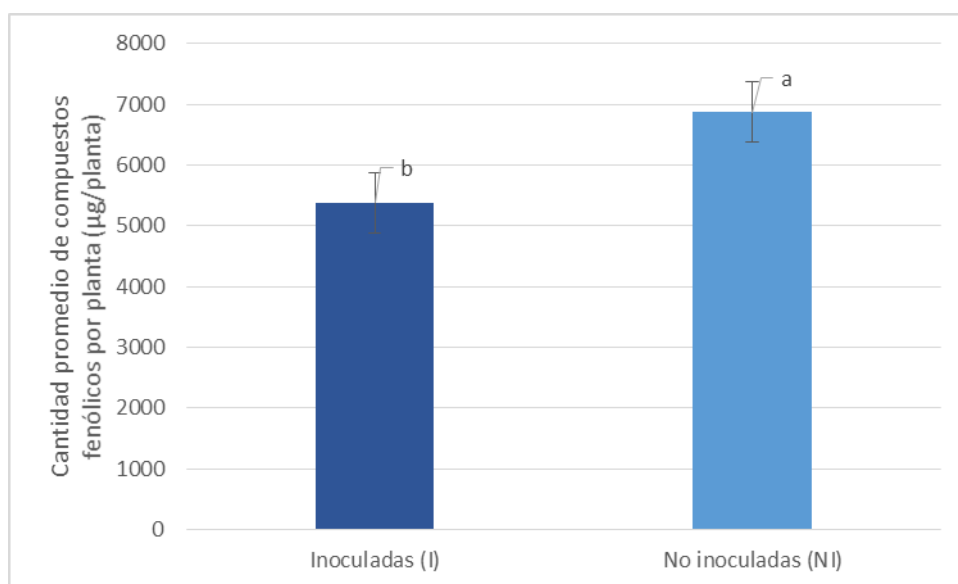


Gráfica 3.12. Concentración promedio de compuestos fenólicos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto crudo) para los tratamientos con (I) y sin inoculación (N). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas conforme a la prueba de comparación de medias de Tukey

La comparación de las medias de Tukey nos indica que las diferencias entre las concentraciones de compuestos fenólicos por miligramo de extracto crudo no son estadísticamente significativas. Probablemente esto obedezca a que la composición química sea similar en ambos casos o bien que sean diferentes pero algunos compuestos fenólicos incrementan mientras otros disminuyen su concentración.

Cantidad por planta

Los datos calculados para la cantidad de compuestos fenólicos por planta se obtienen multiplicando el rendimiento del extracto en miligramos (promedio por pares de plantas) por la concentración de compuestos fenólicos por miligramo de extracto. Estos datos se encuentran en el anexo 3.3 y muestran homogeneidad de varianzas conforme a la prueba de Levene y una distribución normal conforme a la prueba de Shapiro-Wilk. La comparación de medias se presenta en la Gráfica 3.13.



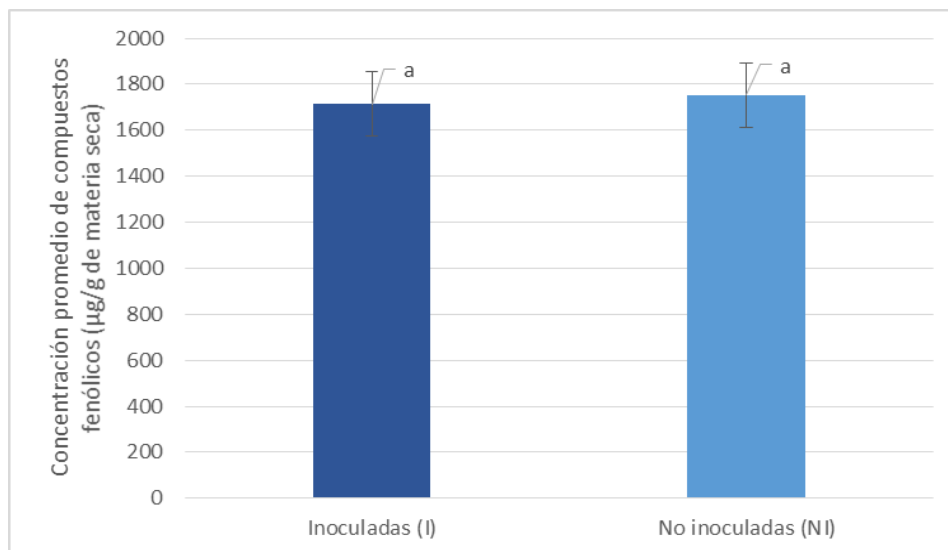
Gráfica 3.13. Cantidad promedio de compuestos fenólicos por planta ($\mu\text{g/planta}$) para los tratamientos con (I) y sin inoculación (NI). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas conforme a la prueba de comparación de medias de Tukey

La comparación de las medias de Tukey nos indica que las diferencias entre las cantidades de compuestos fenólicos por planta son estadísticamente significativas. Es fácil observar que la cantidad de compuestos fenólicos en una planta es mayor en las plantas no inoculadas ya que éstas presentaron una mayor cantidad de materia seca y de rendimiento de extracto.

Concentración en relación a la materia seca

Los datos calculados para concentración de compuestos fenólicos en relación a la materia seca se obtienen dividiendo la cantidad de compuestos fenólicos por planta entre la materia seca (promedio por pares de plantas). Estos datos se encuentran en el anexo 3.3 y muestran

homogeneidad de varianzas conforme a la prueba de Levene y una distribución normal conforme a la prueba de Shapiro-Wilk. La comparación de medias se presenta en la Gráfica 3.14.



Gráfica 3.14. Concentración promedio de compuestos fenólicos ($\mu\text{g/g}$ de materia seca) para los tratamientos con (I) y sin inoculación (NI). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas conforme a la prueba de comparación de medias de Tukey.

La comparación de las medias de Tukey nos indica que las diferencias entre las concentraciones de compuestos fenólicos por gramo de materia seca no son estadísticamente significativas. La concentración de compuestos fenólicos por gramo de materia seca no presenta diferencias entre tratamientos, puesto que si bien la cantidad por planta era mayor en las no inoculadas, en este tratamiento también hubo mayor cantidad de materia seca. Es decir, que aparentemente la materia seca, el rendimiento del extracto y la cantidad de compuestos fenólicos son variables directamente proporcionales sin importar el tratamiento, lo que significa que la concentración de compuestos fenólicos es igual tanto en relación al extracto crudo como en relación a la materia seca.

En cuanto a los niveles obtenidos de compuestos fenólicos, estos resultan bajos en comparación con otras plantas como *Borago officinalis*, *Taraxacum officinale*, *Plantago coronopus* o *Moringa peregrina* cuya concentración de compuestos fenólicos totales fue equivalente a 5.38, 27.23, 36.71 y 45.9 mg/g de materia seca respectivamente (Gatto *et al.*, 2011; Al Juhaimi *et al.*, 2017). Las concentraciones de compuestos fenólicos respecto al extracto también resultan bajas en comparación con la obtenida para la misma especie (*P. luteoalbum*), pero en Bangladesh, donde se encontraron el equivalente a 115.96 $\mu\text{g}/(\text{mg}$ de extracto crudo)

(Uddin *et al.*, 2017) contra los 17.4 $\mu\text{g}/(\text{mg}$ de extracto crudo) cuantificados en el presente estudio. Las diferencias genéticas y las condiciones ambientales (posiblemente la radiación solar) podrían explicar estas diferencias.

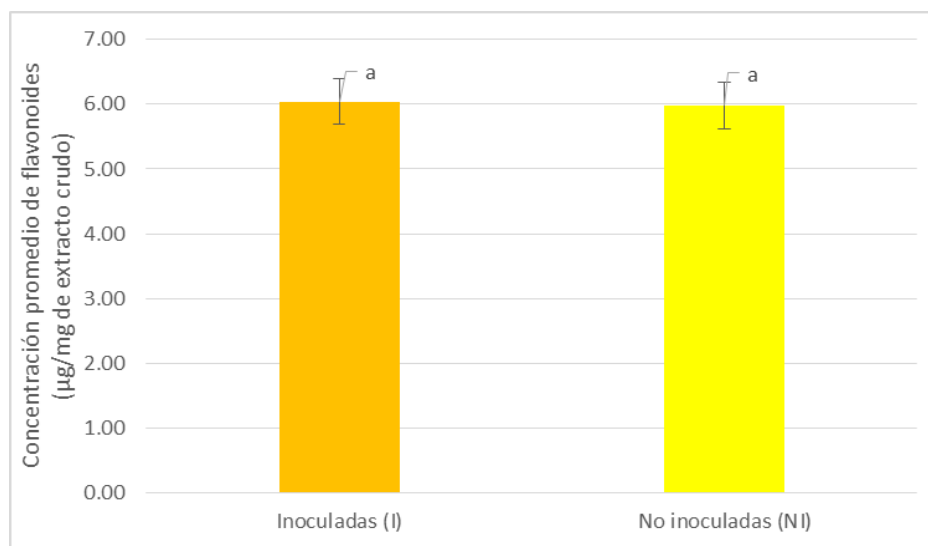
Cuantificación de flavonoides totales

La curva obtenida para la cuantificación de flavonoides totales se presenta en el Anexo 3.5, junto con la ecuación utilizada, donde “y” es la absorbancia a 415 nm y “x” es la cantidad de quercetina presente en cada repetición, resultante de multiplicar la alícuota empleada por la concentración de 0.024 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Mediante el despeje de “x”, se conoció la concentración de flavonoides totales para una determinada cantidad de extracto obtenido con metanol (10 μl de extracto a una concentración de 50 mg/ml). Esta cantidad se multiplicó por 100 (veces que caben 10 μl en 1 ml) y se dividió entre 50 (mg que habían en 1 ml) para obtener la cantidad de flavonoides que hay en cada mg de extracto crudo. Este último dato puede extrapolarse al total de la planta, y posteriormente se puede obtener la concentración de compuestos fenólicos por gramo de materia seca.

Concentración en relación al extracto crudo

Los datos de flavonoides por mg de extracto crudo se encuentran en el Anexo 3.3 y muestran homogeneidad de varianzas conforme a la prueba de Levene y una distribución normal conforme a la prueba de Shapiro-Wilk. La comparación de medias se presenta en la Gráfica 3.15.



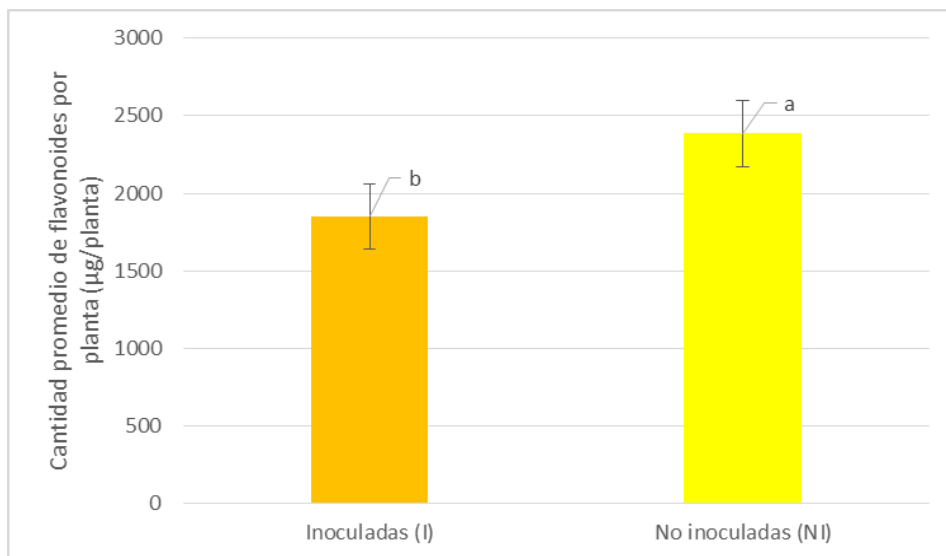
Gráfica 3.15. Concentración promedio de flavonoides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto crudo) para los tratamientos

con (I) y sin inoculación (NI). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas conforme a la prueba de comparación de medias de Tukey

La comparación de las medias de Tukey nos indica que las diferencias entre las concentraciones de flavonoides por miligramo de extracto crudo no son estadísticamente significativas. Probablemente esto obedezca a que la composición química sea similar en ambos casos o bien que sean diferentes pero algunos flavonoides incrementan mientras otros disminuyen su concentración.

Cantidad por planta

Los datos calculados para la cantidad de flavonoides por planta se obtienen multiplicando el rendimiento del extracto en miligramos (promedio por pares de plantas) por la concentración de flavonoides por miligramo de extracto. Estos datos se encuentran en el anexo 3.3 y muestran homogeneidad de varianzas conforme a la prueba de Levene y una distribución normal conforme a la prueba de Shapiro-Wilk. La comparación de medias se presenta en la Gráfica 3.16.



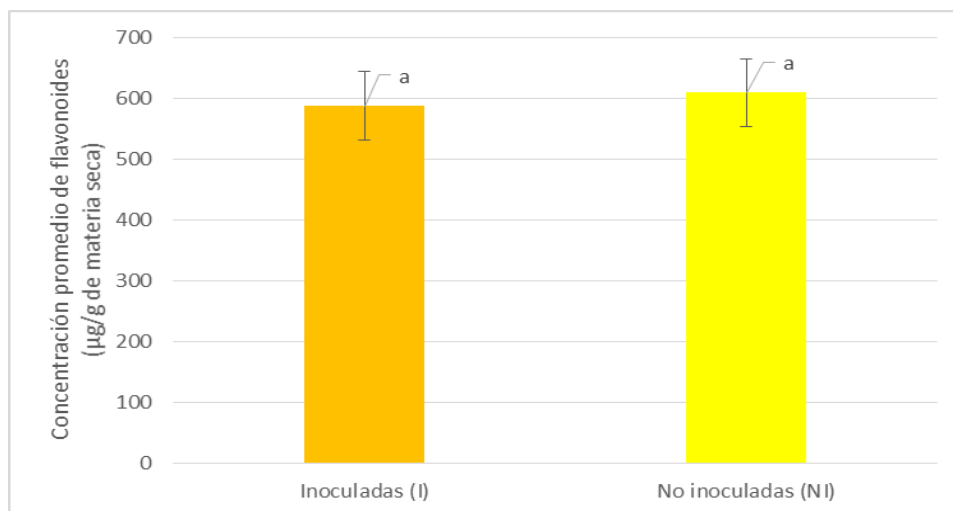
Gráfica 3.16. Cantidad promedio de flavonoides por planta ($\mu\text{g/planta}$) para los tratamientos con (I) y sin inoculación (NI). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas conforme a la prueba de comparación de medias de Tukey

La comparación de las medias de Tukey nos indica que las diferencias entre las cantidades de flavonoides por planta son estadísticamente significativas. Es fácil observar que la cantidad de

flavonoides en una planta es mayor en las plantas no inoculadas ya que éstas presentaron una mayor cantidad de materia seca y de rendimiento de extracto.

Concentración en relación a la materia seca

Los datos calculados para concentración de flavonoides en relación a la materia seca se obtienen dividiendo la cantidad de flavonoides por planta entre la materia seca (promedio por pares de plantas). Estos datos se encuentran en el anexo 3.3 y muestran homogeneidad de varianzas conforme a la prueba de Levene y una distribución normal conforme a la prueba de Shapiro-Wilk. La comparación de medias se presenta en la Gráfica 3.17.



Gráfica 3.17. Concentración promedio de flavonoides ($\mu\text{g/g}$ de materia seca) para los tratamientos con (I) y sin inoculación (NI). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas conforme a la prueba de comparación de medias de Tukey

La comparación de las medias de Tukey nos indica que las diferencias entre las concentraciones de flavonoides por gramo de materia seca no son estadísticamente significativas. La concentración de flavonoides por gramo de materia seca no presenta diferencias entre tratamientos, puesto que si bien la cantidad por planta era mayor en las no inoculadas, en este tratamiento también hubo mayor cantidad de materia seca. Es decir, que aparentemente la materia seca, el rendimiento del extracto y la cantidad de flavonoides son variables directamente proporcionales entre sí, sin importar el tratamiento, lo que significa que la concentración de flavonoides es igual tanto en relación al extracto crudo como en relación a la materia seca.

En cuanto a los niveles obtenidos de compuestos fenólicos, estos resultan bajos en comparación con otras plantas como *Limnophila aromatica* y *Moringa peregrina*, cuya concentración de compuestos fenólicos totales fue equivalente a 15.42 y 45.9 mg/g de materia seca respectivamente (Do *et al.*, 2014 ; Al Juhaimi *et al.*, 2017). Las concentraciones de flavonoides respecto al extracto también resultan bajas en comparación con la obtenida para la misma especie (*P. luteoalbum*), pero en Bangladesh, donde se encontraron el equivalente a 82.29 µg/(mg de extracto crudo) (Uddin *et al.*, 2017) contra los 6.01 µg/(mg de extracto crudo) cuantificados en el presente estudio. Las diferencias genéticas y las condiciones ambientales (posiblemente la radiación solar) podrían explicar estas diferencias.

Variación de algunos flavonoides cuantificados mediante HPLC

Derivado de un análisis de flavonoides con HPLC correspondientes a tres extractos de cada tratamiento (M1, M2, M3, N1, N2 y N3), con los estándares de rutina, florizina, miricetina, quercetina, naringenina, floretina y galangina, se encontró que la miricetina y la naringenina fueron lo que se encontraron con mayores concentraciones de entre los 7 flavonoides comparados. Se realizó la comparación de medias entre las concentraciones de estos compuestos para los diferentes tratamientos (las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas no se realizaron debido al escaso número de repeticiones), sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Aun así, se observó una tendencia interesante: Si se obtienen los porcentajes complementarios entre miricetina y naringenina se obtiene una tabla en la cual todos los porcentajes de miricetina son mayores para el tratamiento con inoculación micorrícica en relación con el tratamiento sin inoculación micorrícica (aunque no hay diferencias estadísticamente significativas mediante análisis de varianza de estos porcentajes).

	Miricetina	Naringenina
1M (M1)	41%	59%
2M (M3)	42%	58%
3M (M10)	87%	13%
1N (N1)	25%	75%
2N (N3)	34%	66%
3N (N10)	31%	69%

Gráfica 3.18. Porcentajes complementarios entre las concentraciones de miricetina y naringenina.

Derivado de lo anterior, es posible que un análisis con más repeticiones pudiera arrojar que la proporción de miricetina en relación con miricetina más naringenina aumentaría en el tratamiento con mayor colonización micorrícica. De ser así, una explicación lógica a este posible fenómeno es que la naringenina es un precursor de la miricetina y de otros flavonoides (Jiang, Wood y Morgan, 2005; Flamini *et al.*, 2013), y que esta transformación se estimula cuando hay un factor de estrés como lo fue en este caso la mayor colonización por micorrizas, de manera similar a lo que ocurre con la luz ultravioleta, la cual estimula la actividad de la chalcona sintasa para formar naringenina o naringenina-chalcona, y que a su vez sintetiza otros flavonoides (Hahlbrock y Scheel, 1989).

CONCLUSIONES

Las variables altura, días necesarios para la fructificación, materia seca de la parte aérea, "altura compuesta" y número de cabezuelas para la colonización micorrícica sugieren estrés en el desarrollo de *P. luteoalbum* debido a la inoculación.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de fenoles (1.7 mg/g de materia seca) ni flavonoides (0.6 mg/g de materia seca) debidas a la inoculación.

Un mejor desarrollo de la planta mostró una mayor cantidad de metabolitos secundarios por planta debido a su mayor crecimiento, por lo que se sugiere cultivar a la planta en condiciones favorables.

Las variables "altura compuesta", materia seca, rendimiento del extracto obtenido con metanol y cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides por planta parecen ser directamente proporcionales. Medir la "altura compuesta" podría ser un indicador del rendimiento del extracto y los compuestos fenólicos o flavonoides que podemos obtener de una planta, de ser así tendríamos un estimador no destructivo de estas variables.

LITERATURA CITADA

- Aderogba, M. A., L. J. McGaw, V. P. Bagla, J. N. Eloff y B. M. Abegaz. 2014. In vitro antifungal activity of the acetone extract and two isolated compounds from the weed, *Pseudognaphalium luteoalbum*. South African Journal of Botany 94: 74-78.
- Al Juhaimi, F., K. Ghafoor, I. A. M. Ahmed, E. E. Babiker y M. M. Özcan. 2017. Comparative

- study of mineral and oxidative status of *Sonchus oleraceus*, *Moringa oleifera* and *Moringa peregrina* leaves. *Journal of Food Measurement and Characterization* 11: 1745-1751.
- Benites, G. A., B. B. León, G. R. Reyes, M. S. Vásquez y E. V. Casanova. 2014. Estudio fitoquímico y efectos sedativo e hipnótico de *Solanum melongena* var. *esculentum* (Dunal) Nees en *Cavia porcellus* en comparación con diazepam. *Pharmaciencia* 2: 56-63.
- Bennett, R. N. y R. M. Wallsgrave. 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* 127: 617-633.
- Bettoni, M. M., A. F. Mogor, V. Pauletti y N. Goicoechea. 2014. Growth and metabolism of onion seedlings as affected by the application of humic substances, mycorrhizal inoculation and elevated CO₂. *Scientia Horticulturae* 180: 227-235.
- Chang, C. C., M. H. Yang, H. M. Wen y J. C. Chern. 2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10: 178-182.
- Cuadra, P., J. B. Harborne y P. G. Waterman. 1997. Increases in surface flavonols and photosynthetic pigments in *Gnaphalium luteo-album* in response to UV-B radiation. *Phytochemistry* 45: 1377-1383.
- Di Modica, G. y S. Tira. 1963. Chromatographic comparison of flavonoid pigments from *Inuleae*. *Annali di Chimica* 53: 764-773.
- Do, Q. D., A. E. Angkawijaya, P. L. Tran-Nguyen, L. H. Huynh, F. E. Soetaredjo, S. Ismadji y Y.-H. Ju. 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis* 22: 296-302.
- Flamini, R., F. Mattivi, M. De Rosso, P. Arapitsas y L. Bavaresco. 2013. Advanced Knowledge of Three Important Classes of Grape Phenolics: Anthocyanins, Stilbenes and Flavonols. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 19651-19669.
- Gatto, M. A., A. Ippolito, V. Linsalata, N. A. Cascarano, F. Nigro, S. Vanadia y D. Di Venere. 2011. Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 61: 72-82.
- Gerlach, N., J. Schmitz, A. Polatajko, U. Schlüter, H. Fahnenstich, S. Witt, A. R. Fernie, et al. 2015. An integrated functional approach to dissect systemic responses in maize to arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant, Cell & Environment* 38: 1591-1612.

- Goli, A. H., M. Barzegar y M. A. Sahari. 2005. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry* 92: 521-525.
- Haghighi, M., M. Mozafariyan y B. Abdolahipour. 2015. Effect of cucumber mycorrhiza inoculation under low and high root temperature grown on hydroponic conditions. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 18: 89-96.
- Hahlbrock, K. y D. Scheel. 1989. Physiology and Molecular Biology of Phenylpropanoid Metabolism. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 40: 23.
- Jiang, H., K. V. Wood y J. A. Morgan. 2005. Metabolic engineering of the phenylpropanoid pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 2962-2969.
- Klironomos, J. N. 2003. Variation in Plant Response to Native and Exotic Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Ecology* 84: 2292-2301.
- Roby, M. H. H., M. A. Sarhan, K. A.-H. Selim y K. I. Khalel. 2013. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products* 43: 827-831.
- Saleh, N. A. M., R. M. A. Mansour, Z. A. R. El-Kareemy y A. A. Fayed. 1988. The chemosystematics of local members of the subtribe gnaphaliinae (Compositae). *Biochemical Systematics and Ecology* 16: 615-617.
- Sbrana, C., L. Avio y M. Giovannetti. 2014. Beneficial mycorrhizal symbionts affecting the production of health-promoting phytochemicals. *Electrophoresis* 35: 1535-1546.
- Singleton, V. L., R. Orthofer y R. M. Lamuela-Raventós. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. En *Methods in Enzymology, Oxidants and Antioxidants Part A*, pp. 152-178. Academic Press.
- Uddin, M. S., G. M. S. Uddin, M. M. Begum, Y. Begum, O. Herrera-Calderon, M. M. Islam y M. M. Abdel-Daim. 2017. Inspection of Phytochemical Content and In Vitro Antioxidant Profile of *Gnaphalium luteoalbum* L.: An Unexplored Phytomedicine. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences* 7: 136-146.
- Zheng, X., W. Wang, H. Piao, W. Xu, H. Shi y C. Zhao. 2013. The Genus *Gnaphalium* L. (Compositae): Phytochemical and Pharmacological Characteristics. *Molecules* 18: 8298-8318.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

CONCLUSIONES

Los extractos obtenidos con acetona, hexano, cloruro de metileno y metanol de *Pseudognaphalium luteoalbum* no tienen actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3 en el Valle de México.

La acetona presenta toxicidad (retardo en el crecimiento, fungistasis) contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3 a una concentración de 25% e incluso al 15% o menor.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de fenoles (1.7 mg/g de materia seca) ni flavonoides (0.6 mg/g de materia seca) debidas a la inoculación.

La sumatoria de la altura de todas las ramas de una planta es una variable de medición no destructiva que está directamente correlacionada con la materia seca de las plantas, y posiblemente también con el rendimiento del extracto.

Una mayor colonización micorrícica por *Rhizophagus irregularis* inducida mediante inoculación puede afectar negativamente el desarrollo de *P. luteoalbum*, así como el rendimiento del extracto obtenido con metanol.

La actividad antifúngica de *P. luteoalbum* contra *Fusarium oxysporum* previamente reportada por Aderogba *et al.* (2014) no puede generalizarse para todos los genotipos ni para todas las condiciones ambientales.

RECOMENDACIONES

Se recomienda no utilizar ningún extracto de *P. luteoalbum* para controlar a *F. oxysporum* en el Valle de México.

A la población en general se recomienda, de manera opcional, recolectar o cultivar *P. luteoalbum* para consumo humano ocasional. Derivado de la revisión de literatura, se encontró que esta planta en ocasiones es consumida por algunas personas. Nunca se ha reportado toxicidad por el consumo humano de esta planta, debido a su sabor podría ser utilizada como condimento o verdura, tiene compuestos fenólicos y flavonoides (como se confirmó con el presente trabajo) y debido a ello presenta actividad antioxidante (Uddin *et al.*, 2017), además se ha consumido cruda por el autor del presente estudio.

A la comunidad científica se recomienda analizar la factibilidad del uso del parámetro “altura compuesta” como estimador de la materia seca y del rendimiento del extracto, en diferentes condiciones, e incluso para otras especies del mismo género. También se recomienda analizar otros genotipos de *P. luteoalbum*, posiblemente en otros países y otras condiciones, siendo la radiación solar el principal factor que podría modificar la composición del extracto. Un punto clave para encontrar si el extracto es diferente al reportado por Aderogba *et al.* (2014) sería el aislamiento de los compuestos obtenidos en ese estudio 7-O-glucopiranosido de hispidulina y 3-O- β - glucopiranosido de estigmasterol.

ANEXOS

DEL CAPÍTULO 1.

Anexo 1.1. Porcentajes de colonización micorrícica observados tras tinción con azul de tripano en *P. luteoalbum* para tratamientos cosechados en la fase vegetativa y reproductiva con y sin inoculación micorrícica

Repetición	Fase vegetativa, con inoculación (VI)	Fase vegetativa, sin inoculación (VNI)	Fase reproductiva, con inoculación (RI)	Fase reproductiva, sin inoculación (RNI)
1	27%	13%	47%	80%
2	10%	13%	77%	83%
3	27%	20%	50%	77%
4	27%	43%	63%	73%
5	37%	13%	53%	70%
6	20%	27%	43%	90%
7	17%	13%	57%	87%
8	13%	13%	73%	93%
9	17%	13%	80%	80%
10	47%	33%	90%	70%
11	23%	37%	63%	83%
12	47%	57%	83%	83%
Promedio	26%	25%	65%	81%

Anexo 1.2. Datos obtenidos del experimento de la toxicidad de los disolventes a diferentes concentraciones contra Fol 3. Diámetros del micelio y crecimientos promedio del radio (cm)

Día, tratamiento y repetición	Acetona 25%	Acetona 15%	Acetona 5%	DMSO 25%	DMSO 15%	DMSO 5%	Agua
Día 1. Disco de micelio grande. Repetición 1	1.50	1.50	1.80	1.50	1.50	1.70	1.90
Día 1. Disco de micelio grande. Repetición 2	1.50	1.50	1.70	1.50	1.50	1.70	2.00
Día 1. Disco de micelio grande. Repetición 3	1.50	1.50	1.80	1.50	1.50	1.80	2.00
Crecimiento promedio día 1, disco grande	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.12	0.23
Día 1. Disco de micelio pequeño. Repetición 1	0.20	0.20	0.50	0.20	0.20	0.40	0.80
Día 1. Disco de micelio pequeño. Repetición 2	0.20	0.20	0.40	0.20	0.20	0.40	0.80
Día 1. Disco de micelio pequeño. Repetición 3	0.20	0.20	0.40	0.20	0.20	0.50	1.00
Crecimiento promedio día 1, disco pequeño	0.00	0.00	0.12	0.00	0.00	0.12	0.33
Día 2. Disco de micelio grande. Repetición 1	1.50	1.90	2.50	1.50	1.50	2.10	2.80
Día 2. Disco de micelio grande. Repetición 2	1.50	1.90	2.40	1.50	1.50	2.10	2.80
Día 2. Disco de micelio grande. Repetición 3	1.50	2.00	2.40	1.50	1.50	2.10	2.80
Crecimiento promedio día 2, disco grande	0.00	0.22	0.47	0.00	0.00	0.30	0.65
Día 2. Disco de micelio pequeño. Repetición 1	0.20	0.30	1.50	0.20	0.20	0.90	1.50
Día 2. Disco de micelio pequeño. Repetición 2	0.20	0.40	1.20	0.20	0.20	0.90	1.60
Día 2. Disco de micelio pequeño. Repetición 3	0.20	0.50	1.20	0.20	0.20	1.10	1.80
Crecimiento promedio día 2, disco pequeño	0.00	0.10	0.55	0.00	0.00	0.38	0.72
Día 3. Disco de micelio grande. Repetición 1	1.50	2.80	3.30	1.50	1.50	2.50	3.80
Día 3. Disco de micelio grande. Repetición 2	2.20	2.90	3.20	1.50	1.50	2.60	3.40

Día 3. Disco de micelio grande. Repetición 3	1.80	2.90	3.20	1.50	1.50	2.40	3.50
Crecimiento promedio día 3, disco grande	0.17	0.68	0.87	0.00	0.00	0.50	1.03
Día 3. Disco de micelio pequeño. Repetición 1	0.20	1.50	2.50	0.20	0.20	1.60	2.60
Día 3. Disco de micelio pequeño. Repetición 2	0.20	1.50	2.30	0.20	0.20	1.60	2.70
Día 3. Disco de micelio pequeño. Repetición 3	0.20	1.50	2.30	0.20	0.20	1.70	3.00
Crecimiento promedio día 3, disco pequeño	0.00	0.65	1.08	0.00	0.00	0.72	1.28
Día 4. Disco de micelio grande. Repetición 1	2.30	3.70	4.30	1.50	1.50	2.90	4.60
Día 4. Disco de micelio grande. Repetición 2	3.40	3.60	4.20	1.50	1.50	3.00	4.70
Día 4. Disco de micelio grande. Repetición 3	2.90	3.60	4.10	1.50	1.50	2.70	4.50
Crecimiento promedio día 4, disco grande	0.68	1.07	1.35	0.00	0.00	0.68	1.55
Día 4. Disco de micelio pequeño. Repetición 1	0.20	2.50	3.70	0.20	0.20	2.10	3.60
Día 4. Disco de micelio pequeño. Repetición 2	0.20	2.60	3.50	0.20	0.20	2.10	3.80
Día 4. Disco de micelio pequeño. Repetición 3	0.20	1.50	2.30	0.20	0.20	2.30	4.10
Crecimiento promedio día 4, disco pequeño	0.00	1.18	1.70	0.00	0.00	0.95	1.75
Crecimiento promedio día 1	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.12	0.28
Crecimiento promedio día 2	0.00	0.16	0.51	0.00	0.00	0.34	0.68
Crecimiento promedio día 3	0.08	0.67	0.98	0.00	0.00	0.61	1.16
Crecimiento promedio día 4	0.34	1.12	1.53	0.00	0.00	0.82	1.65

DEL CAPÍTULO 2

Anexo 2.1. Diámetros de inhibición para las pruebas de difusión en agar de los extractos obtenidos con diferentes disolventes contra *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersici* raza 3.

Repetición	Captan (Testigo positivo)	E. metanol	E. cloruro de metileno	E. hexano	Mezcla de extractos	E. acetona
1	2 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
2	1 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
3	2 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
1 (control)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
2 (control)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
3 (control)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm

Anexo 2.2. Porcentajes de germinación de microconidios a las 36 h de los extractos obtenidos con diferentes disolventes contra *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersici* raza 3.

Repetición	Captan (Testigo psositivo)	E. metanol	E. cloruro de metileno	E. hexano	Mezcla de extractos	E. acetona
1	6%	100%	96%	89%	99%	94%
2	0%	99%	95%	100%	98%	94%
3	0%	98%	90%	99%	99%	100%
4	7%	100%	98%	98%	100%	98%
1 (control)	100%	93%	100%	97%	100%	100%
2 (control)	99%	96%	100%	100%	100%	98%
3 (control)	100%	100%	100%	98%	95%	99%
4 (control)	100%	97%	99%	100%	100%	100%

DEL CAPÍTULO 3

Anexo 3.1. Porcentajes de colonización micorrícica observados tras tinción con azul de tripano en *P. luteoalbum* para tratamientos con y sin inoculación. Para el análisis de varianza y prueba de Tukey estos datos posteriormente fueron transformados con el arcoseno de su raíz cuadrada.

Repetición	Tratamiento con inoculación (I) (%)		Tratamiento sin inoculación (NI) (%)	
	1/2	66.7	73.3	60.0
3/4	93.3	80.0	33.3	0.0
5/6	93.3	60.0	20.0	0.0
7/8	100.0	73.3	6.7	20.0
9/10	73.3	86.7	26.7	0.0
11/12	60.0	86.7	0.0	6.7
13/14	60.0	40.0	26.7	6.7
15/16	66.7	86.7	13.3	46.7
17/18	60.0	100	13.3	0.0
19/20	46.7	66.7	13.3	0.0
Promedio	73.7		15.0	

Anexo 3.2. Variables morfológicas de la parte aérea de *P. luteoalbum* para tratamientos con y sin inoculación con HMA

Tratamiento / Repetición	Altura de la rama central (cm)	Días para la fructificación	Materia fresca (g)	Materia seca (g)	Altura compuesta (cm)	Número de cabezuelas	Diámetro de cobertura (cm)	Número de hojas	Número de ramas
N1	62	59	14.50	3.61	330	209	14.5	150	8
N2	65	62	17.75	4.35	374	255	18	177	8
N3	60	63	13.05	3.18	258	179	14	125	7

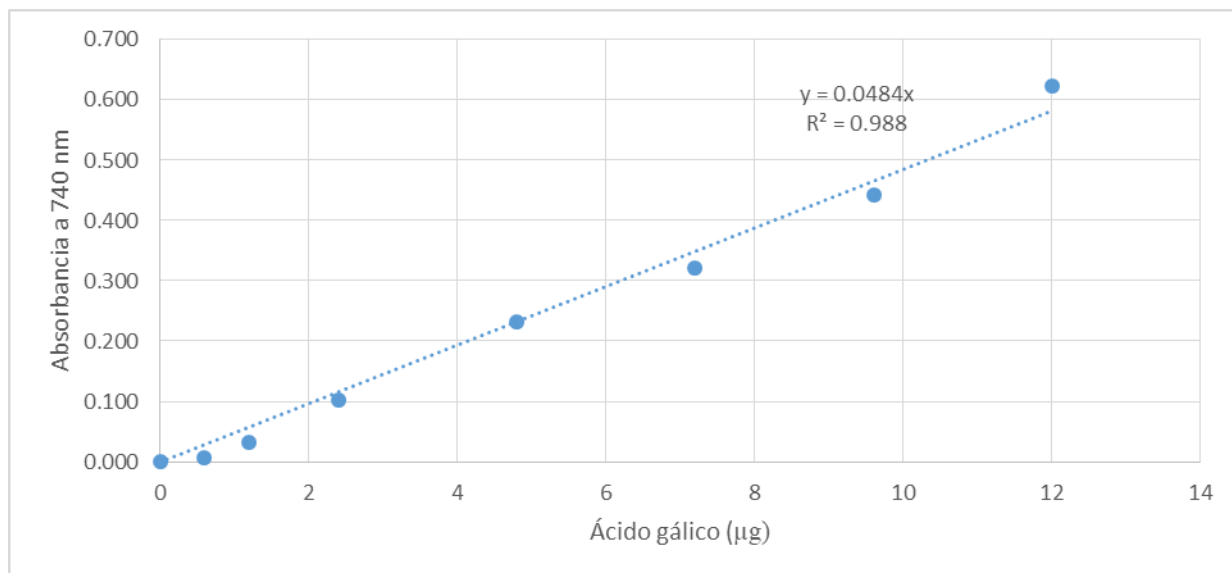
N4	65	60	18.33	4.70	408	301	18	169	10
N5	58	60	16.36	4.16	370	266	16	156	9
N6	61	56	18.81	4.86	442	283	17	157	9
N7	62	58	13.72	3.48	329	231	13	143	7
N8	58	63	14.96	3.71	309	192	15	108	7
N9	56	62	15.02	3.36	304	166	13.5	135	9
N10	57	57	13.82	4.54	388	238	14.5	167	10
N11	62	58	24.40	6.06	467	344	18	156	9
N12	60	60	13.90	3.50	319	211	14	118	9
N13	57	69	11.30	2.44	193	70	13	108	7
N14	59	67	15.45	3.65	315	168	13	142	8
N15	60	61	10.55	2.57	231	134	11	110	8
N16	60	66	22.92	5.37	427	274	17	166	10
N17	63	58	15.02	3.86	341	211	14	163	9
N18	58	61	11.71	2.88	226	143	13	98	5
N19	53	60	14.40	3.54	338	220	13	146	8
N20	60	59	18.71	4.71	422	243	15.5	177	12
M1	54	70	16.16	3.38	279	129	16	178	11
M2	54	66	18.54	4.41	327	205	17	182	9
M3	56	57	18.02	4.61	425	312	16	183	10
M4	52	68	14.22	3.22	252	147	18	163	8
M5	51	74	11.67	2.37	216	34	14	130	8
M6	55	68	10.90	2.32	211	75	14	125	8
M7	53	75	9.01	1.67	138	43	13	90	5
M8	54	61	17.58	3.99	343	202	16	168	10
M9	51	73	7.39	1.43	101	44	12	85	7
M10	53	62	18.90	4.57	372	273	18	177	11
M11	56	63	9.28	2.16	214	110	13	94	7
M12	52	67	10.60	2.56	197	91	18	121	8
M13	55	59	26.98	6.35	457	290	19	190	13
M14	50	74	9.30	1.79	172	37	13	99	8
M15	50	66	16.78	3.71	269	163	17	140	9
M16	58	62	14.45	3.28	267	117	13	137	10
M17	53	61	17.35	4.33	316	207	15	134	10
M18	49	66	11.35	2.57	202	97	16	104	9
M19	54	65	9.92	2.23	193	100	12	105	8
M20	50	62	8.75	2.04	206	137	12	92	7
Media NI	60	61	15.73	3.93	340	217	15	144	8
Media I	53	66	13.86	3.15	258	141	15	135	9

**Anexo 3.3. Variables fitoquímicas de la parte aérea de *P. luteoalbum* para
tratamientos con y sin inoculación con HMA**

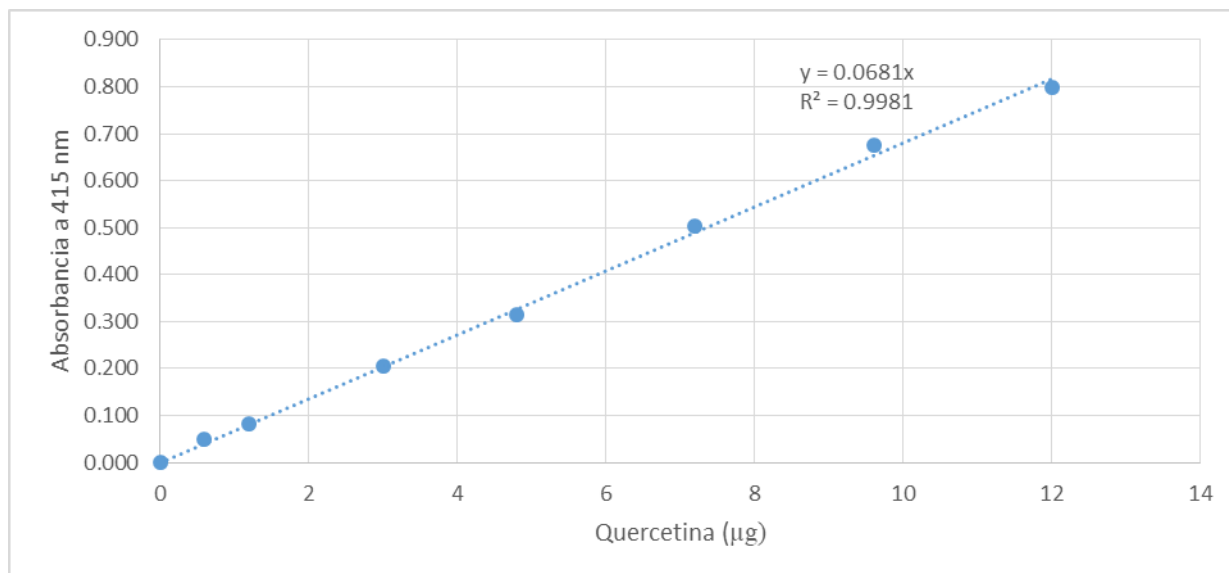
Repetición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Media
(I) Rendimiento del extracto (g)	0.413	0.307	0.276	0.341	0.420	0.219	0.274	0.294	0.301	0.242	0.309
(NI) Rendimiento del extracto (g)	0.419	0.278	0.374	0.412	0.444	0.375	0.406	0.494	0.333	0.440	0.397
(I) Concentración de compuestos fenólicos en relación al extracto crudo (µg/mg)	14.71	15.66	16.28	17.77	17.64	17.77	21.12	18.22	18.51	17.85	17.55
(NI) Concentración de compuestos fenólicos en relación al extracto crudo (µg/mg)	15.21	16.90	16.53	17.81	18.72	19.67	17.98	15.99	17.77	16.45	17.30
(I) Cantidad de compuestos fenólicos por planta (µg/planta)	6086	4808	4498	6060	7427	3901	5792	5357	5584	4325	5384
(NI) Cantidad de compuestos fenólicos por planta (µg/planta)	6378	4701	6193	7340	8325	7377	7314	7906	5921	7248	6870
(I) Concentración de compuestos fenólicos en relación a la materia seca (µg/g)	1564	1531	1415	1879	2289	1254	1848	1880	1977	1494	1713
(NI) Concentración de compuestos fenólicos en relación a la	1501	1184	1600	1861	2066	1840	1863	2054	1585	1970	1752

materia seca ($\mu\text{g/g}$)												
(I) Concentración de flavonoides en relación al extracto crudo ($\mu\text{g/mg}$)	5.58	5.08	6.20	5.11	6.28	6.64	6.75	6.46	5.73	6.58	6.04	
(NI) Concentración de flavonoides en relación al extracto crudo ($\mu\text{g/mg}$)	5.05	5.73	5.26	6.99	5.02	7.05	7.22	6.17	5.29	6.02	5.98	
(I) Cantidad de flavonoides por planta ($\mu\text{g/planta}$)	2308	1560	1712	1743	2645	1457	1853	1899	1728	1594	1850	
(NI) Cantidad de flavonoides por planta ($\mu\text{g/planta}$)	2119	1593	1970	2881	2234	2644	2940	3049	1762	2653	2384	
(I) Concentración de flavonoides en relación a la materia seca ($\mu\text{g/g}$)	593	497	538	540	815	469	591	666	612	551	587	
(NI) Concentración de flavonoides en relación a la materia seca ($\mu\text{g/g}$)	498	401	509	730	554	659	749	792	472	721	609	

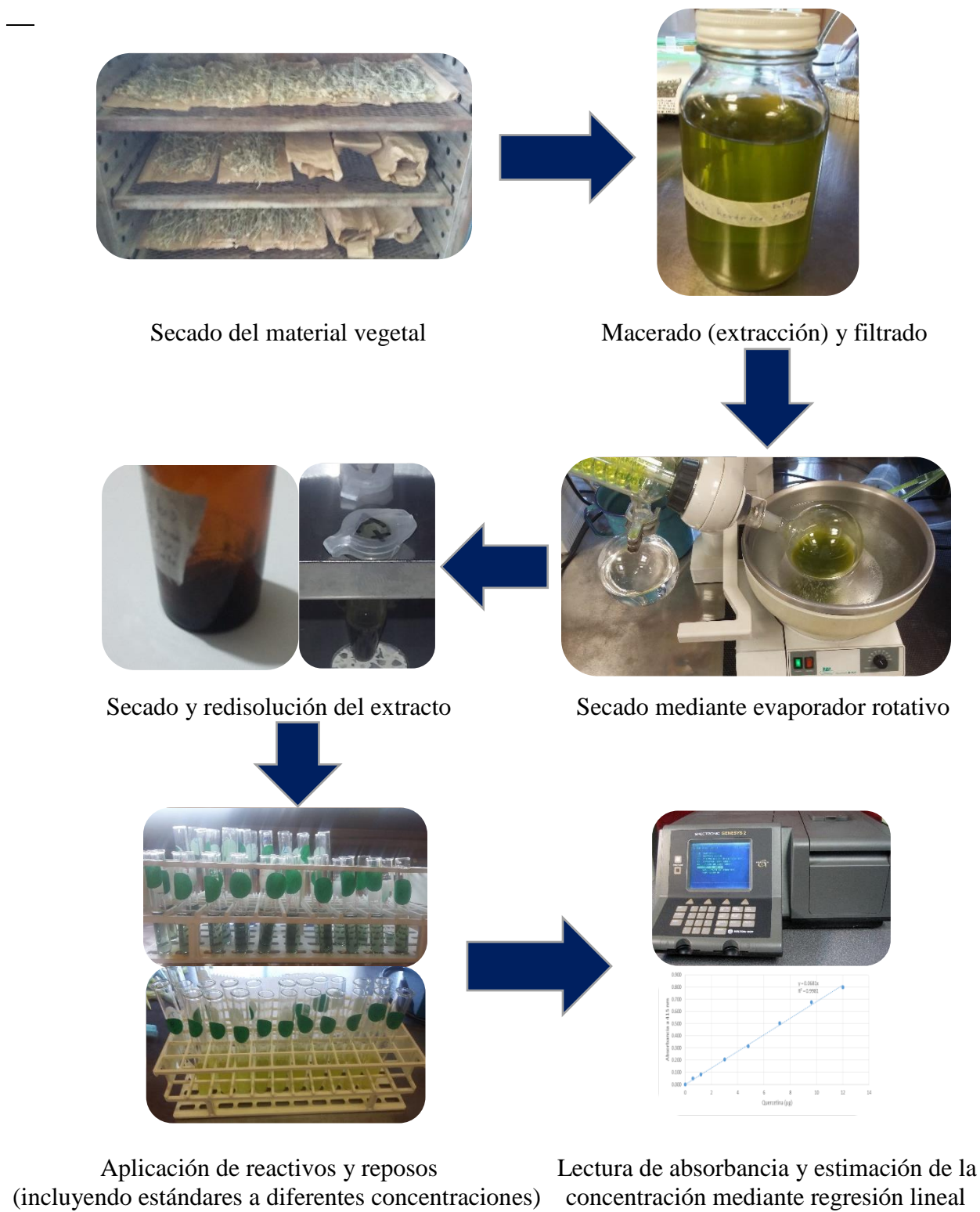
Anexo 3.4. Curva de calibración para cuantificación de fenoles libres totales



Anexo 3.5. Curva de calibración para cuantificación de flavonoides totales



Anexo 3.6. Diagrama de cuantificación de fenoles/flavonoides totales



Anexo 3.7. Observaciones sobre *P. luteoalbum*

Análisis preliminar de *P. luteoalbum*

Se realizó un análisis preliminar de los posibles tipos de metabolitos secundarios que podrían estar más presentes en *P. luteoalbum*. Para ello, se realizó lo siguiente:

Se pesaron 2 gramos de material vegetal fresco de un ejemplar silvestre. El material se cortó en pequeños trozos con una navaja, se colocó en un tubo de ensayo, y se añadieron 5 ml de metanol a 80%. Posteriormente el tubo se introdujo en un baño de ultrasonido por 10 min, seguidos de 5 min de reposo y 10 min más de ultrasonido. Se filtró y se recogió el filtrado en un matraz de 25 ml, con el fin de utilizarlo para las diferentes pruebas.

Alcaloides: Del extracto en metanol a 80% se tomaron 0.5 ml y se depositaron en el tubo de ensayo, se agregaron de 5 a 6 gotas de ácido clorhídrico a 10%. Se agitó por unos segundos y se colocó en baño maría por 20 min. Se dejó enfriar y se añadieron tres gotas del activo de Dragendorff. No se formó un color naranja o un precipitado, indicándose así la posible ausencia de alcaloides, a diferencia del testigo positivo (*Lupinus* sp.) y en congruencia con el testigo negativo (metanol).

Taninos: Del extracto en metanol a 80% se tomaron 0.5 ml e inmediatamente tres gotas de cloruro férrico a 3%. Se formó una coloración azul oscura, indicándose así la posible presencia de alcaloides, en congruencia con el testigo positivo (*Quercus* sp.) y a diferencia del testigo negativo (agua destilada).

Saponinas (prueba de la espuma): Se tomaron 0.5 ml del extracto orgánico y se añadió 1 ml de agua destilada y se agitó el tubo por un minuto. No se formó una espuma que persistiera por más de un minuto, a diferencia del testigo positivo (*Calea zacatechichi*) y en congruencia con el testigo negativo (agua destilada).

Saponinas (prueba con reactivo de Fehling): Del extracto se tomaron 0.5 ml y se agregaron 0.5 ml de una solución compuesta por partes iguales de una solución obtenida disolviendo 1.92 g de sulfato de cobre en 15 ml de agua destilada y de otra solución obtenida disolviendo 5.28 g de tartrato sódico potásico y 2.31 g de hidróxido de sodio en 500 ml de agua destilada. También se

agregaron 0.5 ml de carbonato de sodio a 5 % y se puso a hervir durante 30 min. No se formó un precipitado color rosa, a diferencia del testigo positivo (*Calea zacatechichi*).

Fenoles: Se tomaron 0.5 ml del extracto en metanol a 80%, se agregaron 0.5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu a 10% y 0.5 ml de una solución de carbonato a 5%. Se formó un color azul intenso, en congruencia con el testigo positivo (*Vanilla planifolia*) y a diferencia del testigo negativo (metanol a 80%).

Flavonoides: Una alícuota de la muestra se trató con unas gotas de hidróxido de potasio a 10%. No se observó claramente la presencia o ausencia de fluorescencia amarilla, como ocurrió con el testigo positivo (*Heterotheca inuloides*).

Terpenoides: Se tomó 1 ml del extracto, se evaporó el disolvente y se resuspendió con gotas de cloruro de metileno. Se añadieron 3 gotas de anhídrido acético y tres gotas añadidas lentamente por las paredes del tubo de ácido sulfúrico concentrado. No se formó un color morado intenso o café, a diferencia del testigo positivo (*Amphipterygiun adstringens*) y en congruencia con el testigo negativo (cloruro de metileno).

Experimento previo de estimación de rendimiento del aceite esencial

A la 9:50 de la mañana se colectó una planta de *P. luteoalbum* en los jardines del Colegio de Postgraduados próximo a las coordenadas +19.4676° y -98.8983°. Posteriormente la planta fue cortada finamente (la parte aérea, excluyendo el tallo grueso debajo de la ramificación). El material picado pesó 24.9 g.

Se introdujo el material en un matraz de bola de 1 litro. El matraz se llenó posteriormente con agua destilada hasta la mitad de su capacidad.

Se armó un equipo de hidrodestilación, con el matraz bola, una trampa Clevenger, un refrigerante y una plancha Fisher Scientific inicialmente a un nivel de 9, a las 11:00 h. Nueve min después se activó la refrigeración y se disminuyó la intensidad del calor al nivel 4, tras haber hervido el agua. Se esperó la destilación 3 h, manteniendo hielo para que enfríe el agua refrigerante. Transcurrido ese tiempo, no se observó fracción alguna de aceite. El agua retenida en la trampa Clevenger se conservó en un vaso de precipitados, presenta el olor característico de la planta. Posteriormente se realizó un lavado con cloruro de metileno, del que se obtuvieron 3.5

mg de aceite esencial.

Observación de micorrizas en un ejemplar silvestre

Debido a la falta de información de la especie, antes de realizar la inoculación con micorrizas, el 7 de junio del 2017, se hizo la tinción en frío con azul de tripano de las raicillas de un ejemplar silvestre de *P. luteoalbum* para observar si la especie presenta colonización micorrícica de manera natural. Hubo presencia de colonización micorrícica en 20 de 75 campos del microscopio a 40x, lo que representa 27% de colonización.

Solubilidad del extracto obtenido con acetona

La solubilidad extracto obtenido con acetona se probó colocando en tubos de microcentrífuga una pequeña fracción del extracto (alrededor de 1 mg) y se añadieron 300 µl de los disolventes dimetilsulfóxido, acetona, acetona a 25%, agua, metanol y etanol. Se agitó durante 5 min a intensidad 8 en agitador vibrador Multi Reax.

Cualitativamente se observó que la acetona y el dimetilsulfóxido lograron una excelente disolución del extracto, mientras que la acetona a 25% permitió una disolución aceptable (disolviendo primero en acetona y posteriormente añadiendo el porcentaje de agua requerido), el metanol y el etanol casi no lograron disolver el extracto y el agua pura no permitió su disolución. Cabe señalar que concentraciones altas de los extractos dificultan la visualización en pruebas de observación al microscopio, se recomienda utilizar concentraciones iguales o menores a las empleadas en el presente trabajo.

Otras observaciones

La especie libera sus frutos en la tarde, después de las 13:00 h y antes de las 17:00 h. Cuando la planta en floración se seca en el horno, algunas inflorescencias comienzan a fructificar.

Si el ápice muere, de las ramas existentes (las cuales provienen todas desde la base del tallo) surgen nuevas ramas (secundarias) en los nudos.

El extracto obtenido con metanol fue suspendido para los análisis fitoquímicos a una concentración de 50 mg/ml, sin embargo se recomienda utilizar concentraciones más bajas. Este extracto es poco soluble en metanol a 80%.