



**UNIVERSIDAD MICHOACANA**  
**DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

**“CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE *Satureja macrostema* (Benth)  
Briq. Y *Eryngium carlinae* Delar F. Y EVALUACIÓN DE LA  
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE SUS TERPENOIDES”**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS  
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**PRESENTA:**

IBQ. DAVID FRANCISCO ESPINO GARIBAY

**DIRECTOR DE TESIS:**

DC. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA

MORELIA MICHOACÁN, AGOSTO DEL 2010

## DEDICATORIA

*A mi familia:*

*A mis padres, Ernesto Espino Ochoa y Epigmenia Garibay Castañeda, fuente de inspiración para conseguir mis metas, ser mejor persona y mejor profesional. Gracias por todas sus enseñanzas. Los quiero en demasía.*

*A mis hermanos, Eliel, Alejandro, Alma Livia, Dulce Hayde, Eber, Ludmaely y Sergio Abed Espino Garibay, por ser tan unidos y apoyarme incondicionalmente en todo lo que he necesitado. Mil gracias. Los quiero mucho.*

## *AGRADECIMIENTOS*

*A Dios*, por permitirme cumplir esta meta profesional y ser mi refugio y fortaleza en los momentos difíciles de mi vida.

*Al D.C. Rafael Salgado Garciglia*, gracias por su asesoría, respaldo y apoyo incondicional para que esta tesis se lograra.

Quiero agradecer de manera especial *al D.C. Abraham García Chávez* por su valiosa asesoría, por sus enseñanzas e ideas que sin duda quedaron plasmadas en esta tesis.

*A los D.Cs. Ernesto García Pineda, Pedro García Saucedo y Rodolfo López Gómez*, gracias por sus sugerencias y comentarios que permitieron mejorar este trabajo.

*A la D.C. Rosa Elva Norma del Rio Torres*, gracias por su apoyo para que este proyecto llegara a buen término.

*A la D.C. June Simpson y la M.C. Katia del Carmen Gil Vega*, del CINVESTAV Irapuato, gracias por su apoyo en la realización de los ITSs.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas: *Cintia Aire Rincón Hernández, Julia Valdez Partida, Juan Luis Cruz Gutiérrez, Alma Ruth García Pineda, Luis María Suárez Rodríguez, Griselda Hernández López, Mireya Saavedra, Wendy Zurita, Mariana, Brenda y Antonieta*.

Un agradecimiento especial a mi amiga *Sandra Rodríguez Montiel*, por sus palabras de aliento para seguir adelante y sobre todo por brindarme su valiosa amistad.

*Al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas* (IIQB-UMSNH), por darme la oportunidad de estudiar en su programa de maestría en ciencias en biología experimental.

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios

*Gracias a todos ellos*

# ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE CUADROS	ii
RESUMEN	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
II.1. La revolución verde y las enfermedades	4
II.1.1. Características de <i>Fusarium oxysporum</i> y enfermedades que ocasiona	7
II.1.2. Características de <i>Botrytis cinerea</i> y enfermedades que ocasiona	8
II.1.3. Características de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> y enfermedades que ocasiona	9
II.1.4. Características de <i>Phytophthora spp.</i> y enfermedades que ocasiona	10
II.1.4.1. <i>Phytophthora capsici</i> Leonian	11
II.1.4.2. <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands	12
II.2. Mecanismo de defensa en plantas	12
II.3. Metabolitos secundarios de origen vegetal	15
II.3.1. Aceites esenciales	17
II.3.1.1. Localización	20
II.3.2. Terpenoides	20
II.4. Clasificación taxonómica de plantas en estudio	23
II.4.1. Marcadores moleculares	24
II.4.1.1. Espaciadores transcritos internos (ITSs)	26
II.4.1.2. Análisis de los datos moleculares	27
II.5. Plantas en estudio	28
II.5.1. <i>Satureja macrostema</i> (Benth) Briq.	28
II.5.1.1. Clasificación botánica	29
II.5.1.2. Distribución geográfica	29
II.5.1.3. Usos	29
II.5.1.4. Composición química y actividad antimicrobiana del género	30
II.5.2. <i>Eryngium carlinae</i> Delar F.	32
II.5.2.1. Clasificación botánica	34
II.5.2.2. Distribución geográfica	34
II.5.2.3. Usos	34
II.5.2.4. Composición química y actividad antimicrobiana del género	35
II.6. Variación en la composición química en los aceites esenciales de plantas en distintos estados de desarrollo	38
III. JUSTIFICACIÓN	39
IV. HIPÓTESIS	39
V. OBJETIVOS	40
V.1. Objetivo general	40
V.2. Objetivos específicos	40

<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	41
VI.1. Material biológico	41
VI.1.1. Tejido vegetal	41
VI.1.2. Microorganismos fitopatógenos para la realización de bioensayos	41
VI.1.3. Mantenimiento de hongos y oomicetos	41
VI.2. Clasificación molecular de las plantas en estudio mediante nrADN-ITSs	42
VI.2.1. Extracción de ADN	42
VI.2.1.1. Cuantificación del ADN	43
VI.2.2. Espaciadores Transcritos Internos (ITSs)	43
VI.2.3. Limpieza de fragmentos	44
VI.2.4. Secuenciación	45
VI.2.5. Análisis de datos	45
VI.3. Obtención de extractos vegetales	47
VI.4. Cromatografía de gases - espectrometría de masas (CG-EM)	47
VI.5. Purificación de compuestos	48
VI.5.1. Cromatografía en capa fina (CCF)	48
VI.5.2. Cromatografía en columna (CC)	48
VI.5.3. Concentración de compuestos y preparación de dosis	49
VI.6. Bioensayos con hongos y oomicetos	49
VI.6.1. Análisis estadístico	50
VI.7. Composición química de los extractos crudos de plantas en distintos estados de desarrollo	50
<b>VII. RESULTADOS</b>	51
VII.1. Clasificación molecular de las plantas en estudio mediante nrADN-ITSs	51
VII.1.1. Extracción de ADN	51
VII.1.2. Amplificación	52
VII.1.3. Secuenciación	53
VII.1.4. Determinación de la variabilidad genética	54
VII.1.4.1. <i>S. macrostema</i> (Benth) Briq.	54
VII.1.4.2. <i>E. carlinae</i> Delar F.	57
VII.2. Composición química de los extractos crudos de <i>S. macrostema</i> y <i>E. carlinae</i>	59
VII.3. Estandarización del sistema de extracción, análisis y purificación de los terpenoides mayoritarios	62
VII.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana	63
VII.4.1. Extractos crudos	64
VII.4.2. Terpenoides extraídos de <i>S. macrostema</i> (Benth) Briq.	64
VII.4.3. Terpenoides extraídos de <i>E. carlinae</i> Delar F.	71
VII.5. Composición química de los extractos crudos de plantas en distintos estados de desarrollo	74
VII.5.1. <i>S. macrostema</i> (Benth) Briq.	75
VII.5.2. <i>E. carlinae</i> Delar F.	76
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	79
VIII.1. Clasificación molecular de las plantas en estudio mediante nrADN-ITSs	79
VIII.2. Composición química, variación en su composición en distintos estados de desarrollo y actividad antimicrobiana de los extractos crudos de las plantas en estudio	82
VIII.2.1. <i>S. macrostema</i> (Benth) Briq.	82
VIII.2.2. <i>E. carlinae</i> Delar F.	88
VIII.3. Aspectos generales	91

<b>IX. CONCLUSIONES</b>	93
<b>X. LITERATURA CITADA</b>	94
<b>XI. ANEXOS</b>	103
XI.1. Alineamiento de <i>S. macrostema</i> (Benth) Briq.	103
XI.2. Alineamiento de <i>E. carlinae</i> Delar F.	106
XI.3. Reporte de secuencia ITS1-5.8S-ITS2 de <i>E. carlinae</i> Delar F. al banco de datos GenBank, numero de acceso EU089972.	109
XI.4. Análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de extractos etanólicos de plantas de <i>S. macrostema</i> (Benth) Briq. en distintos estados de desarrollo.	110
XI.5. Análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de extractos etanólicos de plantas de <i>E. carlinae</i> Delar F. en distintos estados de desarrollo.	113

# ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Ruta metabólica implicada en la síntesis de terpenoides	22
<b>Figura 2. A.</b> Los <b>18S</b> , <b>5.8S</b> y <b>26S</b> son regiones codificantes para los ARN ribosomales 18S, 5.8S 26S. Los <b>ITS1</b> y <b>ITS2</b> , son las regiones espaciadoras transcritas internas, y las <b>5'ETS</b> y <b>3'ETS</b> son las regiones espaciadoras transcritas externas. Los <b>1GS</b> son las regiones espaciadoras intergénicas. B. Los iniciadores <b>ITS1</b> e <b>ITS4</b> se localizan en las regiones conservadas <b>18S</b> y <b>26S</b> amplifican la región <b>ITS1-5.8S-ITS2</b> con tamaños que varían desde 576 a 637 pb según la especie.	27
<b>Figura 3.</b> Nurite (A), Hierba del sapo (B)	38
<b>Figura 4.</b> Electroforesis del ADN de <i>S. macrostema</i> (nurite) y <i>E. carlinae</i> (hierba del sapo) (Edwards <i>et al.</i> , 2001); A. Sin estandarizar; B. Estandarizados a 100 ng/μL.	52
<b>Figura 5.</b> Electroforesis de los productos de amplificación por PCR. <b>Carril 1:</b> MTM 100 pb; <b>Carriles 2 y 3:</b> región ITS1-5.8S-ITS2 de <i>S. macrostema</i> <b>Carriles 3 y 4:</b> región ITS1-5.8S-ITS2 de <i>E. carlinae</i> .	52
<b>Figura 6.</b> Porcentaje de identidad y divergencia, con el programa MegAlign de DNASTAR 7.2., de las secuencias ITS1-5.8S-ITS2 de las especies relacionadas al género <i>Satureja</i> .	55
<b>Figura 7.</b> Dendrograma más parsimonioso obtenido a partir de las secuencias ITS1-5.8S-ITS2 para las especies relacionadas al género <i>Satureja</i> , obtenido mediante el algoritmo ClustalW por medio del programa MegAlign de DNASTAR 7.2.. Los valores inferiores indican el porcentaje de disimilaridad entre los taxa.	56
<b>Figura 8.</b> Dendrograma a partir de las secuencias ITS1-5.8S-ITS2 para las especies relacionadas al género <i>Satureja</i> , obtenido por el método de agrupación UPGMA mediante el programa CLC Free Workbench 4.6.2, Los valores en los nodos indican A. Los porcentajes de disimilaridad entre los taxa y B. Los valores del análisis de remuestreo bootstrap.	56
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de identidad y divergencia, con el programa MegAlign de DNASTAR 7.2., de las secuencias ITS1-5.8S-ITS2 de las especies relacionadas al género <i>Eryngium</i> .	58
<b>Figura 10.</b> Dendrograma más parsimonioso obtenido a partir de las secuencias ITS1-5.8S-ITS2 para las especies relacionadas al género <i>Eryngium</i> , obtenido mediante el algoritmo ClustalW por medio del programa MegAlign de DNASTAR 7.2.. Los valores inferiores indican el porcentaje de disimilaridad entre los taxa.	58
<b>Figura 11.</b> Dendrograma más parsimonioso obtenido a partir de las secuencias ITS1-5.8S-ITS2 para las especies relacionadas al género <i>Eryngium</i> , obtenido mediante el algoritmo ClustalW por medio del programa MegAlign de DNASTAR 7.2.. Los valores inferiores indican el porcentaje de disimilaridad entre los taxa.	59
<b>Figura 12.</b> Cromatograma del extracto etanólico de <i>Satureja macrostema</i> (Benth) Briq. Compuestos mayoritarios: 1. mentol, 2. óxido de etileno, 3. menteno, 4. limoneno, 5. terpineol, 6.pulegona, 7. citronelol, 8. espatulenol, 9. dodecanal, 10. Óxido de piperitona, 11. Piperitona	61
<b>Figura 13.</b> Cromatograma del extracto etanólico de hojas y pedúnculos florales de <i>Eryngium carlinae</i> Delar F. Compuestos mayoritarios: 1. p-pineno, 2. α-pineno, 3. α-γ-terpineno, 4. cis ocimeno, 5. mirceno, 6. cariofileno, 7. borneol, 8. sabineno	61
<b>Figura 14.</b> Porcentajes de inhibición ejercidos por los terpenoides extraídos de <i>S. macrostema</i> (Benth) Briq. (Nurite) sobre: <b>A.-</b> <i>F. oxysporum</i> (4 días); <b>B.-</b> <i>B. cinerea</i> (4 días); <b>C.-</b> <i>C. lindemuthianum</i> (10 días); <b>D.-</b> <i>P. capsici</i> (6 días); <b>E.-</b> <i>P. cinamoni</i> (8 días). **Diferencia significativa; <sup>ns</sup> Diferencia no significativa respecto a ECTN, de acuerdo a un análisis de varianza y a una prueba de Tukey (α= 0.05) por medio del programa Statistica 7.0	68

**Figura 15.** Inhibición del crecimiento del micelio en hongos y oomicetos fitopatógenos (método de discos impregnados) por terpenoides de *S. macrostema* (Benth) Briq. (Nurite) en **(A).** *F. oxysporum* a los 4 días del cultivo: **1.** Tecto 60 mg/L; **2.** Extracto crudo de nurite; **3.** Óxido de piperitona 250 mg/L; **4.** Mentol 500 mg/L; **5.** Etanol absoluto; **(B).** *B. cinerea* a los 4 días del cultivo: **6.** Tecto 60 mg/L; **7.** Extracto crudo de nurite; **8.** Epatulenol 100 mg/L; **9.** Óxido de piperitona 250 mg/L; **10.** Etanol absoluto; **(C).** *C. lindemuthianum* a los 10 días del cultivo: **11.** Tecto 60 mg/L; **12.** Extracto crudo de nurite; **13.** Epatulenol 50-500 mg/L; **14.** Óxido de piperitona 500 mg/L; **15.** Etanol absoluto; **(D).** *P. capsici* a los 6 días del cultivo: **16.** Mefenoxam 100 mg/L; **17.** Extracto crudo de nurite; **18.** Mentol 500 mg/L; **19.** Etanol absoluto; **(E).** *P. cinnamomi* a los 8 días del cultivo: **20.** Mefenoxam 100 mg/L; **21.** Extracto crudo de nurite; **22.** Pulegona 250 mg/L; **23.** Etanol absoluto

70

**Figura 16.** Porcentajes de inhibición ejercidos por los terpenoides extraídos de *E. carlinae* Delar F. (Hierba del sapo) sobre: **A.-** *F. oxysporum* (4 días); **B.-** *B. cinerea* (4 días); **C.-** *C. lindemuthianum* (10 días); **D.-** *P. capsici* (6 días); **E.-** *P. cinamoni* (8 días). \*\*Diferencia significativa; <sup>ns</sup>Diferencia no significativa respecto a ECHS, de acuerdo a un análisis de varianza y a una prueba de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ) por medio del programa Statistica 7.0.

72

**Figura 17.** Inhibición del crecimiento del micelio en hongos y oomicetos fitopatógenos (método de discos impregnados) por terpenoides de de *E. carlinae* Delar F. (Hierba del sapo) en **(A).** *F. oxysporum* a los 4 días del cultivo: **1.** Extracto crudo de hierba del sapo; **2.** Borneol 500 mg/L; **3.** Etanol absoluto; **(B).** *B. cinerea* a los 4 días del cultivo: **4.** Extracto crudo de hierba del sapo; **5.** Borneol 500 mg/L; **6.** Etanol absoluto; **(C).** *C. lindemuthianum* a los 10 días de cultivo: **7.** Extracto crudo de hierba del sapo; **8.** Borneol 500 mg/L; **9.** Etanol absoluto; **(D).** *P. capsici* a los 6 días del cultivo: **10.** Extracto crudo de hierba del sapo; **11.** Borneol 500 mg/L; **12.** Etanol absoluto; **(E).** *P. cinnamomi* a los 8 días del cultivo: **13.** Extracto crudo de hierba del sapo; **14.** Borneol 500 mg/L; **15.** Etanol absoluto.

73

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Algunas plantas mexicanas con propiedades antifúngicas y antioomiceto	17
<b>Cuadro 2.</b> Principales clases de compuestos antimicrobianos en plantas (Cowan, 1999).	18
<b>Cuadro 3.</b> Principales aplicaciones de los aceites esenciales en el mercado	19
<b>Cuadro 4.</b> Clasificación de los terpenos	20
<b>Cuadro 5.</b> Clasificación botánica de nurite	29
<b>Cuadro 6.</b> Clasificación botánica de hierba del sapo	34
<b>Cuadro 7.</b> Medio de cultivo PDA para el crecimiento de hongos y oomicetos	41
<b>Cuadro 8.</b> Reacción de PCR	44
<b>Cuadro 9.</b> Secuencias obtenidas de las regiones ITS1-5.8S-ITS2, de <i>S. macrostema</i> y <i>E. carlinae</i> obtenidas en el presente estudio.	53
<b>Cuadro 10.</b> Compuestos mayoritarios del extracto etanólico de hojas de <i>S. macrostema</i> (Benth) Briq.	60
<b>Cuadro 11.</b> Compuestos mayoritarios del extracto etanólico de hojas y pedúnculos florales de <i>E. carlinae</i> Delar F.	60
<b>Cuadro 12.</b> Terpenoides purificados (TN=nurite, HS=hierba del sapo)	63

**Cuadro 13.** Porcentajes de inhibición ejercidos por los terpenoides extraídos de *S. macrostema* (Benth) Briq. (Nurite) sobre hongos y oomicetos fitopatógenos. L= Limoneno (250 mg/L), F1= Fracción 1, ND= No determinada. \*\*Diferencia significativa, <sup>ns</sup>Diferencia no significativa respecto a ECTN (Extractos crudo de TN: nurite), de acuerdo a un análisis de varianza y a una prueba de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ) por medio del programa Statistica 7.0.

65

**Cuadro 14.** Porcentajes de inhibición ejercidos por los terpenoides extraídos de *E. carlinae* Delar F. (Hierba del sapo) sobre hongos y oomicetos fitopatógenos. ND= No determinada. \*\*Diferencia significativa, <sup>ns</sup>Diferencia no significativa respecto a ECHS (Extractos crudo de HS: hierba del sapo), de acuerdo a un análisis de varianza y a una prueba de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ) por medio del programa Statistica 7.0.

66

**Cuadro 15.** Compuestos (CG/EM) que constituyen los extractos crudos de hojas y tallos de *S. macrostema* (Benth) Briq. (Nurite en distintas etapas de desarrollo.

76

**Cuadro 16.** Compuestos (CG/EM) que constituyen los extractos crudos de hojas y tallos de *E. carlinae* Delar F. (Hierba del sapo) en distintas etapas de desarrollo.

77

## RESUMEN

El desequilibrio ambiental, el peligro a la salud humana y el surgimiento de poblaciones de microorganismos fitopatógenos más agresivas y resistentes causado por el uso desmedido de plaguicidas de síntesis química, ha llevado a la necesidad de buscar alternativas que se inserten en agrosistemas sostenibles. Una de estas alternativas es el uso de compuestos y extractos de origen vegetal que actúen como agentes antimicrobianos o simplemente como reguladores del desarrollo de los microorganismos. Al iniciar el escrutinio de la actividad de sustancias extraídas de las plantas, es indispensable cerciorarse acerca de la clasificación taxonómica correcta de la especie vegetal en estudio, debido a que muchas de las plantas medicinales generalmente están ubicadas dentro de géneros poco estudiados o bien donde existe poca información taxonómica reciente, lo que a menudo ha provocado que la clasificación taxonómica sea ambigua y traiga por consiguiente una serie de problemas al iniciar su uso o su estudio científico para su comercialización. El objetivo de este estudio fue clasificar molecularmente a *Satureja macrostema* (Benth) Briq. y *Eryngium carlinae* Delar F. y evaluar el efecto antimicrobiano de sus terpenoides. En la clasificación molecular de dichas especies vegetales se utilizaron marcadores moleculares por medio de la secuenciación de los espaciadores transcritos internos (ITSs) de su ADN ribosomal nuclear (nrADN), para lo que se amplificaron dichos espaciadores por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la ayuda de iniciadores universales *ITS1* e *ITS4*. El análisis global de las secuencias obtenidas permitió estimar la disimilaridad genética, la divergencia y los porcentajes de identidad. Los valores con los que se pudo ubicar taxonómicamente a los especímenes fueron los porcentajes de identidad de 0 y 100% para *S. macrostema* (Benth) Briq. respecto a la región ITS1-5.8S-ITS2 previamente reportada para *S. macrostema* var. *leavigata*, y 1.6 y 98.4% para *E. carlinae* Delar F. respecto a lo reportado para *E. campestre* respectivamente; de esta manera se clasificó molecularmente a la especies ubicadas mediante taxonomía tradicional como *S. macrostema* (Benth) Briq. como *S. macrostema* var. *leavigata* y *E. carlinae* Delar F. como *E. carlinae*, esta última se reportó en la base de datos del GenBank (accesión EU089972) . Posteriormente a la clasificación molecular se realizó un estudio fitoquímico en el que se identificaron de las extracciones etanólicas mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas

(CG-EM), 26 metabolitos para *S. macrostema* (Benth) Briq. (a partir de hojas) siendo mayoritarios el limoneno y el óxido de piperitona, y 21 metabolitos para *E. carlinae* Delar F. (a partir de hojas más pedúnculos florales), encontrando al mirceno y al borneol como los principales compuestos. Para concluir los estudios fitoquímicos se evaluó la variación en la composición química de los aceites esenciales de plantas en distintos estados de desarrollo y se encontró que la pulegona fue el terpenoide expresado en mayor cantidad en plantas jóvenes de *S. macrostema* (Benth) Briq., disminuyendo su expresión en la etapa adulta; y siendo el germacreno D para *E. carlinae* Delar F. el metabolito principal en plantas antes de la floración y desapareciendo después de la floración. Respecto a la actividad antimicrobiana (antifúngica y antioomiceto), ésta se evaluó mediante la técnica de difusión por discos en agar papa dextrosa (PDA); se ensayaron primeramente los extractos crudos y después los terpenoides purificados de éstos mediante cromatografía en columna (CC), en diferentes dosis (50, 100, 250 y 500 mg/L). En la evaluación antifúngica, la mayor inhibición (100%) fue obtenida con el espatulenol en cualquier dosis (50-500 mg/L) y el óxido de piperitona (100%) en la dosis de 500 mg/L contra *Colletotrichum lindemuthianum*, ejerciendo también una inhibición alta el mentol 500 mg/L (58.5%) contra este mismo microorganismo. Sobre *Botrytis cinerea*, el espatulenol, el óxido de piperitona y el mentol ejercieron una inhibición de 37.8% con dosis de 100, 250 y 500 mg/L respectivamente. Para *Fusarium oxysporum* con el óxido de piperitona con la dosis de 250 mg/L se alcanzó una inhibición 28.8%. Respecto a los extractos crudos de nurite y hierba del sapo, la mayor actividad antifúngica (49.6% y 39.1%) fueron alcanzadas sobre *C. lindemuthianum* y *B. cinerea* respectivamente. La actividad antioomiceto ejercida por los terpenoides de nurite y hierba del sapo fue mucho menor, aquí la pulegona en la dosis de 500 mg/L ejerció un 32.1% de inhibición sobre *Phytophthora cinnamomi*, seguida por el borneol (30.8%) en la misma dosis de 500 mg/L. El espatulenol y el mirceno extraídos de la hierba del sapo en dosis de 500 y 250 mg/L ejercieron (18.1 y 15.3%) sobre *P. capsici*. Los extractos crudos de nurite y hierba del sapo mostraron mayor actividad antioomiceto que los compuestos purificados, ejerciendo sobre *P. cinnamomi* 32.7 y 34.0 % de inhibición respectivamente.

## I. INTRODUCCIÓN

México posee una gran tradición cultural en el aprovechamiento de especies vegetales. A pesar del progreso alcanzado, se estima que el 85% de la población recurre a las plantas medicinales, su importancia es tal que estudios realizados por Betancourt y Gutiérrez (1999) reportan que de manera cotidiana se comercializan frescas y deshidratadas cerca de 250 especies provenientes principalmente de las zonas centro y sur del país, lo cual indica el arraigo cultural que se tiene.

Las propiedades de las plantas se deben a la presencia de metabolitos secundarios que son producidos como respuesta a diferentes tipos de estrés y condiciones de cultivo, resultado de la investigación ahora se sabe que algunos de estos metabolitos secundarios tienen una función importante en la fisiología y comportamiento normal de las plantas ya sea como atrayentes de insectos polinizadores (pigmentos y aromas), o como defensa a plagas y patógenos (fitoalexinas, quitinasas,  $\beta$ -glucanasas, proteinasas, péptidos antimicrobianos, etc.), protección en procesos de cicatrización (resinas y bálsamos), entre otras (Rhodes, 1994; Covian-Nares, 1999).

Las plagas constituyen una de las principales limitantes en la producción agrícola, las enfermedades ocasionadas por hongos y oomicetos causan una disminución considerable en la calidad y cantidad de la cosecha, y representan un gran problema en los campos agrícolas. Hongos de los géneros *Botrytis*, *Colletotrichum* y *Fusarium*, así como oomicetos del género *Phytophthora*, entre otros, son los principales agentes causales de las enfermedades en un gran número de especies vegetales de importancia agrícola en nuestro país como la fresa, el frijol, chile, calabaza, mango y aguacate entre otras (Sánchez-Pérez *et al.*, 2001)

El control de las plagas se ha basado tradicionalmente en el uso de productos químicos sintéticos, muchos de los cuales ha producido como efectos secundarios problemas de desequilibrio ambiental, de salud humana y el surgimiento de poblaciones de plagas más agresivas y resistentes a ellos (FAO, 2002), aunado a este problema se encuentra el deterioro de los productos poscosecha, lo que causa pérdidas significativas en la producción agrícola (García-Chávez *et al.*, 2004a). Estos problemas han llevado a la búsqueda de nuevas alternativas para el control de

plagas que se inserten en el desarrollo de agrosistemas sostenibles basados en un manejo integral del cultivo sin alterar el equilibrio del sistema. Esto ha reorientado la investigación hacia los productos naturales, dentro de los cuales existe un gran interés en el uso de los llamados antimicrobianos naturales como posibles sustitutos de los tradicionalmente utilizados, que sean efectivos o que actúen simplemente como reguladores del crecimiento de los fitopatógenos.

Entre los metabolitos más ampliamente comercializados se encuentran los alcaloides y los aromas, estos últimos almacenados en ciertos tipos de plantas como aceites denominados “aceites esenciales” o terpenoides, compuestos a los que se les atribuye en gran medida la actividad antimicrobiana. Los aceites esenciales son valiosos productos naturales usados como materiales crudos en muchos campos, como las industrias de los perfumes y cosméticos, la aromaterapia, la fitoterapia y usados como condimentos y saborizantes entre otros múltiples usos (Lahlou, 2004).

Muchos de los productos naturales de origen vegetal tienen como característica ser específicos en su acción y presentan vulnerabilidad a los factores medio ambientales, inactivándose en poco tiempo, sin embargo, lo anterior es una gran ventaja desde el punto de vista ecológico ya que debido a su baja persistencia en el ambiente y a su especificidad contra ciertos organismos, protegen a los no patógenos y reducen así su toxicidad hacia los mamíferos y por ende al hombre (Salgado-Garciglia, 1995).

En México se tiene estimado que existen cerca 30,000 especies de plantas, de las cuales en 1997 el Instituto Nacional Indigenista documentó 3,000 con usos medicinales, esto es el 10% del total de la riqueza florística del país. Siendo México un país con una gran diversidad biológica, es de gran importancia continuar con la búsqueda de especies vegetales que puedan ser empleadas como fuente de productos naturales para ser utilizados en distintas áreas como la industria farmacéutica, cosmética, alimentaría, agricultura y medicina entre otras.

Entre las plantas que se distribuyen en el estado de Michoacán y que se han utilizado de manera sobresaliente en la medicina popular destacan *Satureja macrostema* (Benth) Briq. conocida comúnmente con el nombre de nurite y *Eryngium carlinae* Delar F. llamada también hierba del sapo. Los usos de estas plantas han

sido principalmente para trastornos de tipo digestivos y del riñón entre otros ([www.semarnat.gob.mx](http://www.semarnat.gob.mx)).

Antes de iniciar cualquier estudio científico, es indispensable cerciorarse acerca de la clasificación taxonómica correcta de la especie vegetal en estudio, debido a que las plantas medicinales generalmente están ubicadas dentro de géneros poco estudiados o bien donde existe poca información taxonómica reciente, lo que a menudo ha provocado que la clasificación taxonómica sea ambigua. El uso de marcadores moleculares complementa el análisis de clasificación taxonómica de una especie mediante botánica sistemática. Para las especies en estudio *S. macrostema* (Benth) Briq. y *E. carlinae* Delar F., debido a la variación en los caracteres morfológicos, el criterio de ubicación mediante la taxonomía tradicional varía generando confusión de estas especies con otras, lo que representa una serie de problemas al iniciar su uso o su estudio científico para su comercialización. Para los géneros donde se ubican las especies en estudio hay una escasez de datos sobre taxonomía molecular y/o filogenia.

Por todo lo anterior, este trabajo tiene como objetivo clasificar molecularmente a *S. macrostema* (Benth) Briq. Y *E. carlinae* Delar F. y evaluar el efecto antimicrobiano de sus terpenoides.

## II. ANTECEDENTES

### II.1. La revolución verde y las enfermedades

La utilización de las plantas de manera sistemática y controlada con la finalidad de obtener alimentos tanto para consumo humano como animal, tuvo su inicio hace algunos 10,000 años. A escala mundial, el 88% de las calorías y el 90% de las proteínas de la alimentación humana provienen directamente de los vegetales (FAO, 2002).

En los años 50 surgió en México un movimiento que se denominó “revolución verde” y que más tarde se propagó por todo el mundo, este movimiento tuvo como principal objetivo aumentar la producción agrícola con la finalidad de disminuir el hambre en el mundo, si a principios de la década de los 50 en el mundo se producía cerca de 14 millones de toneladas de alimento, se pasó a 144 millones en 1990. El gran impulso que tuvo la agricultura durante la revolución verde se basaba en cuatro pilares fundamentales: a) la utilización de variedades mejoradas mediante entrecruzamiento; b) la utilización de fertilizantes y pesticidas; c) la irrigación; y d) el empleo de maquinaria agrícola y no de fuerza humana o animal. Como consecuencia de la implantación de estas técnicas, la producción de alimentos aumentó de manera muy importante en 30 años, aunque el hambre solo logró bajar un 20%. Esto se debió en gran parte a los problemas de distribución y almacenamiento de las cosechas, y a la inaccesibilidad de los pequeños agricultores a las nuevas técnicas de cultivo y a los productos químicos que les permitirían aumentar su producción. Aunque la revolución verde tuvo un impacto importante en la agricultura y la producción de alimentos, también vino a generar nuevos problemas, tales como el uso extensivo de monocultivos, el aumento en los costos de producción y los efectos negativos que estas prácticas ocasionaban en el ambiente. Por ejemplo, se produjo una importante salinización de la tierra, erosión del suelo, agotamiento de las fuentes de agua y nutrientes del suelo, y la aparición de especies resistentes a los pesticidas (Badii *et al.*, 1996).

Todos estos efectos adversos impactaron y están impactando de manera significativa la sostenibilidad de la agricultura, causando la inestabilidad de los cultivos, la cual se manifiesta además de los efectos nocivos antes mencionados, en una mayor incidencia de plagas y enfermedades en los cultivos. Esto y los

problemas de seguridad y salud pública inherentes a la fabricación y uso de agroquímicos han conducido a la búsqueda y establecimiento de alternativas de manejo de plagas y enfermedades. El uso de los plaguicidas se ha multiplicado por 32 entre 1950 y 1986, y los países en desarrollo ocupan una cuarta parte del uso mundial de plaguicidas, pero un uso inadecuado y excesivo puede contaminar los alimentos y el medio ambiente y, en algunos casos, dañar la salud de los agricultores. Los plaguicidas también matan a los enemigos naturales de las plagas, lo que permite a éstas multiplicarse, y la cantidad de especies de plagas resistentes a los plaguicidas ha aumentado desde unas pocas de hace 50 años hasta 700 actualmente (FAO, 2002).

Las enfermedades de las plantas son uno de los principales problemas que se tiene que afrontar en la agricultura porque reducen las cosechas, desmejoran la calidad del producto, limitan al mismo tiempo la disponibilidad de alimentos y materias primas para una serie de industrias. Para las personas que dependen de la agricultura, las enfermedades de las plantas pueden marcar la diferencia entre una vida normal y una acosada por el hambre, incluso la muerte por inanición, como la muerte de 250,000 Irlandeses en 1845 como consecuencia del tizón tardío de la papa, y gran parte del hambre que padecen en la actualidad millones de personas que viven en las regiones rurales subdesarrolladas, son ejemplos tristes de las consecuencias de las enfermedades de las plantas (Manners, 1993).

Aún en los países desarrollados, los cuales cuentan con grandes recursos tecnológicos, se habla de pérdidas económicas que fluctúan entre un 32 y 33% de la producción total debido a enfermedades en las plantas, lo que propicia el aumento en el precio de los productos y destruye la belleza del ambiente al dañar a las plantas ornamentales de las casas, parques avenidas y bosques (Manners, 1993).

Las enfermedades de las plantas reducen la variedad de éstas que puedan desarrollarse en una determinada zona geográfica al destruir a todas las plantas de ciertas especies susceptibles a una enfermedad particular. Por ejemplo, el castaño americano fue aniquilado de los bosques de Norteamérica por el tizón del castaño causado por *Endothia parasitica*. Las enfermedades de plantas también han hecho cambiar las costumbres de los pueblos, por ejemplo, algunos países han tenido que sustituir el trigo por el centeno o maíz debido a la roya negra del trigo (*Puccinia*

*graminis*). En Inglaterra en el siglo XIX el café fue sustituido por el té debido a que los cafetales en una de sus colonias en Ceilán (actual Sri Lanka) fueron arrasados por las royas (*Hemileia vastatrix*). En Centroamérica el mal de Panamá, causado por *Fusarium oxysporum fsp. cubense*, obligó a muchos países a dejar de cultivar plátanos. En el Perú se promocionó el cultivo del lino durante la segunda guerra mundial, pero en muy poco tiempo fue prácticamente arrasado por el *Fusarium oxysporum fsp. lini* (Agrios, 1999; FAO, 2002).

Así, surge el interés por el control ecológico que puede definirse como cualquier forma de control que reduce la incidencia o severidad de la enfermedad, o incrementa la producción del cultivo, aún cuando no haya aparentemente un efecto significativo en la reducción de la enfermedad o inóculo, y su impacto nocivo en el ambiente sea mínimo o nulo. Sin embargo, un manejo de las enfermedades de los cultivos que sea ambientalmente sano y racional se podrá lograr primero aceptando que el objetivo principal no debe de ser el de eliminar al patógeno responsable de la enfermedad sino más bien que a pesar de su presencia se logre obtener rendimientos económicamente redituables para el agricultor. Y segundo, entendiendo más acerca de la naturaleza de la enfermedad y de la fisiología de la planta (Zavaleta-Mejía, 2000).

Los sistemas biológicos de control, como el uso de enemigos naturales de las plagas, son útiles. En India las semillas del árbol nim (*Azadirachta indica*) se usan como insecticida natural para proteger las cosechas y los granos almacenados. Los investigadores han encontrado que las sustancias activas pueden controlar más de 200 especies de plagas, inclusive plagas importantes como las langostas, los gorgojos del maíz y los gusanos del arroz, pero sin dañar a las aves, los mamíferos ni a los insectos benéficos como las abejas (FAO, 2002).

Las enfermedades vegetales producidas por hongos y oomicetos son causa de pérdidas económicas en la agricultura. Se han descrito unas doscientas especies entre hongos y oomicetos como patógenos causantes de enfermedades importantes de los cultivos; éstas pertenecen principalmente a diez géneros (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Helminthosporum*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Pythium* y *Phytophthora*) (Sánchez-Pérez *et al.*, 2001). Según la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación en

México (SAGARPA) ([www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx)), estos microorganismos fitopatógenos han causado graves problemas en cultivos de gran importancia como la papa, aguacate, soya, calabaza, lenteja, tomates, cebolla, café, sandía, melón, frijol, fresa, zanahoria, pepino y mango, causados principalmente por hongos.

En México se han identificado un gran número de enfermedades causadas por hongos y oomicetos patógenos, que con diversa intensidad afectan a los diferentes cultivos. Entre las enfermedades más importantes podemos mencionar a la “tristeza del aguacatero” ocasionada por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi*, la “roya o chahuixtle” del ciruelo, ocasionada por el hongo *Tranzchelia discolor*, la “antracnosis” del mango y del frijol, ocasionada por el hongo *Colletotrichum gloesporioides* y *Colletotrichum lindemuthianum* respectivamente (Mendoza-Zamora, 1991).

#### **II.1.1. Características de *Fusarium oxysporum* y enfermedades que ocasiona**

*Fusarium* es un género de hongos de distribución universal, ubicuos y con gran importancia económica ya que son habitualmente fitopatógenos. Su amplia distribución se atribuye a su capacidad para crecer en gran número de substratos y a su eficaz mecanismo de dispersión; el viento y la lluvia juegan un importante papel en su diseminación. Se ha demostrado que el aire puede llevar las esporas hasta 400 km de distancia (Nelson *et al.*, 1994).

*F. oxysporum* es un hongo de distribución universal. Se aísla como saprófito del suelo y de numerosas plantas. Son patógenos de cultivos como la papa, girasol, espárrago, apio, col, cilantro, pepinillo, aguacate, clavel, eucalipto, soya, uva, calabaza, lenteja, tomate, camote, algodón, cebolla, café, berenjena, nuez, tabaco, sandía, tuna, frijol, coníferas, roble y rábanos entre otros (Menzies y Jarvis, 1994; Khalid *et al.*, 1996; Katan, 1999; Hua-Van *et al.*, 2001; González *et al.*, 2005). Causa grandes pérdidas económicas, es muy abundante en las zonas templadas y tropicales, ocasionando distintos tipos de enfermedades tales como: marchitamiento en las hojas, vasculares, pudrición de frutos, incluso la muerte de las plantas, gracias a los diversos mecanismos que tiene el hongo para vencer las defensas de muchos hospedadores. *F. oxysporum* existe en muchas formas patógenas, parasitando a más de 100 especies de Gimnospermas y Angiospermas, que en

general invaden los vasos del xilema provocando las enfermedades conocidas como fusariosis vasculares (González *et al.*, 2005 Stewart *et al.*, 2006).

*F. oxysporum* tiene una gran variedad morfológica y sufre frecuentes mutaciones en cultivo, apareciendo progresivamente más micelio y desapareciendo las esporodocias y la coloración. En agar papa dextrosa (PDA) presenta un crecimiento rápido, al principio la colonia es lisa y algodonosa. Con el tiempo toma un aspecto como el fieltro, de color blanco o salmón pálido, tiñéndose de púrpura en su zona central. El reverso es púrpura o azul oscuro. Produce un pigmento púrpura-violeta que difunde al medio (Nelson *et al.*, 1994).

### **II.1.2. Características de *Botrytis cinerea* y enfermedades que ocasiona**

Las enfermedades causadas por *Botrytis* quizá sean las más comunes y más ampliamente distribuidas de las hortalizas, plantas ornamentales, frutales, etc., aparecen principalmente en forma de tizones de inflorescencias y pudriciones del fruto, pero también como chanchos o pudriciones del tallo, ahogamiento de las plántulas, manchas foliares y como pudriciones del tubérculo, como un bulbo y raíces. Bajo condiciones húmedas el hongo produce una capa fructífera conspicua de moho gris sobre los tejidos afectados (Van, 2006; Asselbergh *et al.*, 2007).

Algunas de las enfermedades más importantes ocasionadas por *Botrytis* incluyen al moho gris de la fresa, la pudrición por el moho gris de las hortalizas tales como frijol, col, zanahoria, pepino y berenjena, la pudrición del extremo de la punta de los plátanos, lechuga, pimiento, calabaza, tomate, etc., la pudrición del cuello y tizón de la cebolla, la pudrición del extremo del cáliz de las manzanas, el tizón de las ramitas e inflorescencias de arándanos, el tizón o moho gris de plantas ornamentales como la violeta africana, begonia, ciclamino, crisantemo, dalia, geranio, jacinto, lirio, rosal, tulipán, etc. *Botrytis* también ocasiona las pudriciones blandas secundarias de frutos y hortalizas cuando se almacenan, transportan y venden en el mercado (Van, 2006; Asselbergh *et al.*, 2007).

*B. cinerea* es un saprófito nato capaz de provocar grandes daños en numerosos cultivos. Cuando las solanáceas hortícolas vegetan bien no son casi afectadas.

Pero, por el contrario, cuando los días son cortos, la luminosidad escasa y las temperaturas son del orden de 15-20° C, las plantas pueden sufrir graves daños. *B. cinerea* precisa de bases nutritivas formadas por hojas senescentes, flores no fecundadas, heridas o muñones de hojas resultantes de las podas, es decir materia orgánica muerta, para poder iniciar la invasión de las partes vivas de la planta. Un síntoma particularmente sorprendente en los frutos es el denominado "mancha fantasma"; en realidad, se trata de ataques de *Botrytis* abortados, alrededor de un punto central muy pequeño y necrótico se observa un tenue anillo de 5 a 10 mm de diámetro, blanquecino sobre el fruto verde y amarillo en el fruto maduro. La calidad gustativa del fruto no sufre, pero si la presentación (Benito *et al.*, 2000)

### **II.1.3. Características de *Colletotrichum lindemuthianum* y enfermedades que ocasiona**

Uno de los hongos que provocan pérdidas en el rendimiento del frijol es *C. lindemuthianum*, causante de la enfermedad conocida como antracnosis, si las condiciones ambientales le son favorables (95% humedad, 16-25°C) ocasiona pérdidas hasta del 100%, es una enfermedad que produce lesiones en la parte aérea de la planta, siendo la vaina donde el daño es el más notorio. La antracnosis es una enfermedad que afecta tanto las partes vegetativas como las semillas de la planta. Desarrolla síntomas característicos parecidos a úlceras, de ahí el nombre de la enfermedad propuesto por Scribner el cual proviene del griego y significa "úlceras" (Tu, 1992).

*C. lindemuthianum* es un hongo fitopatógeno el cual produce micelio septado y ramificado, cuyo color cambia desde hialino hasta casi negro durante la madurez. Las conidias (estructuras de reproducción asexual) son unicelulares, hialinas de tamaño de 4 a 5 µm por 13 a 22 µm, en la parte central tienen una zona clara que a simple vista parece una vacuola. La forma de las conidias puede ser ya sea oblongas, cilíndricas, arriñonadas o en forma de S, sus puntas son redondeadas (Perfect *et al.*, 1999, Luna-Martínez *et al.*, 2007).

Las especies que pertenecen al género *Colletotrichum* causan antracnosis en un amplio rango de cultivos y plantas ornamentales, entre las que destacan *C. lindemuthianum* (*Phaseolus vulgaris*); *C. graminicola* (*Zea mays*); *C. sublineolum*

(*Sorghum bicolor*); *C. gloesporioides* (*Carica papaya*, *Citrus* spp.); *C. acutatum* (aguacate, mango, fresa, manzana, pera); *C. fragariae* (Fresa); *C. coccodes* (Papa); *C. coffanum* (Café); *C. phomoides* (Tomate) (Freeman *et al.*, 1998; Perfect *et al.*, 1999).

Aunque su principal huésped es el frijol común, *C. lindemuthianum* puede infectar muchas especies del género *Phaseolus* como son: *P. acutifolius*, variedades *latifolius* Fre, *P. coccinueus* L., *P. lunatus* L., *P. aureus* Roxlo, *P. limensis* Macf., *Vigna unguiculata* (L.) Walpers y *Vicia faba* L. (Muñoz *et al.* 2003).

#### **II.1.4. Características de *Phytophthora* spp. y enfermedades que ocasiona**

Los miembros del género *Phytophthora*, son los causantes de las más serias amenazas a la agricultura, causando enfermedades devastadoras en cientos de plantas hospederas, estos eucariontes antes clasificados como hongos, son taxonómicamente clasificados como oomicetos, generan esporas tanto sexuales como asexuales con características que contribuyen en gran parte al éxito en su patogenicidad. Las esporas incluyen estructuras de supervivencia y dispersión, y potentes propagulos infecciosos capaces de localizar activamente a los hospederos (Judelson y Blanco, 2005).

Los oomicetos representan un grupo diverso de organismos que incluye patógenos de plantas y animales, así como especies saprofíticas (mohos del agua) (Margulis y Schwarts, 2000). Pertenecen al reino *Stramenipilia*, no emparentados con los hongos verdaderos pero estrechamente relacionados con las algas café, la confirmación en la clasificación de estos organismos ha sido bien establecida utilizando herramientas genéticas, dichos métodos incluyen acercamientos mediante la transformación de ADN, filogenias moleculares que se basan en secuencias de ARN ribosomal (ARNr) (Kumar y Rzhetsky; 1996; Paquin *et al.*, 1997; Judelson y Blanco, 2005).

#### II.1.4.1. *Phytophthora capsici* Leonian

La incidencia de la enfermedad marchitez del chile (*Capsicum annuum*) causada por el oomiceto *Phytophthora capsici* Leo., constituye a nivel nacional, uno de los principales problemas que afectan la productividad del cultivo; se estima que el efecto de esta enfermedad sobre la disminución de la densidad de plantación es del 10 a 60 % y en zonas como el Bajío y Puebla, hasta un 100% de mortalidad. El agente causal se aisló por primera vez en Nuevo México, EUA, en pimiento (Leonian, 1922); después en otros hospedantes como berenjena, calabacita, melón, jitomate, cacao, macadamia, fresa, pepino y sandía (Pérez-Moreno *et al.*, 2004).

El patógeno habita en el suelo y afecta principalmente las raíces y la base del tallo de la planta, aunque también puede atacar las partes aéreas. Los síntomas iniciales son necrosamiento y pudrición de raíces secundarias y terciarias que son las que se encargan de la absorción de agua, luego se presenta la marchitez de plantas y posteriormente pudrición de frutos, la muerte de la planta es ocasionada por avance del oomiceto a través del pedúnculo del fruto, ramas y tallo (Babadoost y Islam, 2003)

Bajo condiciones favorables de temperatura (25 a 28°C) y alta humedad del suelo, *P. capsici* es sumamente agresivo, capaz de destruir campos enteros de los hospedantes mencionados en corto tiempo (Romero, 1988). Este oomiceto sobrevive de un ciclo a otro en el suelo en forma de oosporas. El control de esta enfermedad ha sido tradicionalmente difícil, no habiendo hasta la fecha un manejo integral de la misma; pues por una parte no se tienen materiales comerciales resistentes, el control cultural no es totalmente efectivo, ya que muchos productores no siguen las recomendaciones de usar semilla sana, evitar encharcamientos de agua, hacer surcos altos y con alta pendiente, eliminar plantas enfermas y hacer rotación de cultivos, y finalmente, el control químico es deficiente, debido principalmente a las interacciones con organismos que lesionan la raíz, además que el oomiceto tiene una respuesta variable a los productos químicos empleados y puede desarrollar resistencia a los mismos (Pérez-Moreno *et al.*, 2004).

#### **II.1.4.2. *Phytophthora cinnamomi* Rands**

El oomiceto *P. cinnamomi* es el causante de la enfermedad conocida como "tristeza del aguacatero", tiene una distribución mundial, se ha detectado en más de 70 países, ataca un amplio rango de hospederos, mas de 1000 especies (Zentmyer, 1985). Este oomiceto causó la mayor pérdida en la historia de la industria aguacatera en California, Estados Unidos en la década de los setentas, con una reducción severa en la producción. Actualmente en ese país ocasiona pérdidas anuales de 30 millones de dólares (Coffey, 1992).

En México, el oomiceto se ha detectado en las zonas aguacateras de Michoacán, Puebla, Chiapas, Veracruz, Nayarit, Morelos, Querétaro y en Guanajuato. En Morelos y Puebla la incidencia fluctúa entre el 45 y el 90%. En Michoacán, en 1979 se reportaron 13 mil árboles dañados en suelos pobres en materia orgánica (Vidales-Fernández, 2002).

Partiendo de datos de temperatura, *P. cinnamomi* se desarrolla mejor en regiones templadas benignas o subtropicales, no se desarrolla o sobrevive a bajas temperaturas del suelo (debajo de 6° C) ó a altas temperaturas del suelo (arriba de 34-36° C). Las temperaturas óptimas están en el rango de 21-27 °C. Períodos abundantes de humedad en el suelo, promueven la producción de esporangios, liberación de zoosporas, e invasión de las raíces hospederas de *P. cinnamomi*; no se desarrolla sin embargo, bajo condiciones de suelo continuamente saturado de agua con las consecuentes bajas concentraciones de oxígeno. Produce enfermedad más rápidamente bajo condiciones de suelo de pH ligeramente ácido a neutro (Vidales-Fernández, 2002).

#### **II.2. Mecanismo de defensa en plantas**

Las plantas, como otros seres vivos, están constantemente expuestas a una gran variedad de situaciones ambientales, en muchas ocasiones adversas, y a agresiones causadas por organismos de su entorno, a las cuales deben responder y adaptarse para sobrevivir. Una misma planta puede ser afectada por cientos de diferentes organismos potencialmente perjudiciales, desde agentes infecciosos (virus, bacterias, hongos y oomicetos) hasta organismos consumidores de vegetales

(insectos y nemátodos). Cualquiera de estos organismos es capaz de interferir de una u otra manera en los procesos naturales del desarrollo, crecimiento o reproducción en una planta. La mayoría de estos organismos invade una parte específica de la planta y produce una serie de síntomas típicos como necrosis, manchas, secado de hojas y alteraciones en las raíces. La manera en que estos microorganismos atacan a la planta es de acuerdo a la naturaleza del organismo, de esta manera un primer grupo de patógenos, en su mayoría hongos y nemátodos, penetran directamente las capas superficiales por presión mecánica o mediante ataque enzimático; un segundo grupo de especies pasan a través de aperturas naturales (como los estomas y lenticelas); y un tercer grupo de patógenos, son capaces de alcanzar el interior de la planta a través de vectores, es el caso de muchos virus que son introducidos directamente en el floema de muchas plantas por la acción de insectos y otras especies chupadoras tales como pulgones (Berenbaum, 1995; Osbourn, 1996).

Las plantas pueden perder porciones considerables de su estructura sin que ello traiga consigo problemas de supervivencia, pudiendo inducir la muerte de órganos invadidos por el patógeno para evitar la propagación de éste al resto de la planta, este fenómeno es conocido como respuesta hipersensible (HR). Es el más utilizado por las plantas para defenderse en contra de los organismos patógenos. Este tipo de defensa puede activar otros mecanismos como la resistencia sistémica adquirida (SAR), que consiste en la generación de resistencias frente a futuros patógenos de células de la planta que no han estado en contacto con éste (Vallad y Goodman, 2004).

Cuando se produce el ataque por un patógeno se activan rápidamente una serie de respuestas de defensa, tanto a nivel local como sistémico (por toda la planta, incluso en partes que no han sido infectadas) (Hammod-Kosack y Park, 2003). Las plantas presentan una primera línea de defensa (defensa pasiva) basada en la existencia de barreras físicas y/o bioquímicas, las barreras físicas tienen como objetivo impedir la entrada del patógeno en el interior de la planta, y están formadas por las ceras (mezcla de lípidos de cadena larga como alcanos y ésteres de ácidos grasos) y la cutícula (polímero de ácidos grasos hidroxilados de cadena larga) de la superficie de las hojas; por la estructura de las paredes celulares (principalmente por la pared

exterior de las células de la epidermis); y por el tamaño y forma de los estomas (Berenbaum, 1995; Vallad y Goodman, 2004).

Las barreras bioquímicas consisten en la acumulación de compuestos en los tejidos vegetales que pueden resultar tóxicos para microorganismos o fitófagos. Así, en muchos órganos (frutos, hojas y tubérculos) se acumulan compuestos fenólicos, taninos y enzimas hidrolíticas en elevadas concentraciones que pueden poseer actividades antimicrobianas frente a fitopatógenos. No está claro sin embargo, que una planta sea resistente a un patógeno concreto por el mero hecho de acumular este tipo de compuestos (Berenbaum, 1995; Vallad y Goodman, 2004).

Por otro lado, además de las defensas constitutivas, la mayoría de las plantas también responden al ataque de un patógeno activando una serie de respuestas que se conocen como defensa general o defensa inducida (Osbourn, 1996). Estas respuestas están asociadas a cambios importantes en la expresión génica y son inducidas por la presencia del patógeno. La respuesta de defensa inducida también va acompañada de cambios estructurales y bioquímicos. Entre las alteraciones estructurales más importantes se observa un reforzamiento de la pared celular, lignificación y deposición de callosa, así como la acumulación de proteínas estructurales de pared (proteínas ricas en hidroxiprolina, glicina y prolina) y deposición de resina en los espacios intercelulares. Todas estas alteraciones ocurren en la proximidad del punto de infección con el objetivo de aislar el patógeno y de impedir el flujo de nutrientes y agua provenientes de las células vecinas.

Las alteraciones bioquímicas se basan en la síntesis de compuestos antimicrobianos de manera muy diversa que posee un efecto nocivo directo sobre el patógeno: en el proceso que va desde el reconocimiento hasta la producción de estos compuestos con actividad antimicrobiana se pueden diferenciar las siguientes etapas (Vallad y Goodman, 2004; Moreno, 2006):

1). Reconocimiento entre la planta y el patógeno. Para que un patógeno sea capaz de infectar una planta, este tiene que reconocerla como huésped. Esto ocurre a través de moléculas o estructuras específicas que existen en la superficie de la planta (factores de reconocimiento). Si no se produce este reconocimiento, el patógeno no es capaz de adherirse a su superficie y no produce las sustancias

(enzimas hidrolíticas, toxinas) o estructuras necesarias para que ocurra la infección. Por otro lado para que haya una respuesta de defensa efectiva por parte de la planta, ésta también debe detectar y reconocer el patógeno de manera rápida para que se pueda desencadenar una respuesta adecuada en el menor tiempo posible. En la mayoría de los casos, la respuesta que se desencadena por parte de la planta es de tipo general e inespecífica.

2). Transmisión de la señal hasta el núcleo. Como resultado del reconocimiento del patógeno por la planta, se desencadenan una serie de reacciones que llevan a la activación transcripcional de los genes de defensa. Lo primero que se observa son alteraciones en los niveles intracelulares de iones como la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{H}^+$ , y la salida de  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , un aumento en los niveles de óxido nítrico y la acumulación y producción de especies reactivas de oxígeno que tienen la doble función de atacar al patógeno y de actuar como moléculas señalizadoras en la respuesta defensiva.

3). Acumulación de compuestos antimicrobianos. Como consecuencia de la activación de la respuesta de defensa, se acumulan en la célula vegetal, diversos compuestos con actividad antimicrobiana. Entre ellos podemos destacar las fitoalexinas, compuestos fenólicos que se producen en las células adyacentes a la célula infectada y dañada, como respuesta a señales que difunden de estas. Otro grupo importante de proteínas que se sintetizan en la respuesta de defensa son las clasificadas de forma genérica como proteínas asociadas a la patogénesis.

### **II.3. Metabolitos secundarios de origen vegetal**

Se estima que en la tierra existen de 250,000 a 500,000 especies de plantas vasculares, de las cuales entre 1 y el 10% se usa como alimento por los mamíferos incluido el hombre y solo entre el 1 y 5% han sido involucradas en alguna investigación para la comercialización de productos, estos hechos presentan el gran potencial de estudio que ofrece el universo vegetal (Cowan, 1999).

Las plantas son consideradas como una famosa fábrica química para la biosíntesis de un enorme arreglo de metabolitos secundarios, se estima que son cerca de 100,000 los productos naturales de bajo peso molecular que las plantas sintetizan, muchas de estas sustancias son fenoles o sus derivados oxigenados sustituidos.

Como ya se ha mencionado en muchos de los casos estas sustancias sirven a la planta como mecanismo de defensa ante el ataque de microorganismos, insectos y herbívoros, algunos de estas como los terpenoides y los aceites esenciales dan a la planta sus olores característicos y en algunos su sabor; otros como las quinonas y los taninos son los responsables de la pigmentación (Cowan, 1999; Dixon, 2001). Sin lugar a dudas, las plantas constituyen un grupo químico diverso que incluye a los alcaloides, flavonoides, glicósidos, fenoles, saponinas, esteroides, aceites, resinas y terpenoides, los cuales son muy utilizados en la industria de la transformación (Covián-Nares, 1999).

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde hace miles de años. Durante mucho tiempo los remedios naturales, sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso terapéutico disponible. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y se ampliara la experiencia en el empleo de los productos que se extraen a partir de ellas (Newman *et al.*, 2000). En la medicina moderna, la cuarta parte de las sustancias son de origen vegetal, para un total de 4500 sustancias naturales. Si bien es cierto que durante el progreso de la industria sintética, se dejó de utilizar una parte considerable de las sustancias vegetales, en la actualidad, debido a los efectos adversos de una elevada cantidad de fármacos sintéticos, así como por la gran demanda de fármacos menos nocivos y más naturales, existe un crecimiento notable de remedios farmacológicos elaborados, en su mayor parte, con sustancias de origen vegetal (Pino-Rodríguez *et al.*, 2004).

De acuerdo a lo reportado por Damián-Badillo (2007), un total de 3,000 especies son empleadas por aproximadamente 62 grupos étnicos mexicanos, pero sólo el 1% de estas plantas se han estudiado exhaustivamente, del resto de plantas se desconocen sus principios activos y los posibles beneficios en la salud humana y en la agricultura. Se han encontrado numerosas especies de plantas mexicanas que contienen metabolitos antifúngicos, destacando las que pertenecen a la familia Asteraceae, Labiatae, Fabaceae y Brassicaceae, que han sido analizadas y se ha determinado cuáles son sus principios activos antifúngicos (Cuadro 1). Recientemente se ha demostrado el efecto fungicida de la mezcla de los metabolitos secundarios afinina, decatrienato de bornilo (sintetizados en las raíces de *Heliopsis*

*longipes* 'A. Gray' Blake, chilcuague), y epóxido de timol (metabolito acumulado en flores de *Helenium mexicanum* H.B.K., cabezona). En bioensayos *in vitro*, la mezcla inhibió el desarrollo del hongo patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*, con lo cual se propuso a estos metabolitos para utilizarse como antifúngicos en plantas de frijol (Covián-Nares, 1999).

En cuanto a sus propiedades antimicrobianas, éstas se atribuyen fundamentalmente a algunos de sus componentes, entre los que destacan: terpenos, aceites esenciales, cumarinas y flavonoides (Cuadro 2). Junto a su actividad antimicrobiana los extractos naturales poseen otras aplicaciones, entre las que podemos destacar: antiinflamatoria, inmunomoduladoras, espasmolíticas y sedantes (Cowan, 1999).

Cuadro 1. Algunas plantas mexicanas con propiedades antifúngicas y antioomiceto

ESPECIE VEGETAL	COMPUESTO	HONGO Y/O OOMICETO
<i>Asclepias curassavica</i>	Terpenos Cardenólidos	<i>C. albicans</i>
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Terpenos	<i>R. solani</i>
<i>Heliopsis longipes</i>	Afinina	<i>C. lindemuthianum</i> <i>C. gloeosporioides</i> <i>P. cinnamomi</i>
<i>Persea americana</i> Mill.	(E,Z,Z)-1-Acetoxi-2-hidroxi- 4-oxoheneicosá- 5,12,15-trieno	<i>C. gloeosporioides</i>
<i>Flourensia cernua</i> <i>Origanum majorana</i> <i>Bouvardia ternifolia</i>	Aceites esenciales	<i>R. solani</i> <i>P. infestans</i>
<i>Eupatorium aschenbornianum</i>	Benzofuranos	<i>Tricophyton</i> <i>mentagrophytes</i> <i>T. rubrum</i>
<i>Larrea tridentata</i>	Resina	<i>Pythium</i> sp
<i>Tagetes lucida</i>	6,7-dimetoxi-4 metilcumarina. Escoparona	<i>F. moniliforme</i> <i>F. sporotrichum</i> <i>R. solani</i>

### II.3.1. Aceites esenciales

Los aceites esenciales se definen como las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables con agua o en corriente de vapor, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), alimentaria (condimentos y

saborizantes) y farmacéutica (principios activos y saborizantes). Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de más de 100 componentes que pueden tener la siguiente naturaleza química: compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos) y fenilpropanoides (Palá-Paúl, 2002).

Cuadro 2. Principales clases de compuestos antimicrobianos en plantas (Cowan, 1999).

CLASE	SUBCLASE	EJEMPLO (S)	MECANISMO
Fenólicos	Fenoles simples	Catecol. Epicatequina.	Privación del sustrato. Disrupción de la membrana.
	Ácidos fenólicos	Ácido cinámico.	
	Quinonas	Hipericina.	Unión a las adhesinas, complejo con la pared celular, inactivación de enzimas.
	Flavonoides	Crisina.	Unión a las adhesinas.
	Flavonas	Abisinona.	Complejo con pared celular, inactivación de enzimas, Inhibición de la transcriptasa reversa HIV.
	Flavonoles	Totarol.	?
	Taninos	Elagitanina.	Unión a proteínas, unión a adhesinas, Inhibición de enzimas, Privación del sustrato, complejo con la pared celular, disrupción de la membrana, complejo con iones metálicos.
	Cumarinas	Warfarina.	Interacción con ADN eucariótico (actividad antiviral).
Terpenoides, aceites esenciales		Capsaicina.	Disrupción de la membrana.
Alcaloides		Berberina. Piperina.	Intercalación en la pared celular y/o ADN.
Lectinas y polipéptidos		Aglutinina manosa-especifica. Fabatina.	Bloquea la fusión viral o adsorción Formación de puentes disulfuro
Poliacetilenos		8S-Heptadeca-2(Z),9(Z)-dieno- 4,6-diacetileno-1,8-diol.	?

Los aceites esenciales están constituidos por componentes volátiles o metabolitos secundarios sintetizados a partir de distintas rutas metabólicas:

- 1.- Vía metabólica del **ácido mevalónico**: Terpenoides.
- 2.- Vía metabólica del **ácido siquímico**: Fenilpropanoides.
- 3.- Vía metabólica de biosíntesis de **ácidos grasos**: Compuestos alicíclico.

Los metabolitos secundarios contenidos en los aceites esenciales juegan un papel crucial en la vida de la planta ya que muchos de ellos tienen importantes funciones en el metabolismo básico y especializado, la mayoría actuando como agentes directos de defensa porque exhiben a menudo efectos tóxicos y disuasivos contra patógenos y herbívoros. Además, ya que casi todos son terpenos tienen una presión de vapor alta, debido a esta propiedad se pueden volatilizar fácilmente a temperatura ambiente, actuando a distancias lejanas de las plantas, sirviendo como atracción para los polinizadores o impidiendo el daño por herbívoros (Chen *et al.*, 2004).

Los usos que estas mezclas de sustancias han recibido a lo largo de su historia, han sido muy variados. La primera y más rentable de sus aplicaciones fue el uso como perfumes o fragancias, incluso en la actualidad es conocida la importancia de la industria perfumera y cosmética en su intento de encontrar nuevas fragancias. Sin embargo, el hombre, a lo largo de la historia, ha puesto de manifiesto otras propiedades de los aceites esenciales, en ocasiones por simple casualidad y en otras tras múltiples experimentos. En medicina popular o etnobotánica han sido demostradas las propiedades de los extractos de algunas especies (Palá-Paúl, 2002). El uso de los aceites esenciales no se limita a estas aplicaciones. En el Cuadro 3 se describe una breve selección de las industrias que utilizan los aceites esenciales directa o indirectamente (Palá-Paúl, 2002).

Cuadro 3. Principales aplicaciones de los aceites esenciales en el mercado

1.- ADHESIVOS Pegamentos para porcelanas y caucho.	8.- INSECTICIDAS Repelentes, aromatizantes.
2.- INDUSTRIA ALIMENTARIA ANIMAL Comidas preparadas y piensos.	9.- INDUSTRIA ALIMENTARIA Aromatizantes, saborizantes, bebidas, sopas, adobos...
3.- INDUSTRIA AUTOMOVILÍSTICA Limpiaparabrisas y ambientadores.	10.- PRODUCTOS DE LIMPIEZA Aromatizantes.
4.- REPOSTERÍA Condimentos, saborizantes y aromatizantes.	11.- PINTURA Disolventes, barnices.
5.- CHICLES Saborizantes.	12.- PERFUMERIA Y COSMÉTICA Aromatizantes, colorantes.
6.- CONDIMENTOS Saborizantes, colorantes.	13.- INDUSTRIA FARMACÉUTICA Principios activos, aromatizantes, saborizantes, colorantes.
7.- DENTÍFRICOS Saborizantes, colorantes.	14.- INDUSTRIA TABAQUERA. Aromatizantes.

### II.3.1.1. Localización

Generalmente, la síntesis y acumulación de los aceites esenciales se asocia a la presencia de estructuras histológicas especializadas, a menudo localizadas sobre o en la proximidad de la superficie de la planta; células con aceites esenciales de las Lauraceae o las Zingiberaceae, pelos secretores de las Lamiaceae, glándulas secretoras de las Myrtaceae o las Rutaceae, canales secretores de las Apiaceae o las Asteraceae. Los aceites esenciales se pueden aislar de diferentes partes de la planta: en las hojas (albahaca, eucalipto, hierbabuena, mejorana, menta, romero, salvia, toronjil, etc.); en las raíces (azafrán, jengibre, valeriana etc.); en el pericarpio del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.); en las semillas (anís, hinojo, comino, etc.); en el tallo (canela); en las flores (árnica, lavanda, manzanilla, tomillo, clavo de olor, rosa, etc.); y en los frutos (cilantro, laurel, nuez moscada, perejil, pimienta, etc.) (Shiva-Ramayoni, 2007).

### II.3.2. Terpenoides

Los isoprenoides, más conocidos como terpenos o terpenoides, son un grupo de productos naturales que incluyen todas aquellas sustancias químicas que derivan biosintéticamente del ácido mevalónico y que origina el isopentenil pirofosfato (Figura 1). Wallach (1887) citado por Palá-Paúl (2002), propuso la clasificación de este grupo de compuestos atendiendo al número de átomos de carbono de los mismos (Cuadro 4). Cada uno de estos grupos se puede subdividir a su vez atendiendo a caracteres estructurales o según la importancia del grupo funcional principal. De esta forma se puede llegar a diferenciar, como en el caso de los monoterpenos, entre regulares, irregulares, acíclicos, monocíclicos y bicíclicos.

Cuadro 4. Clasificación de los terpenos

Grupo	No. de átomos de carbono	No. de unidades de isopreno
Hemiterpenos	5	1
Monoterpenos	10	2
Sesquiterpenos	15	3
Diterpenos	20	4
Sesterterpenos	25	5
Triterpenos	30	6
Tetraterpenos	40	8
Politerpenos	5n	N

La unidad estructural básica de los terpenoides es el isopreno, constituido por cinco átomos de carbono. Su unión sucesiva da lugar a los distintos tipos de terpenos conocidos. De esta forma los compuestos con un solo isopreno son los hemiterpenos (C<sub>5</sub>), monoterpenos los de dos (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos los de tres (C<sub>15</sub>) y así sucesivamente. Atendiendo al origen del enlace que se produce en la formación de compuestos de diez o más átomos de carbono, se habla de terpenos “regulares” y terpenos “irregulares”. Los primeros provienen de isoprenos unidos de forma regular “cabeza-cola”, los cuales pueden diferenciarse en el compuesto resultante. La mayoría de los monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos son de este tipo (Shiva-Ramayoni, 2007).

El ácido mevalónico fue el primer compuesto identificado de los involucrados en la síntesis de terpenos. Tras el hallazgo de otros intermediarios en el proceso de biosíntesis como: acetil-CoA, aceto-acetato y 3-hidroxi-3-metilglutanil-CoA, se estableció la ruta metabólica implicada en la síntesis de los terpenos que aparece en la Figura 1. En ella, el 3-hidroxi-3-metilglutanil-CoA origina el isopentenil-difosfato (IPP, isopreno biológicamente activo) que junto con el dimetilalil difosfato (DMAPP) dan lugar a todos los terpenoides. El DMAPP sirve de compuesto de partida y el IPP proporciona todas las unidades que se repiten. La unión más frecuente que se produce entre estos compuestos es la ya mencionada “cabeza-cola” en la que intervienen el carbono 1 del IPP y el carbono 4 del DMAPP (Barrero *et al.*, 2001).

Los terpenos más comunes en los aceites esenciales son aquellos de menor peso molecular, y por lo tanto más volátiles, es decir, monoterpenos y sesquiterpenos. En ocasiones pueden aparecer también diterpenos lo suficientemente volátiles como para ser extraídos mediante las técnicas habitualmente empleadas (Burzaco, 1995).

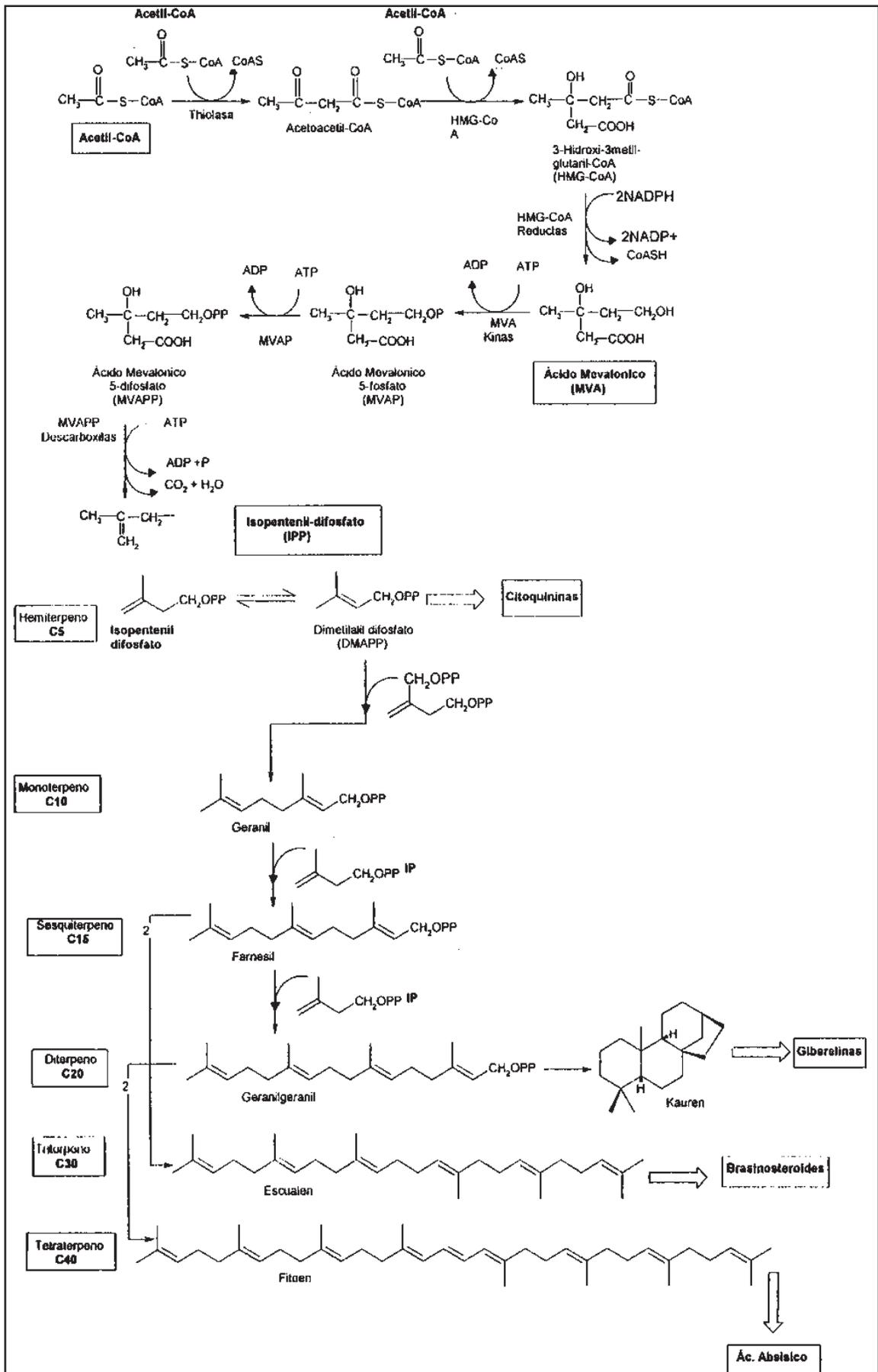


Figura 1. Ruta metabólica implicada en la síntesis de terpenoides

## II.4. Clasificación taxonómica de plantas en estudio

La clasificación taxonómica de una especie vegetal es indispensable en todo trabajo científico, la técnica más usada para ello es la botánica sistemática, en la que se le examina ordenadamente según sus características morfológicas más sobresalientes y, a medida que se va descendiendo en la escala de clasificación, se observan detalles más minuciosos, pasando a caracteres microscópicos y fisiológicos, hasta llegar a la especie en que todos los miembros son prácticamente iguales, aunque si se estudian cuidadosamente, se verán pequeñas variantes que, de tomarse en cuenta, lo subdividen aun mas hasta llegar al individuo (Domínguez, 1985). Sin embargo, la botánica sistemática presenta varias desventajas, ya que al ser la morfología, la herramienta fundamental en la identificación de géneros y especies, suelen presentarse casos en los que las similitudes del fenotipo no permitan una correcta identificación de los taxa.

Las plantas medicinales generalmente están ubicadas dentro de géneros poco estudiados o bien donde existe poca información taxonómica reciente, lo que a menudo ha provocado que la clasificación taxonómica sea ambigua. La biología molecular es una herramienta muy importante cuando la clasificación taxonómica de una especie vegetal no es del todo confiable, el uso de marcadores moleculares complementa el análisis de la clasificación taxonómica de una especie mediante botánica sistemática.

Para las especies en estudio *S. macrostema* (Benth) Briq. y *E. carlinae* Delar F., debido a la variación en los caracteres morfológicos, el criterio de ubicación mediante la taxonomía tradicional varía generando confusión de estas especies con otras, lo que representa una serie de problemas al iniciar su uso o su estudio científico para su comercialización.

El avance tecnológico en las áreas de la biología molecular y la biotecnología ha logrado la incorporación de nuevos tipos de datos, particularmente hacia los mencionados marcadores moleculares, que han sido necesarios en taxa donde los caracteres morfológicos, no han logrado resolver del todo los problemas taxonómicos (Williams *et al.*, 1990). Uno de los marcadores moleculares aplicados con más éxito es la secuenciación del genoma. Desde luego se debe considerar que

los datos moleculares, como cualquier otro tipo de información, por sí solos no dan soluciones a problemas taxonómicos, y su análisis debe hacerse con procesos explícitos y abiertos a la crítica con base inicial en la taxonomía tradicional (García-Chávez *et al.*, 2004b).

Para los géneros donde se ubican las especies en estudio, *S. macrostema* (Benth) Briq. y *E. carlinae* Delar F. hay una escasez de datos sobre taxonomía molecular y/o filogenia. Los únicos datos disponibles proceden de Kaufmann y Wink (1994) que revisaron la sistemática clásica de la subfamilia Nepetoideae utilizando secuencias cloroplastídicas de genes *rbcL* como marcadores moleculares; apoyaron la propuesta de Cantino *et al.* (1992), que clasificaron al género *Satureja* en la tribu Menthae, en contraste con la sistemática clásica que colocó este género dentro de la tribu Saturejeae. Para nuestro conocimiento, no se han publicado informes sobre taxonomía molecular ni en el género *Satureja* ni en el *Eryngium*.

#### **II.4.1 Marcadores moleculares**

En sentido amplio, un marcador molecular es cualquier característica química o molecular medible, que es heredada según un modelo mendeliano simple. En sentido más restringido, los marcadores moleculares son segmentos de ADN que se consideran como marcas o puntos de referencia para el análisis del genoma. Estos segmentos usualmente representan variantes o sitios polimórficos que pueden ser identificados empleando diferentes estrategias y técnicas. Los marcadores moleculares o marcadores del ADN revelan sitios de variación de la secuencia de ADN. A diferencia de los marcadores morfológicos, las variaciones no se muestran por sí mismas en el fenotipo, porque pueden tener diferencias en un solo nucleótido del gen en una secuencia repetitiva del ADN. El uso de técnicas moleculares permite la estimación de la diversidad genética dentro de especies y entre ellas para estudios poblacionales, clasificación de germoplasma, identificación de especies vegetales, mejoramiento e identificación de genes (Rodríguez y Arencibia, 2002). Muchos de los marcadores moleculares se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El desarrollo de técnicas como los marcadores moleculares ha facilitado en gran medida las investigaciones en disciplinas como taxonomía, ecología y genética

(González, 1998). El uso de marcadores moleculares para resolver problemas taxonómicos en plantas se inició en la década de los setenta con técnicas de electroforesis de enzimas (Gottlieb, 1971), y hacia los ochenta las técnicas de manipulación y análisis de ADN y ARN habían avanzado lo suficiente como para poder estudiar la variación (Kumar y Filipski, 2001). Uno de los marcadores moleculares aplicados con más éxito es la secuenciación del genoma. El estudio de la variación taxonómica de las secuencias génicas ha sido posible gracias a los avances tecnológicos, para la extracción, amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos.

La popularidad de estos métodos se basa en que cualquier carácter utilizado para un análisis sistemático debe reflejar cambios genéticos. La eficacia sistemática del carácter utilizado será mayor si no es el resultado de la influencia del medio sobre el fenotipo, por lo que el uso directo del material genético debe aportar los caracteres más fundamentales para una clasificación. Con el transcurso de los años y los avances en la tecnología, han ido apareciendo los distintos marcadores moleculares como los RFLPs (Restricted Fragment Length Polymorphisms) en los años 80, y los RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) y AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) en los años 90. Para detectar polimorfismos con marcadores moleculares se han usado dos técnicas básicas de biología molecular: hibridización tipo *Southern* y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los tres tipos de marcadores moleculares empleados de manera más amplia son los RFLPs, los RAPDs y los AFLPs (Nuez y Carrillo, 2000).

El uso de la secuenciación del ADN es actualmente uno de los métodos más comúnmente utilizados en las técnicas moleculares. A diferencia de las enzimas de restricción, con las que se muestrean fragmentos del ADN, la secuenciación analiza todas las unidades básicas de información del ADN (Hillis *et al.* 1996). Los caracteres de los organismos están representados por la posición en la secuencia del gen, mientras que los estados de carácter son los nucleótidos que se encuentran en esa posición (Swofford, 1996). En plantas, los genes que se han usado provienen del núcleo, siendo ribosomales o del cloroplasto (*rbcL* y *ndhF*). El ADN ribosomal se utiliza por ser muy abundante y por mostrar una evolución rápida con diferente tasa entre sus subunidades y sus espaciadores (Lafontaine y Tollervey, 2001). La región

del espaciador interno (ITS) diverge más rápido que el ADN del cloroplasto aunque la tasa varía de grupo a grupo (Baldwin, 1993).

#### **II.4.1.1. Espaciadores transcritos internos (ITSs)**

En las plantas superiores el ADN codificante para ARN ribosomal nuclear (rADN) es particularmente útil para estudios taxonómicos. En las plantas se presentan normalmente múltiples copias por genoma y están organizadas en "clusters" y "tandems" repetidos. Cada unidad repetida consiste en regiones codificantes altamente conservadas para ARN 18s, 5.8s y 26s y regiones intergénicas espaciadoras variables (IGSs) (Rafalski y Tingey, 1993). En la actualidad se está utilizando el análisis molecular de las secuencias ya que son fácilmente aisladas, moderadamente repetidas y son un blanco atractivo para los ensayos de PCR. Los genes del ARN ribosomal en el núcleo de las células eucarióticas existen, normalmente, en "tandems" de elementos repetidos. Cada unidad repetida se compone de secuencias codificantes altamente conservadas con una longitud de cerca de 6 Kb, siendo más cortas y más variables las regiones espaciadoras no codificantes. Los módulos repetidos de rADN pueden encontrarse en varios sitios de los cromosomas. El número de copias de rADN repetido por genoma varía de varios cientos en algunos mamíferos e insectos a miles en el caso de las plantas (Awise, 1994). El número de genes que codifican para estos rARN varía entre 100 y 200 en los eucariotes inferiores hasta varios cientos en los eucariotes superiores. Las regiones de estos genes se encuentran altamente conservadas y están separadas por dos espacios transcritos internos o ITS (Figura 2). Las regiones más conservadas que evolucionan lentamente, se utilizan para la clasificación a niveles taxonómicos superiores (de género a phylum), mientras las regiones ITS, menos conservadas, se utilizan a nivel de especie y subespecie. Los genes ribosomales y sus regiones espaciadoras asociadas, en conjunto llamados ADN ribosomal del núcleo, tienen un amplio rango de aplicación, desde el estudio del origen de la vida hasta los eventos evolutivos más recientes (White *et al.*, 1990)

La región de los espaciadores transcritos internos (ITS) ha sido usada ampliamente para el esclarecimiento de las relaciones entre taxa a niveles inter e intragenéricos, así como intraespecíficos en Angiospermas. (Baldwin *et al.*, 1995; Liston *et al.*, 1996).

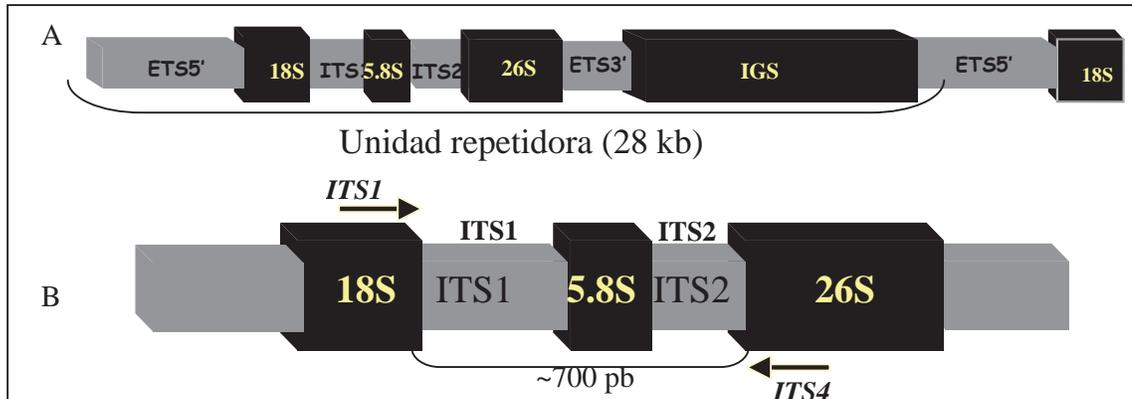


Figura 2. **A.** Los **18S**, **5.8S** y **26S** son regiones codificantes para los ARN ribosomales 18S, 5.8S y 26S. Los **ITS1** e **ITS2**, son las regiones espaciadoras transcritas internas, y las **5'ETS** y **3'ETS** son las regiones espaciadoras transcritas externas. Los **IGS** son las regiones espaciadoras intergénicas. **B.** Los iniciadores **ITS1** e **ITS4** se localizan en las regiones conservadas **18S** y **26S** amplifican la región **ITS1-5.8S-ITS2** con tamaños que varían desde 576 a 637 pb según la especie.

#### II.4.1.2. Análisis de los datos moleculares

Los datos moleculares, como cualquier otro tipo de información, por sí solos no dan soluciones a problemas taxonómicos, y su análisis debe hacerse con procesos explícitos y abiertos a la crítica con base inicial en la taxonomía tradicional. En el caso específico de métodos moleculares, la información obtenida al aplicar los distintos métodos de son patrones electroforéticos de ADN (bandas) ó secuencias que representan datos cualitativos. Esta información necesita ser convertida a datos cuantitativos (Avice, 1994). Para el caso de las secuencias, debido en gran parte al número de caracteres involucrados, estas se analizan por medio de por métodos de distancia, parsimonia o máxima similitud con los que se obtiene una filogenia (Swofford, 1996). La presentación gráfica de las relaciones genéticas entre organismos se representa en un sistema de reconstrucción tipo árbol (dendrograma), el cual se construye por medio de un método de agrupamiento. Las presentaciones gráficas consisten de nodos (unidades taxonómicas) y ramas (rutas conectando a los nodos) (Avice, 1994).

Existen además pruebas estadísticas para obtener índices o valores de confianza, entre los cuales uno de los más utilizados es el “bootstrap” que es un método de remuestreo con reemplazamiento por medio de los cuales se realizan replicas y se determinan los porcentajes de veces que se repitió un nodo (Felsenstein, 1985).

## II.5. Plantas en estudio.

### II.5.1. *Satureja macrostema* (Benth) Briq.

Planta medicinal conocida con los nombres comunes de: Atochietl, Borracho, Menta, Nurhitini te (purépecha), Nurite, Tabaquillo, Te de monte, Tragorigano quauhnhuacense, Tunché.

Es una planta arbustiva, con olor a menta al estrujar, de 1 a 3 m de alto; tallos erectos, ramas arqueadas, pubescentes; hojas con pecíolos de 2 a 5 mm de largo, limbo ovado u oblongo a lanceolado, de 1 a 4 cm de largo por 0.6 a 1.5 cm de ancho, ápice agudo, aserradas, base redondeada; flores solitarias o en grupos de 2 a 3 en las axilas de las hojas, pedicelos de 2 a 10 mm de largo, pubescentes; cáliz pentadentado, bilabiado, de 7 a 10 mm de largo, con la garganta pilosa; corola roja o anaranjada (cambiando a blanquecina o rosada en el secado), de 2 a 3.5 cm de largo; estambres exsertos, tecas de las anteras divergentes; estilo saliente de la corola; mericarpios ovoides, lisos o reticulados (Rzedowski y Rzedowski, 2001; www.semarnat.gob.mx). Se han identificado cerca de 200 especies de este género, algunas especies de importancia económica son la menta, el orégano, la mejorana y la lavanda (Figura 3A).

De los diferentes reportes actuales de algunas de las especies de *Satureja*, el 40% corresponde a estudios fitoquímicos, con resultados sobre el efecto antimicrobiano mediante ensayos realizados con extractos crudos o bien con el aceite esencial y no con compuestos purificados a excepción del carvacrol, el timol y el p-cimeno (Shimoni *et al.*, 1993; Ciani *et al.*, 2000; Azaz *et al.*, 2002; Gülluce *et al.*, 2003; Skočibušić y Bezić, 2003; Skočibušić, 2003; Chorianopoulos *et al.*, 2004; Gören *et al.*, 2004; Skočibušić y Bezić, 2004; Boyraz y Özcan, 2005; Jasmina, 2005; Skočibušić *et al.*, 2006; Bezić *et al.*, 2005; Chorianopoulos *et al.*, 2006; Kan *et al.*, 2006; Moghaddam *et al.*, 2007; Benli *et al.*, 2007; Damián-Badillo, 2007).

El aceite esencial además de haber demostrado actividad antimicrobiana también ha mostrado actividad antidiarreica por los fenoles del aceite y ha sido usado en el tratamiento del cáncer (Simon *et al.*, 1984; Skočibušić y Bezić, 2003) como antioxidante (Lagouri y Boskou, 1996); también ha mostrado actividad contra los virus HSV-1 y VSV (Abad *et al.*, 1999) y actividad anti-HIV-1 (Yamasaki *et al.*, 1998).

### II.5.1.1. Clasificación botánica

Cuadro 5. Clasificación botánica de nurite

Reino	Vegetal
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Labiales
Familia	Lamiaceae
Genero	<i>Satureja</i>
Especie	<i>S. macrostema</i>
	(Aguilar, 2002)

### II.5.1.2. Distribución geográfica

Se localiza principalmente en los estados de Guerrero, Jalisco, Michoacán y Oaxaca. Encontrándose en los siguientes municipios según la SEMARNAP (Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca): Guerrero (Coyuca de Catalan, Alcozauca de Guerrero); Jalisco (se tiene reporte para el estado pero no hay registro municipal); Michoacán (Zinapécuaro, Zitácuaro, Coalcomán de Vázquez Pallarez, Aguililla, Charo, Chilchota, Hidalgo, Madero, Anganguero, Nahuatzen, Ocampo, Paracho, Pátzcuaro, Queréndaro, Quiroga, Salvador Escalante, Senguio, Tancítaro, Ario, Tlalpujahua); Oaxaca (se tiene reporte para el estado pero no hay registro municipal) ([www.semarnat.gob.mx](http://www.semarnat.gob.mx)).

### II.5.1.3. Usos

Planta de gran importancia en la medicina tradicional de los pueblos Purépechas, quienes la consideran un símbolo de fertilidad y por ello es usada en las bodas; el nurite es utilizado como un eficiente aperitivo si se toma en ayunas o antes de los alimentos. Se utiliza para combatir las infecciones intestinales como estomático, excitante de los movimientos gástricos o gastrointestinales y favorece la digestión cuando esta es lenta y dolorosa. Es utilizado como un carminativo poderoso y se utiliza también para evitar o eliminar los cólicos. Es un agente digestivo eficaz si se toma después de los alimentos también se toma el té nurite para eliminar las molestias producidas por la ingestión de bebidas alcohólicas: agruras y nauseas, de este uso le viene el nombre de "hierba del borracho". Otro uso que se le da al nurite es el de aliviar un tipo de diarrea denominada "diarrea de tierra caliente"; como remedio y buen tónico después de sufrir malaria y otras fiebres (Aguilar, 2002;

<http://www.semarnat.gob.mx>). En síntesis, el género *Satureja* ha sido tradicionalmente usado como estimulante, estomático, carminativo, expectorante, antidiarreico y afrodisíaco.

#### **II.5.1.4. Composición química y actividad antimicrobiana del género**

Como ya se ha mencionado anteriormente, el género *Satureja* comprende alrededor de 200 especies, de los cuales solo algunas han estado involucradas en algún estudio científico, la mayoría son respecto a la composición química y la actividad antimicrobiana ya sea de los extractos crudos o aceites esenciales, y solo en pocos casos se han extraído los compuestos mayoritarios para probarse individualmente.

Entre las especies más estudiadas de este género tenemos a *S. thymbra*, *S. montana* y *S. cuneifolia* provenientes principalmente del mediterráneo, de Europa del sur y de países como Turquía e Irán, el resto se han realizado en Argentina, Grecia, Finlandia, Croacia, EUA, España y Yugoslavia (Damián-Badillo, 2007).

Shimoni *et al.* (1993) evaluaron la actividad antifúngica de las fracciones volátiles de los aceites esenciales de cuatro plantas aromáticas silvestres de Israel, una de las cuales fue *S. thymbra*, las fracciones fueron probadas contra *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Botrytis cinerea* y *Exserohilum turcicum*. Los resultados mostraron un efecto fungistático de varios aceites de 1, 2.5 y 5 µL sobre el crecimiento del micelio.

En otro estudio realizado por Ciani *et al.* (2000) en el aceite esencial de *S. montana* se reportó un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra 46 especies de levaduras, todas las cepas utilizadas fueron inhibidas a bajas concentraciones del aceite esencial encontrando que las cepas más susceptibles fueron *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Filobasidiella neoformans*, *Tricosporon cutaneum*, *Brettanomyces sp.*, *Saccharomyces ludwigii*, *Schizosaccharomyces octosporus*, *Zygosaccharomyces baillii* y *Zygosaccharomyces rouxii*.

En la mayoría de los estudios realizados en *S. montana* los compuestos que predominan son el carvacrol y el timol, y la mayoría ha resultado tener una buena actividad antimicrobiana no solo con levaduras sino también contra bacterias

patógenas entéricas. Otros compuestos importantes que ya han sido identificados en los aceites esenciales de *S. montana* son  $\gamma$ -terpineno, el carvacrol metiléter, borneol y timol metiléter; mientras que en el aceite de *S. cuneifolia*, el  $\beta$ -cubebeno, el limoneno, el  $\alpha$ -pineno, el espatulenol y el  $\beta$ -cariofileno. Estos aceites además fueron activos contra una gran variedad de bacterias patógenas, la actividad máxima fue observada contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y la levadura *Candida albicans* (Skočibušić y Bezić, 2003; Skočibušić y Bezić, 2004).

Azaz *et al.* (2002) reportaron la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de tres especies del género *Satureja* endémicas de Turquía, *S. pilosa*, *S. icarica*, *S. boissieri* y *S. coerulea*. En este estudio además se identificaron los principales constituyentes de los aceites por medio de GC y GC-MS, los análisis mostraron que el carvacrol fue el principal compuesto de los aceites de *S. icarica*, *S. pilosa* y *S. boissieri* variando entre el 42.1% y 59.2% respecto a la composición total. Otros compuestos importantes fueron *p*-cimeno (8.1% a 35.5%) y borneol (4.5% a 6.3%) además de otros monoterpenos. Por el contrario los principales compuestos de *S. coerulea* fueron los sesquiterpenos  $\beta$ -cariofileno (10.6%), germacreno D (4.7%) y cariofileno óxido (8.0%). Respecto a la actividad antimicrobiana, el aceite esencial de *S. pilosa* mostró fuerte actividad contra *Candida albicans*, mientras que *S. icarica* inhibió fuertemente a *Pseudomonas aeruginosa*.

Quizá el estudio más representativo en cuanto a la composición química de *Satureja* spp. sea el realizado por Chorianopoulos *et al.* (2004), en este se identificaron más de 70 compuestos en distintas especies de este género, los cuales fueron monoterpenos, diterpenos y sesquiterpenos, en la mayoría de los casos, el carvacrol fue el principal constituyente seguido por el timol y sus precursores biosintéticos el *p*-cimeno y el  $\gamma$ -terpineno. Es importante señalar que el  $\beta$ -cariofileno también fue detectado como uno de los compuestos principales de los diferentes aceites.

Son escasos los estudios en los que además de evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial, se hayan probado los compuestos mayoritarios purificados. Kan *et al.* (2006) reportaron la composición del aceite esencial de *S. cuneifolia*, encontrando que el carvacrol fue el compuesto dominante (59.28%), seguido por el timol (15.72%), el *p*-cimeno (9.69%), el  $\gamma$ -terpineno (4.16%), el linalol (1.7%) y el borneol (1.25%). En este estudio, además de evaluar la actividad antibacteriana del

aceite esencial se evaluaron los tres compuestos mayoritarios purificados de manera independiente. Los resultados mostraron un buen grado de inhibición contra las bacterias Gram positivas (*S. aureus*, *B. cereus*, *S. lutea*) y las Gram negativas (*P. aeruginosa*, *E. coli*). Respecto a los compuestos purificados, el carvacrol fue el que presentó mayor actividad antibacteriana.

Con respecto a la especie en estudio en este trabajo (*S. macrostema*), los estudios científicos realizados son escasos. A partir del extracto polar de *S. macrostema* (Benth) Briq. se han identificado los compuestos naringenina y espedarina, a los cuales se les considera como responsables de las actividades medicinales de tipo antibacteriano de esta planta (Serrato, 2002). Por su parte Damián-Badillo (2007) evaluó el efecto antifúngico y antioomiceto de esta misma especie, encontrando un buen grado de inhibición con todos los hongos que se probaron (*Candida albicans*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Mucor circinelloides*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Sporothrix schenckii*).

Cabe mencionar que los trabajos realizados en México de *S. macrostema* han sido principalmente en tesis o trabajos en instituciones gubernamentales por lo que no se pueden encontrar en las bases de datos (Damián-Badillo, 2007). Los trabajos se refieren principalmente a estudios fitoquímicos para conocer la fenomenología de sus compuestos, para conocer la composición química y poder relacionarla filogenéticamente (Vázquez *et al.*, 1995; Aguilar, 2002; Aguilar *et al.*, 2004).

### **II.5.2. *Eryngium carlinae* Delar F.**

Planta medicinal conocida con los nombres comunes de hierba del sapo, kokixukurhi (purépecha), motita de sapo, tiamo Kuatr (purépecha), tsatsekua.

Es una planta espinosa sin tallo aparente, y cuando está es inclinado a erecto, presentando uno o varios ya sean sencillos o con ramificaciones casi horizontales; puede crecer de 10 a 50 cm de altura, no obstante, sus raíces son pivotantes muy largas y pueden llegar a medir unos 5 m. Presenta sus hojas basales dispuestas en una roseta densa sobre pecíolos alados envainadores en la base hasta de 2 cm de largo; lámina oblanceolada de 3 a 10 cm de largo por 0.5 a 2 cm de ancho, ápice obtuso, márgenes pilosos tiesos (setoso) a espinuloso-aserrado, o algo más profundamente partido (pinnatífido), base atenuada, nervación pinnada reticulada;

las hojas en el tallo son semejantes a las basales, las superiores se presentan opuestas y sin peciolo (sésiles), a veces profundamente partidas. Presenta una inflorescencia cimosa en ocasiones repetidamente ramificada compuesta de cabezuelas ovoides, 5 a 10 mm de largo y 5 a 7 mm de diámetro, azules, violetas, blancas, crecen sobre pedúnculos; en el ápice del pedúnculo, de 8 a 12 brácteas extendidas, ovadas a oblanceoladas o linear-lanceoladas, ápice agudo, márgenes enteros, espinoso-aserrados cerca del ápice, haz blanquecino a amarillento y envés verde; cabezuelas con numerosas flores sésiles acompañadas por una sola bractéola en su base. Flores pequeñas, simétricas radialmente, hermafroditas, blancas, azules, moradas; cáliz con un tubo obcónico, 5 lóbulos, rígidos, acuminados, recorridos por un nervio grueso, ovados, de 1 a 2 mm de largo, márgenes enteros; pétalos libres, espatulados, de 1 mm de largo; cinco estambres, alternos con los pétalos; ovario ínfero, dos carpelos, dos estilos algo más cortos o largos que los sépalos. Fruto esquizocarpo (fruto indehiscente con gineceo dos carpelos unidos, a la madurez se separan) ovoide o subgloboso, de 1 a 2 mm de largo, aplanado lateralmente, y dos mericarpos (cada una de las partes separables del fruto) cada uno con una semilla (<http://www.semarnat.gob.mx>) (Figura 3B).

*Eryngium* es un género complejo, cosmopolita, de cerca de 317 especies de plantas anuales y perennes con hojas sin pelusas y generalmente espinosas, con umbelas en forma de cúpula que se parecen a cardos. Tienen una distribución generalizada por todo el mundo con el centro de diversidad en Sudamérica (Kupeli *et al.*, 2006).

Es un género poco estudiado, hasta el momento el mayor aporte al conocimiento de *Eryngium* reside en trabajos que corresponden a estudios de tipo fenológicos y de distribución, evaluación de la actividad antiinflamatoria y antinociceptiva, estudios fitoquímicos y en mucha menor cantidad en estudios donde se evalúa la actividad antibacteriana y antimalárica. La mayoría de la investigación que se ha hecho en este género se ha realizado en países como España, Turquía, Irán, Argentina y Venezuela (Perdigó y Llauradó, 1984; Pino *et al.*, 1997; Martínez y Galotti, 2001; Palá-Paúl, 2002; Martins *et al.*, 2003; Cardozo *et al.*, 2004; Gaudeul y Till-Bottraud, 2004; Sefidkon *et al.*, 2004; Kartal *et al.*, 2005; Morteza-Semnani, 2005; Palá-Paúl *et al.*, 2005a; Palá-Paúl *et al.*, 2005b; Kartal *et al.*, 2006; Küpeli *et al.*, 2006; Palá-Paúl *et al.*, 2007; Calviño y Martínez, 2007; Fokialakis *et al.*, 2007; Ndip *et al.*, 2007).

### II.5.2.1. Clasificación botánica

Cuadro 6. Clasificación botánica de hierba del sapo

Reino	Vegetal
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Apiales
Familia	Apiaceae
Genero	<i>Eryngium</i>
Especie	<i>E. carlinae</i>
	(Martínez y Galotti, 2001; Palá-Paúl, 2002)

### II.5.2.2. Distribución geográfica

Se localiza principalmente en los estados Chihuahua, Jalisco y Michoacán, siendo este último el estado en el que mayormente se encuentra, entre los municipios de Tzintzuntzan, Zacapu, Zinapécuaro, Zitácuaro, Contepec, Chilchota, Churintzio, Erongarícuaro, Jiquilpan, Lagunillas, Madero, Angangueo, Morelia, Pátzcuaro, Quiroga, Los Reyes, Salvador Escalante, Tlalpujahua ([www.semarnat.gob.mx](http://www.semarnat.gob.mx)).

### II.5.2.3. Usos

La parte aérea de la planta se usa en padecimientos del riñón debido a que se le atribuyen propiedades diuréticas y cicatrizantes. Además el té se usa contra la congestión del pecho y en padecimientos gastrointestinales. La parte aérea es usada en lavados vaginales y punzadas en el oído. Se usa también para inflamaciones por golpes. La planta completa se usa hervida y tomada como agua de uso en empachos de agua, de esta misma manera se combaten algunas enfermedades venéreas. El cocimiento de la hierba del sapo más tepozán (*Buddleia* spp.) se toma en casos de fiebre y prurito. Se usa para inflamaciones por golpes, en lavados vaginales. El cocimiento de la raíz (junto con la manzanilla más sal), se le da a beber a los animales en casos de sofocamiento ([www.semarnat.gob.mx](http://www.semarnat.gob.mx)).

#### II.5.2.4. Composición química y actividad antimicrobiana del género

Son escasos los estudios en los que se ha evaluado a la actividad antimicrobiana de extractos o aceites esenciales de algunas de las especies de este género, la gran mayoría solo aborda la composición química.

En uno de los primeros estudios, Pino *et al.* (1997) reportaron la composición química de *E. foetidum* originaria de Cuba en el que los volátiles de las hojas destilados con agua, se analizaron mediante cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, encontrando 46 compuestos los cuales fueron, el 2,4,5-trimetilbenzaldehído (20.53%), el ácido hexadecanoico (12.05%) y el carotol (9.94%). La composición química de esta misma especie, pero de los Andes Venezolanos también fue reportada por Cardozo *et al.* (2004), encontrando que los principales constituyentes fueron 2,4,5-trimetilbenzaldehído (27.7%), (e)-2-dodecenal (27.5%), carotol (8.8%), 3-dodecenal (5.2%) y  $\gamma$ -terpineno (3.8%). Por su parte Martins *et al.* (2003) también reportaron la composición química para esta especie, de una localidad diferente (S. Tome e Principe), encontrando la presencia de pequeñas cantidades de monoterpenos hidrocarbonatos y sesquiterpenos, además de un gran número en altas proporciones de aldehídos aromáticos y lineales entre los que destacan, 2,3,6-trimetilbenzaldehído (5.5-23.7%) y el (E)-2-dodecenal (15.9-37.5%).

Sefidkon *et al.* (2004) estudiaron la composición química del aceite esencial de *E. billardieri* F. Delaroche proveniente de Irán, identificando 42 compuestos que representaron el 97.2% del aceite. Los principales constituyentes fueron  $\alpha$ -muuroleno (42.0%),  $\beta$ -gurjuneno (17.0%),  $\delta$ -cadineno (6.2%) y valenceno (5.7%).

Otros terpenos ya han sido identificados, Morteza-Semnani (2005) determinó la composición del aceite esencial de *E. bungei* Boiss encontrando 16 compuestos entre los que destacaron cuminol (55.3%), el terpinoleno (14.6%), el carvacrol (8.9%) y el limoneno (7.5%).

Palá-Paúl (2002) reportó la composición química para varias especies de la península Ibérica encontrando una amplia variación en la composición de los aceites

esenciales extraídos de distintas partes, tanto de raíces, inflorescencias, tallos y hojas, destacando la presencia de los terpenoides en tallos, hojas e inflorescencias. Para *E. aquifolium* los compuestos mayoritarios identificados en el aceite esencial extraído de tallos y hojas fueron el Germacreno D con 46% y mircerno con 13.8%, seguidos por el canfeno (5.1%),  $\beta$ -gurjuneno (4.0%), *epi*- $\alpha$ -muurolol (3.3%), sesquicineol (3.1%) y  $\delta$ -cadineno (3.1%); mientras que en el aceite extraído de inflorescencias, se identificaron como mayoritarios al Germacreno D con 30.3% y al sesquicineol con 26.7%, seguidos por el mircerno (4.7%),  $\alpha$ -eudesmol (3.3%),  $\alpha$ -pineno (3.1%), bicicloGermacreno (3.1%),  $\delta$ -cadineno (2.8%), *epi*- $\alpha$ -muurolol (2.7%),  $\alpha$ -bisabolol (2.3%) y *epi*- $\alpha$ -bisabolol (2.2%). Para *E. campestre* se encontraron como compuestos principales en tallos y hojas al germacreno D (42.4-31.1%) y mircerno (23.1-0.5%), seguidos por el  $\alpha$ -pineno (7.9%),  $\beta$ -gurjuneno (7.6-0.2%), (*E*)- $\beta$ -farneseno (6.2%),  $\beta$ -curcumeno (6.1-0.5%), *epi*- $\alpha$ -bisabolol (6.0%),  $\alpha$ -cadinol (4.5-1.2%),  $\beta$ -eudesmol (4.5-1.2%),  $\delta$ -cadineno (4.2-1.5%), eremofileno (3.8%),  $\beta$ -elemeno (3.5-0.8%), germacreno D-4-ol (3.5%), *epi*- $\alpha$ -muurolol (3.2-0.7%), cubenol (3.2-0.7%), biciclogermacreno (3.0-1.8%), óxido de cariofileno (2.8%),  $\alpha$ -felandreno (2.7-0.9%), 1-*epicubenol* (2.7-0.4%),  $\gamma$ -muuroleno (2.5-0.7%),  $\beta$ -felandreno (2.4%), palustrol (2.4%), viridiflorol (2.3-0.6%), (*E*)-cariofileno (2.2-0.9%) y  $\beta$ -copaen-4- $\alpha$ -ol (2.2-0.5%). Mientras que para *E. dilatatum* el compuesto principal fue el Germacreno D tanto en tallos y hojas como en inflorescencias (38.4 y 46.5%). Seguido por los compuestos octanal (8.1%),  $\alpha$ -cadinol (3.7%),  $\delta$ -cadineno (3.6%), (*E*)-cariofileno (2.6%), biciclogermacreno (2.5%), espatulenol (2.4%), 1-(1-metil-2-ciclopenten-1-il)etanona (2.1%),  $\beta$ -elemeno (2.1%),  $\alpha$ -muurolol (2.1%) y  $\alpha$ -humuleno (1.8%) en tallos y hojas; y  $\alpha$ -cadinol (3.8%), biciclogermacreno (3.5%), octanal (3.1%), espatulenol (2.5%),  $\alpha$ -muurolol (2.5%), limoneno (2.3%),  $\alpha$ -pineno (2.1%) y 14-oxi- $\alpha$ -muuroleno (2.0%) en inflorescencias. Para *E. galioides* se identificó como compuesto mayoritario al valenceno (46.7%) en el aceite esencial extraído de la planta completa, otros compuestos importantes fueron  $\beta$ -chamigreno (6.0%),  $\gamma$ -muuroleno (3.4%) y (*E*)-cariofileno (3.0%). Para el caso de *E. maritimum* los compuestos mayoritarios en tallos y hojas fueron el 14-hidroxi- $\delta$ -cadineno isómero (27.7%), 2,4,6-trimetilbenzaldehído (15.8%) y germacreno D (11.0%) seguidos por el mesitileno (2.6%) y espatulenol (2.3%); en inflorescencias el 14-hidroxi- $\delta$ -cadineno (21.5%), germacreno D (17.7%) y 2,4,6-trimetilbenzaldehído (13.0%) seguidos por el  $\alpha$ -pineno (2.7%) y  $\alpha$ -cadinol (2.0%). Finalmente para *E. tenue* se identificó como compuesto mayoritario al *trans*- $\beta$ -guaieno (26.5%) en el aceite esencial extraído de la planta

completa, otros compuestos importantes fueron  $\beta$ -bisabolonal (9.3%),  $\alpha$ -cadinol (8.9%),  $\delta$ -cadineno (8.8%), cubenol (6.4%), ledeno (5.3%), carotol (5.1%), germacreno D (3.1%),  $\alpha$ -neo-cloveno (2.2%), 1-*epi*-cubenol (2.1%) y aromadendreno (2.0%).

En los resultados obtenidos para otra especie *E. bourgatii* se identificaron como compuestos mayoritarios en el aceite esencial extraído de tallos y hojas al filocladeno (20.4%),  $\gamma$ -muuroleno (11.8%) y (*E*)-cariofileno, (10.1%), seguidos por el  $\beta$ -elemeno (5.2%), óxido de cariofileno (4.6%), *iso*-acorona (2.6%), espatulenol (2.3%),  $\alpha$ -cadinol (2.1%), 14-hidroxi-9-*epi*-(*E*)-cariofileno (2.1%) y  $\delta$ -cadineno (2.0%). En el aceite extraído de inflorescencias los compuestos principales fueron el filocladeno (37.6%) y bicilogermacreno (15.1%), seguidos por el (*E*)-cariofileno (8.3%), carotol (6.0%),  $\gamma$ -muuroleno (4.4%) y  $\alpha$ -neo-cloveno (3.4%) (Palá-Paúl *et al.*, 2005a).

En el aceite esencial extraído de hojas y tallos de *E. glaciale* se encontró como compuesto principal al isómero de filocladeno (41.3%), seguido por el (*E*)-cariofileno (7.1%), valenceno (6.9%), criptona (5.9%), linalol (5.9%), óxido de cariofileno (3.4%),  $\beta$ -felandreno (2.2%) y  $\beta$ -chamigreno (2.2%). Mientras que en el aceite extraído de inflorescencias, los compuestos mayoritarios fueron el isómero de filocladeno (43.5%), (*E*)-cariofileno (15.2%) y valenceno (11.5%) seguidos por la criptona (4.6%),  $\beta$ -chamigreno (3.7%), linalol (3.0%), óxido de cariofileno (2.1%) y  $\alpha$ -pineno (2.0%) (Palá-Paúl *et al.*, 2005b).

En *E. corniculatum* se identificaron como compuestos mayoritarios tanto en tallos y hojas como en inflorescencias al 2,4,6-trimetilbenzaldehído con 50 y 50.8% respectivamente, otros compuestos importantes encontrados en tallos y hojas fueron el 2,4,5-trimetilbenzaldehído (3.8%),  $\alpha$ -pineno (3.4%), (*E*)-nerolidol (2.4%) y (2*Z*,6*E*)-farnesol (2.1%); y en inflorescencias el acetato de *cis*-crisantenil (4.0%),  $\alpha$ -pineno (4.0%), 2,4,5-trimetilbenzaldehído (3.3%), (2*Z*,6*E*)-farnesol (2.0%), (*E*)-nerolidol (2.1%) y (*Z*)- $\beta$ -ocimeno (2.1%) (Palá-Paúl *et al.*, 2007).

Respecto a la actividad antimicrobiana son escasos los estudios científicos. Ndip *et al.* (2007) evaluaron la actividad antimicrobiana de algunas plantas medicinales en las que incluyeron a *E. foetidum*, la evaluación la hicieron mediante aislados clínicos

de *Helicobacter pylori* en Camerún, con el objetivo de identificar metabolitos para la síntesis de nuevos fármacos, mostrando una fuerte actividad antimicrobiana sobre esta bacteria. Por su parte Kotan *et al.* (2007), probaron el efecto inhibitorio de 24 diferentes aceites esenciales entre los que se encontró el de *E. thurifolium* boiss, además se probaron los compuestos mayoritarios carvacrol y timol contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *Vesicatoria*, principal causa de la enfermedad de la mancha bacteriana en chile y tomate, mostrando un efecto altamente antibacteriano.

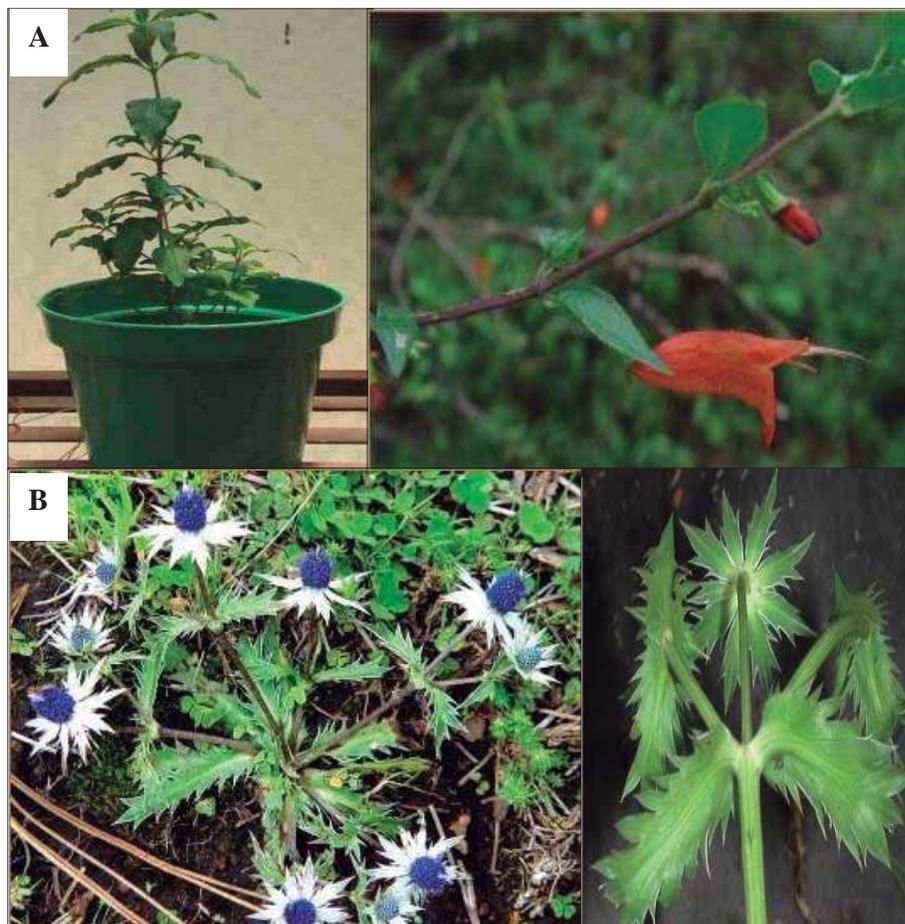


Figura 3. Nurite (A), Hierba del sapo (B)

## II.6. Variación en la composición química en los aceites esenciales de plantas en distintos estados de desarrollo

Se ha demostrado que la actividad y la composición química de los aceites esenciales de una planta, varía considerablemente dependiendo de la localización geográfica, las condiciones de crecimiento, partes de la planta de las cuales son extraídos, estado de desarrollo de la planta, solvente usado para la extracción,

fotosensitividad de algunos de los compuestos en el extracto y métodos usados para extraer los aceites esenciales (Dharmagadda *et al.*, 2004; Kordali *et al.*, 2005; Kan *et al.*, 2006).

Esta variación ya ha quedado evidenciada en varios estudios para los aceites esenciales de varias especies vegetales. Mohammadreza (2008), encontró altas variaciones en la composición química de los aceites esenciales de *Artemisia annua* L., extraídos en diferentes estadios de crecimiento. Por otro lado en los aceites esenciales de *S. thymbra* y *S. parnassica*, se ha reportado que su composición se ve influenciada por varios factores, uno de los más importantes es el tiempo de cosecha (Chorianopoulos *et al.*, 2006). Por otra parte en los aceites esenciales de *S. montana* y *S. cuneifolia* Ten. se demostró la gran variabilidad que existe en la composición química en tres estados de desarrollo, sin embargo existen compuestos que aparecieron relativamente constantes en los tres estados ontogénicos tal es el caso del geraniol para el aceite se *S. montana* y el linalol y el borneol para *S. cuneifolia* (Skočibušić, 2003; Skočibušić *et al.*, 2004).

### III. JUSTIFICACIÓN

Debido a la variación en los caracteres morfológicos en *S. macrostema* (Benth) Briq. y *E. carlinae* Delar F., el criterio de ubicación taxonómica en estas plantas varía generando confusión, lo que ha provocado una serie de problemas en su uso, comercialización y estudio científico. No se han publicado informes sobre estudios taxonómicos moleculares en estas especies, por lo que la generación de los mismos complementará su certera clasificación. Por otro lado tampoco existen estudios de tipo fitoquímico y de actividad en estas mismas especies, los cuales deben generarse debido al gran potencial de estas plantas como una alternativa para el control de microorganismos fitopatógenos.

### IV. HIPOTESIS

Los terpenoides de las especies clasificadas molecularmente (*S. macrostema* (Benth) Briq. y *E. carlinae* Delar F.) presentan actividad antimicrobiana.

## V. OBJETIVOS

### V.1. Objetivo general

- Clasificar molecularmente a *Satureja macrostema* (Benth) Briq. y *Eryngium carlinae* Delar F. y evaluar el efecto antimicrobiano de sus terpenoides.

### V.2. Objetivos específicos

- Clasificar molecularmente las plantas en estudio utilizando la técnica de nrADN por medio de los espaciadores internos transcritos (ITSs).
- Estandarizar el sistema de extracción, análisis y purificación de los terpenoides mayoritarios de *Satureja macrostema* (Benth) Briq. y *Eryngium carlinae* Delar F.
- Determinar la actividad antimicrobiana (antifúngica y antioomiceto) de los extractos crudos y sus terpenoides purificados.
- Determinar la composición química de los extractos crudos en plantas en distintos estados de desarrollo.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### VI.1. Material biológico

#### VI.1.1. Tejido vegetal

Se partió de tejido vegetal de plantas de *Satureja macrostema* (Benth.) Briq. y *Eryngium carlinae* Delar F. provenientes del Campo experimental del INIFAP Uruapan, donadas por el M.C. Miguel Ángel Bello González. Las especies fueron identificadas por medio de taxonomía tradicional (botánica sistemática) con la ayuda del Dr. Rzedowski del Instituto de Ecología del Bajío en Pátzcuaro Michoacán. Para la determinación de compuestos se partió de material vegetal en plantas en floración y para la determinación de la variación de la composición química de los extractos crudos se partió de plantas en distintos estados de desarrollo, se obtuvieron un mínimo de tres diferentes muestras vegetales.

#### VI.1.2. Microorganismos fitopatógenos para la realización de bioensayos

Los aislados de los hongos *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* y de los oomicetos *Phytophthora capsici* y *Phytophthora cinnamomi* fueron donados por la Dra. Sylvia Fernández Pavía del IIAF de la UMSNH y el Dr. Rafael Salgado Garciglia de IIQB de la UMSNH, finalmente la cepa de *Colletotrichum lindemuthianum* fue donada por la Dra. June Simpson Williamson del CINVESTAV unidad Irapuato

#### VI.1.3. Mantenimiento de hongos y oomicetos

Para el mantenimiento de los hongos y oomicetos se utilizó en medio PDA, Bioxon® (agar papa dextrosa) en incubadoras con temperatura controlada (22-25°C). Las siembras se realizaron cada 15 días, por el método de resiembra sucesiva por micelio en cajas de Petri. Los subcultivos se realizaron con la siembra de fragmento de micelio sobre medio fresco.

Cuadro 7. Medio de cultivo PDA para el crecimiento de hongos y oomicetos

COMPONENTES (g)		PREPARACIÓN DE 1 L
Infusión de papa (sólidos)	4.0	Suspender 39 g en un litro de agua destilada, ajustar pH a 7.2, mezclar y esterilizar a 121°C (25 min).
Dextrosa	20.0	
Agar	15.0	

## VI.2. Clasificación molecular de las plantas en estudio mediante nrADN-ITSs

### VI.2.1. Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó con modificaciones del protocolo descrito por Edwards *et al.* (2001), empleando el detergente catiónico bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB), cloroformo para separar proteínas y otros componentes no deseados, ARNasa para eliminar el ARN, isopropanol para precipitar el ADN así como etanol al 70% para lavarlo, y un buffer Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM (TE 1X) para resuspenderlo.

Reactivos:

- Buffer de extracción CTAB: Tris-HCl 100mM (pH 8); EDTA 20mM; NaCl 1.4M; CTAB al 2.5% (w/v);  $\beta$ -mercaptoetanol al 0.2% (v/v). Esterilizar en autoclave
- Cloroformo
- Isopropanol.
- Etanol al 70%.
- Buffer TE: Tris-HCl 10mM (pH 8); EDTA 1mM (pH 8).
- ARNasa A 10 mg/mL.
- *Taq* ADN polimerasa.

El protocolo de extracción fue el siguiente:

1. Precalentar a 60°C 500  $\mu$ L del buffer de extracción CTAB en un tubo Eppendorf de 1.5 mL.
2. Pesar 0.05 g de tejido vegetal (peso seco o liofilizado), moler con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y colocarlo en el tubo Eppendorf de 1.5 mL con el buffer precalentado del paso anterior, dispersar los grumos mezclando por inversión varias veces.
3. Incubar en un baño María a 60°C durante 15 minutos con mezclado ocasional por inversión (cada 5 minutos dentro del tiempo de incubación).
4. Añadir 500  $\mu$ L de cloroformo y mezclar por inversión hasta que se forme una emulsión.
5. Centrifugar a 12,000 rpm por 10 minutos en una centrifuga de mesa a temperatura ambiente.
6. Colocar la fase acuosa en un tubo Eppendorf limpio y repetir pasos 4 y 5.

7. Colocar la fase acuosa en un tubo Eppendorf limpio y añadir 2.5  $\mu\text{L}$  de ARNasa A, mezclar e incubar a 37°C por 30 minutos.
8. Repetir pasos 4 y 5. Transferir la fase acuosa (superior), la cual debe estar limpia y clara, a un tubo limpio y añadir 0.6 volúmenes de isopropanol a -20°C. Mezclar por inversión para precipitar el ADN.
9. Colocar los tubos a -20°C durante 10 minutos. Centrifugar 10 minutos a 12,000 rpm y decantar el sobrenadante.
10. Lavar la pastilla con 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% a 4°C. Agitarla hasta despegarla. Centrifugar 5 minutos a 12,000 rpm y decantar el sobrenadante.
11. Secar la pastilla sobre papel absorbente a temperatura ambiente.
12. Resuspender la pastilla en 25  $\mu\text{L}$  de TE 1X y disolver.

#### **VI.2.1.1. Cuantificación del ADN**

La cuantificación y estandarización del ADN a la concentración requerida se realizó en un espectrofotómetro (NanoDrop®, ND-1000 UV-Vis) a una absorbencia de 260 nm, la calidad del ADN se reporta como la relación de la absorbencia a 260 y 280 nm, la concentración del ADN se reporta directamente en ng/ $\mu\text{L}$ .

#### **VI.2.2. Espaciadores Transcritos Internos (ITSs)**

Para la amplificación de los espaciadores transcritos internos (ITSs) se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en reacciones de 24  $\mu\text{L}$  usando los iniciadores universales (ITS1, 5'tccgtaggtgaacctgccc 3'; ITS4, 5'tcctccgcttattgatatgc 3'). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: un paso de desnaturalización (94°C, 7 min), seguido por 35 ciclos de desnaturalización (94°C, 1 min), alineamiento (57°C, 1 min) y extensión (72°C, 1 min), y concluyendo con una extensión final (72°C, 10 min). Para preparar 1 reacción (24  $\mu\text{L}$ ) de PCR bajo las condiciones anteriores se empleó el siguiente cóctel (Cuadro 8).

Los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1% a 70 V, posteriormente se visualizaron bajo luz ultravioleta. Antes de ser secuenciados dichos productos fueron limpiados usando el Kit de Purificación QIAquick Gel Extraction de QIAgen.

Cuadro 8. Reacción de PCR

Volumen por reacción ( $\mu\text{L}$ )	
Buffer 10X de la Taq ADN polimerasa	2.5
MgCl <sub>2</sub> 50mM	0.75
dNTPs 10mM	0.5
Oligonucleótido ITS1 10 pM/ $\mu\text{L}$	1.0
Oligonucleótido ITS4 100 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$	1.0
Taq ADN polimerasa	0.2
H <sub>2</sub> O destilada, desionizada y estéril	17.55
ADN (100 ng/ $\mu\text{L}$ )	0.5
Volumen total	24

### VI.2.3. Limpieza de fragmentos

La limpieza de los fragmentos se realizó utilizando el kit de purificación QIAquick Gel Extraction de QIAGEN siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante:

1. Cortar el fragmento de ADN del gel de agarosa con una navaja limpia.
2. Pesar el gel en un tubo y agregar 3 volúmenes de buffer QG (guanidina-tiocianato) a un volumen de gel tomando en cuenta que 100 mg es igual a 100  $\mu\text{L}$ .
3. Incubar a 50°C por 10 minutos (o hasta que se disuelva el gel) mezclar el tubo cada 3 minutos para ayudar a disolver hasta solubilizar completamente. Checar que el color sea amarillo (si el color de la mezcla es naranja o violeta agregar 10  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 10M pH 5 y mezclar, el color se volverá amarillo), esto se debe a que el buffer QG contiene un indicador de pH que es amarillo a pH menor o igual a 7.5 y naranja o violeta a pH superior. La adsorción del ADN a la membrana es eficiente solo a pH menor o igual a 7.5.
4. Agregar un volumen de gel de isopropanol.
5. Armar la columna con el tubo de recolección y hacer pasar la muestra y centrifugar por un minuto. Si el volumen es mayor a 800  $\mu\text{L}$  cargar la muestra a la columna y centrifugar otra vez.
6. Descartar el flujo drenado y poner la columna en el mismo tubo de colección y agregar 500  $\mu\text{L}$  de buffer QG a la columna y centrifugar por un minuto para remover las trazas de agarosa.

7. Para lavar agregar 750  $\mu$ L del buffer PE (perclorato de sodio e isopropanol). Dejar 5 minutos y centrifugar 1 minuto. Descartar el flujo drenado y centrifugar otra vez la columna por 1 minuto a 13,000 rpm.
8. Poner la columna en un tubo limpio de 1.5 mL, y para eluir el ADN agregar 50  $\mu$ L del buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) o agua y centrifugar por 1 minuto.
9. El ADN está listo para secuenciación directa.

#### **VI.2.4. Secuenciación**

Las reacciones de secuenciación fueron realizadas en el Laboratorio nacional de Geonómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del CINVESTAV Unidad Irapuato, mediante la amplificación con la técnica de PCR en un volumen final de 20  $\mu$ L usando 100 pg de los productos amplificados de ITS, 10 pmol de cada iniciador y 9.5  $\mu$ L de Dye Terminators Premix Part No 402079 de acuerdo al protocolo de Applied Biosystems, para cada muestra. Después de calentar a 94°C por 2 minutos, la reacción consistió de 30 ciclos de 94°C un minuto, 55°C un minuto y 72°C un minuto, con 72°C por 7 minutos en el último ciclo (termociclador 9600 Thermal Cycler Perkin Elmer). Se retiró el exceso de Dye Terminators usando columnas Quick Spin (Boehringer Mannheim). Las muestras fueron directamente secadas en centrifuga al vacío y disueltas con 4  $\mu$ L de EDTA formamida desionizada a pH 8.0. Las muestras fueron cargadas dentro del secuenciador ABI Prism TM 377 ADN Sequencer y corridas por 12 horas en gel de acrilamida al 4.5% en condiciones desnaturalizantes.

#### **VI.2.5. Análisis de datos**

Las secuencias obtenidas fueron recortadas individualmente en la región 5' del ITS1 y 3' del ITS2, retirándose las secuencias correspondientes a los iniciadores usados para la amplificación en cada extremo y se usó el gen 5.8S como anclaje, basándose en las secuencias reportadas relacionadas a este género. Después de esto se procedió obtener secuencias de especies reportadas del mismo género y géneros relacionados en la base de datos del Genbank mediante el algoritmo Blast, las cuales se alinearon entre sí para la determinación de la variabilidad genética y construcción de los dendrogramas correspondientes.

Las secuencias de las especies que se utilizaron para el análisis de los datos obtenidas del GenBank fueron: *S. macrostema* var. *leavigata* (AY094152 y AY094153), *S. macrostema* var. *macrostema* (AY094158 y AY094159), *Oxera sulfurea* (AF220413), *Oxera vanuatuensis* (AF219230), *Sideritis gomeraea* (DQ900761), *Sideritis lotsyi* (DQ900764), *Stachys hirta* (AF335643), *Satureja hortensis* (AY227143) para el análisis de *S. macrostema* (Benth) Briq. y *Eryngium campestre* (AF077887), *Eryngium billardieri* (AF077886), *Lichtensteinia* sp. (DQ368859), *Eryngium cervantesii* (AF031960), *Eryngium vesiculosum* (U72388), *Lichtensteinia trifida* (DQ368861), *Sanicula canadensis* (AF031967), *Sanicula chinensis* (AF031965), *Sanicula elata* (AF031966), *Sanicula rubriflora* (AF077907) para *E. carlinae* Delar F. Para los dos especies analizadas, se utilizaron como grupos externos a *Arabidopsis thaliana* (U43225) y *Fusarium oxysporum* (AF242876). Una vez obtenidas las secuencias nuevas, éstas se reportaron al GenBank por medio del software Sequin 2.1, obtenido directamente del GenBank.

El análisis para estimar la variabilidad genética y de esta manera agrupar las especies en estudio se llevó a cabo utilizando dos algoritmos diferentes. El primero basado en la parsimonia, en el que se analizan individualmente todos los caracteres de las secuencias (nucleótidos), y de esta manera se define un número de sitios, que son informativos acerca de la topología del árbol, el árbol más parsimonioso es encontrado minimizando el número de sustituciones necesitado para explicar los sitios informativos. Para este algoritmo se utilizó el programa MegAlign de DNASTAR 7.2, por medio de CLUSTALW, mismo que generó los datos de porcentaje de identidad (similaridad genética) y divergencia (diferencias en la secuencia de nucleótidos a lo largo de los años) mediante la matriz utilizada para obtener el dendrograma.

Además de ello, para validar los datos obtenidos en los dendrogramas anteriores, se realizó un segundo análisis utilizando un algoritmo diferente, el método utilizando fue el UPGMA (promedio aritmético de grupos de pares no ponderados). El algoritmo recibe una matriz de distancias y a partir de ella genera un árbol filogenético. Inicialmente cada entidad de la matriz tiene su propio grupo. De forma recursiva, en cada paso se unen los dos grupos más cercanos y se recalculan las distancias, definiéndose la distancia entre dos grupos como la media (sin ponderar) de las distancias que hay entre los miembros de cada grupo. Este análisis se realizó

utilizando el programa CLC Free Workbench 4.6.2, por medio del cual se realizó un análisis de remuestreo para obtener los índices de confianza “bootstrap” realizando 1000 replicas.

### **VI.3. Obtención de extractos vegetales**

Las plantas se colectaron en época de floración y se secaron a temperatura ambiente en sombra. Una vez secas, las hojas se sometieron a pulverización en licuadora y se almacenaron en frascos ámbar hasta su extracción. Para la obtención de los extractos etanólicos se partió de 100 g de hojas secas (para el caso de nurite) y hojas secas mas pedúnculos florales (para el caso de hierba del sapo) perfectamente pulverizadas en un volumen de etanol de un litro. Los extractos se dejaron en almacenamiento a 4°C en frascos de vidrio ámbar por lo menos una semana. A los extractos así obtenidos se les cuantificó la concentración de compuestos por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-MS). Los extractos etanólicos se guardaron a 4 °C hasta su posterior utilización en los experimentos (García-Chávez *et al.*, 2004a).

### **VI.4. Cromatografía de gases - espectrometría de masas (CG-EM)**

A los extractos etanólicos obtenidos se les determinó la composición química por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, el análisis se llevó a cabo por medio de un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890 empleando la columna HP-5 acoplada a un espectrómetro selectivo de masas (CG-EM). El Espectrómetro de masas fue operado bajo las siguientes condiciones: la temperatura del inyector y detector de 250°C; el tamaño de inyector de 0.3 µL (10% soln.) split ratio 1:50; el helio como gas acarreador a un flujo constante de 1.0 mL/min; la temperatura programada entre 50 y 250°C a 2°C/min. Los espectros de masas fueron tomados a 70 eV con un rango de masas m/z 20 a 450. Para la identificación de los compuestos se utilizó la biblioteca NIST 02 en el software HPChem Station. La identidad se corroboró con una comparación superior al 9.6.

## **VI.5. Purificación de compuestos**

### **VI.5.1. Cromatografía en capa fina (CCF)**

Para determinar los solventes de corrida para la purificación de compuestos, se realizó una cromatografía en capa fina, partiendo de 1 mL de cada extracto se aplicó sobre placas cromatográficas (Gel de sílice 60 Sigma®) de 20 X 20 cm, la muestra se colocó a 1.5 cm del borde dejando secar durante 5 minutos. Para la fase estacionaria se probaron varios solventes que incluyeron mezclas de ellos a distintas proporciones (v/v): hexano-acetato de etilo 2:1, acetato de etilo cloroformo 2:1, etanol-alcohol isoamílico 24:1 y metanol-hexano 2:1. Las placas se corrieron el tiempo necesario hasta que el solvente de corrida alcanzó 1 cm de borde superior de la placa, posteriormente se secaron al ambiente por 10 minutos. Las placas se desarrollaron por medio de luz ultravioleta. (UV) de onda corta (245nm) y de onda larga (366nm) para determinar bandas representativas de grupos de compuestos. La realización de esta técnica únicamente fue para seleccionar los solventes de corrida que dieran la separación más efectiva de los compuestos.

### **VI.5.2. Cromatografía en columna (CC)**

Para la purificación de los compuestos se empleó la cromatografía en columna (gel de sílice 60, Sigma®; columna de 50 cm x 1 cm) con un sistema de solventes de hexano-acetato de etilo (2:1 v:v). A la columna cromatografica se le ajusto un tubo de salida, sin robinete, de aproximadamente 4 mm de diámetro interno y 50 mm de largo. Además se adaptó un trozo de algodón en su base y se transfirió un volumen de fase móvil (mezcla de hexano y acetato de etilo 2:1 (v/v) y 40 g de sílica como soporte sólido. La sílica fue previamente disuelta en 200 mL de la mezcla de hexano y acetato de etilo 2:1 (v/v) hasta obtener una mezcla homogénea y espesa; una vez obtenida esta mezcla, se transfirió a la columna cromatográfica, la cual se “empacó” presionando suavemente, hasta que se obtuvo una masa uniforme.

La purificación de compuestos partiendo de los extractos etanólicos a los cuales previamente se les determinó su composición química por medio de CG-EM, se realizó bajo el siguiente procedimiento: usando la información del tiempo que duró la corrida en el análisis previo de CG-EM y el numero de fracciones a separar se calculó un factor, que permitió estimar mediante el tiempo de retención de cada

compuesto en que fracción se colectaría el compuesto a separar. Una vez obtenida esta información se tomaron 2.5 mL del extracto etanólico y se colocaron en la parte superior de la columna de vidrio empacada de silica gel. Posteriormente esta columna se eluyó con la mezcla de hexano-acetato de etilo 2:1 v/v. Finalmente se colectaran 25 fracciones de 1mL y dos volúmenes muertos de 25 mL al inicio y al final de la corrida los cuales se guardaron en viales de vidrio ambar de una capacidad de 1.5 mL y en matraces Erlenmeyer de 50 mL respectivamente. Una vez obtenidas las fracciones y los volúmenes muertos se analizaron mediante CG-EM, utilizando las mismas condiciones que en el análisis de la composición química de los extractos etanólicos.

### **VI.5.3. Concentración de compuestos y preparación de dosis**

Una vez obtenida la cuantificación de cada fracción purificada mediante cromatografía en columna y verificar su pureza por medio del análisis de CG, se seleccionaron los terpenoides mayoritarios y se procedió a su concentración.

Para obtener un stock con la suficiente concentración para preparar las diferentes dosis para la realización de bioensayos se repitió el procedimiento de cromatografía en columna alrededor de 15 veces, bajo las condiciones ya estandarizadas; una vez obtenidas todas las fracciones, se verificó la concentración mediante CG-EM nuevamente y se llevaron a sequedad por evaporación, con remoción al vacío en un rotavapor (55°C) y 100 rpm, finalmente los terpenoides se resuspendieron en un volumen conocido de etanol absoluto. Partiendo de la concentración obtenida en el stock de cada compuesto se prepararon distintas dosis: 500, 250, 100 y 50 mg/L.

### **VI.6. Bioensayos con hongos y oomicetos**

La actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos crudos y compuestos purificados se realizó por medio del método de micelio sobre disco en medio PDA (agar papa dextrosa), con la realización de tres réplicas por duplicado, determinando el desarrollo de micelio al tiempo de crecimiento óptimo en la caja Petri, de cada hongo u oomiceto. El protocolo fue el siguiente: se impregnaron discos con 50 µL de los diferentes extractos o compuestos purificados y con etanol abs., para este último usarlo como testigo (control negativo). Posteriormente los discos se colocaron sobre

el medio de cultivo y se sembraron fragmentos de micelio (0.2 cm<sup>2</sup>) sobre éstos. Después de este paso, se incubaron entre 22 y 25°C y se determinó el crecimiento del micelio en cm de diámetro al tiempo que cada oomiceto alcanzó su máximo crecimiento. Finalmente se determinó el crecimiento del micelio en cm de diámetro y éste se expresó como porcentaje de inhibición, tomando en cuenta que con los testigos hubo el 100% de crecimiento. Las concentraciones que se evaluaron fueron de 50, 100, 250 y 500 mg/L.

Para el caso de los oomicetos *P. capsici* y *P. cinnamomi* se utilizó como control positivo, la adición de 50 µL [100 mg/L] de Mefenoxam (Ridomil Gold-4E, Novartis Greensboro, 46.2% i. a.), antioomiceto comercial, concentración basada en la reportada para Metalaxil, inhibitoria del 100% de crecimiento de micelio *in vitro* para varias especies de *Phytophthora* (Matheron y M. Porchas, 2000; Thomidis y Michailidis, 2002). Para los hongos *F. oxysporum*, *B. cinerea* y *C. lindemuthianum* como controles positivos de la inhibición del crecimiento, se adicionaron 50 µL del fungicida comercial Tecto 60 (1mg/L), para conseguir un 100% de inhibición.

#### **VI.6.1. Análisis estadístico**

Tanto para los hongos y oomicetos, cada experimento se desarrolló con tres réplicas por duplicado bajo un diseño de bloques completamente al azar, sometién dose a un análisis de varianza ( $p \leq 0.05$ ) y a una prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) mediante el programa Statistica 7.0.

#### **VI.7. Composición química de los extractos crudos de plantas en distintos estados de desarrollo.**

Se realizó a partir de plantas en diferentes estados de desarrollo, para el caso de nurite plantas de 30, 45, 60 y 90 días de edad, para el caso de hierba del sapo plantas antes, durante y después de la floración, así como plantas en fructificación. Para realizar este estudio se obtuvieron los diferentes extractos etanólicos en los distintos estados de desarrollo tal y como se obtuvieron los extractos crudos iniciales y se inyectaron en el sistema GC-MS de manera directa para obtener el perfil de compuestos.

## **VII. RESULTADOS**

### **VII.1. Clasificación molecular de las plantas en estudio mediante nrADN-ITSs**

La clasificación molecular de las plantas en estudio se estableció con base en la secuenciación de sus espaciadores transcritos internos (ITSs) de su ADN ribosomal nuclear (nrADN). Al analizar la información obtenida y construir los dendrogramas respectivos, se logró ubicar plenamente las especies en estudio por medio de la clara agrupación con especies cercanas ó idénticas a las estudiadas, además de los datos del porcentaje de identidad, divergencia y disimilaridad obtenidos. Para robustecer el análisis se usaron dos programas de cómputo distintos los cuales generaron los mismos resultados.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que mediante la amplificación de los espaciadores transcritos internos (ITSs) del ADN ribosomal nuclear (nrADN), se puede clasificar molecularmente muchas especies de plantas de una manera rápida y eficiente.

#### **VII.1.1. Extracción de ADN**

Después de probar varios protocolos para la extracción de ADN (Jobes *et al.*, 1995; Bekesiova *et al.*, 1999; Pirtillä *et al.*, 2001); se obtuvo ADN de buena calidad y en cantidad suficiente de las dos plantas en estudio (nurite y hierba del sapo) con las modificaciones del método descrito por Edwards en el 2001.

La calidad del ADN genómico, aislado de tejido fresco, evaluado por electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio (Figura 4) resultó adecuada para los análisis llevados a cabo. La cuantificación y estandarización del ADN a la concentración requerida para la técnica nrADN-ITSs (50 ng) se realizó con la ayuda de un espectrofotómetro (NanoDrop®, ND-1000 UV-Vis). Las concentraciones estuvieron en los rangos de 153-200 ng/μL para nurite y 500-900 ng/μL para hierba del sapo, resultados obtenidos de dos extracciones independientes para cada planta.

## VII.1.2. Amplificación

La amplificación de la región de los ITS generó bandas de aproximadamente 690 pb, visualizados en un gel de agarosa al 1%, corrido a 70 volts por una hora y 30 minutos, variando la intensidad de las bandas con base en su peso molecular entre las dos diferentes especies de plantas de este estudio (Figura 5).

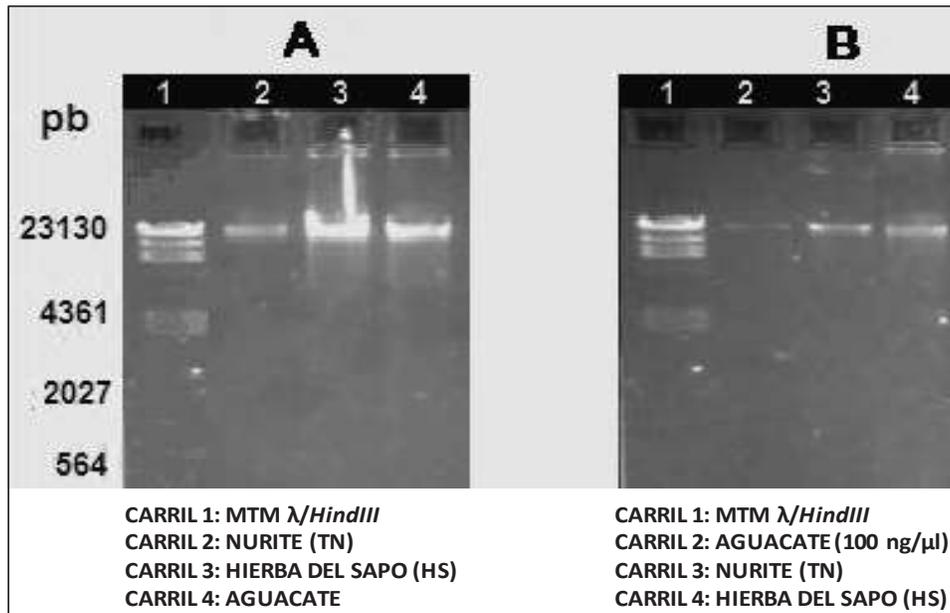


Figura 4. Electroforesis del ADN de *S. macrostema* (nurite) y *E. carlinae* (hierba del sapo) (Edwards *et al.*, 2001); A. Sin estandarizar; B. Estandarizados a 100 ng/μL.

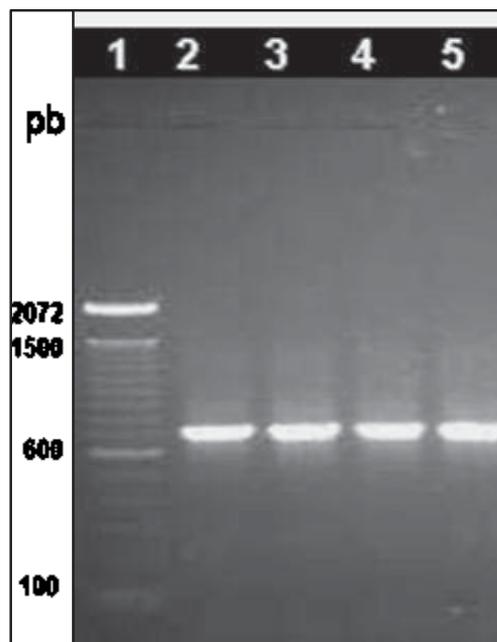


Figura 5. Electroforesis de los productos de amplificación por PCR. **Carril 1:** MTM 100pb; **Carriles 2 y 3:** región ITS1-5.8S-ITS2 de *S. macrostema* (nurite) **Carriles 3 y 4:** región ITS1-5.8S-ITS2 de *E. carlinae* (hierba del sapo).

Los fragmentos de amplificación correspondientes a la región ITS1-5.8S-ITS2 de *S. macrostema* y *E. carlinae* fueron cortados y limpiados utilizando el kit de purificación QIAquick Gel Extraction de QIAGEN, tal y como se describe en la sección de materiales y métodos, posteriormente fueron secuenciados, esto es: el tratamiento con el kit de limpieza permitió obtener ADN limpio, sin residuos de carbohidratos, ARN y oligonucleotidos; al ser cortados resultaron aptos para secuenciación.

### VII.1.3. Secuenciación

La secuenciación de los fragmentos ITS1-5.8S-ITS2 de nurite y hierba del sapo realizada por duplicado se muestra en el (Cuadro 9). La longitud de los fragmentos resulto de 609 y 628 pb respectivamente.

Cuadro 9. Secuencias obtenidas de las regiones ITS1-5.8S-ITS2, de *S. macrostema* y *E. carlinae* obtenidas en el presente estudio.

<p><b>ITS1 <i>Satureja macrostema</i> Benth Briq. (253 pb)</b></p> <p>CCTGCAAAGCAGACCGCCGAACACGTTCAACACAAAACCCGGCGCCGCGGAGTGGGGGCGACCC            CCCGGCCGGCGTGTGCGCTCGCGTCCGCTCGGTCTAACAACCTGGGCGCGGCGCGGA            ATGCGCGCAAGGAAATCAAAATTGAGCATCCCCCTCCCCAGACGCGCCCGTTTCGCGGGCGACG            GGGAGACAGGATGCCTATCGAAATGTCTAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTGGCTCTC</p> <p><b>5.8S <i>Satureja macrostema</i> Benth Briq. (166 pb)</b></p> <p>GCATCGATGAAGAAGTACGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAG            TCTTAGAACGCAAGTTGCGCCCCGAAGCCATTAGCCCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTACGCAT            CGCGTCGCCCCCTCCTCCCACTCGACTAACTCCGG</p> <p><b>ITS2 <i>Satureja macrostema</i> Benth Briq 190 pb)</b></p> <p>GAGAAGGCGGGGCCGGAGATTGGCCCCGGCCGGCCAAATGCGATCCTCGGCGGCGCACGTC            TCGACCAGTGGTGGTTGAACGATCAACTCGCGTGTGCTGCTGCTCAAGGCGCCGCCGTCAGGGA            AATCGAAGCCGTCCGGAGAAGACCGCAGGACCCAACGGAGCGATCCCGCAACGCTCCCACGA</p>
<p><b>ITS1 <i>Eryngium carlinae</i> Delar F. (242 pb)</b></p> <p>ACGATGCCTGCAGAGGGAGACCGACGCGGAAACACGTTAAAAATACTTCGGGTATTGGGCGAT            CGGCCGGGACGCGCGCGGAGCTCCCCGTGTCGGTGACCCCTTTGGCGGAGGGCGTCTCCGGG            CGCTCCGCGGCCACAACTCACCCCGCGCGGAATGCCCAAGGAAATAGAAACGAACTGCACG            TTGTGCCCCGGTTAGCGCGGGCGGGCCGTCGGCGGTCTTTCAGAAACACA</p> <p><b>5.8S <i>Eryngium carlinae</i> Delar F. (163 pb)</b></p> <p>AACGACTCTCGGCAACGGATCTCCCGGCTCTCGCGCTCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATAC            TTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAAGCCATT            AGCGGCAAGGCGAGTCCGCCTGGGCGTACGCG</p> <p><b>ITS2 <i>Eryngium carlinae</i> Delar F. (223 pb)</b></p> <p>ATCGGCTCGCCCCCAAACAGCACTCTAGCGGGTCTGAGGGGCGGATAATGGCCTCCCCTG            CATCGCTCGCAGGCTGGCCAAAAGCGAGTCCCCGTGCGACAGGATGTACGGCGGCATGTGGTG            GTTGTAAAAAGGCCGTCTCTCAGTGCCGCGTCCCGTCCCGTCCGTCGGTGCAGCTCTTGTGACGC            TTGGCGGCGCCAACGCTGATGCGTCTCGA</p>

#### VII.1.4. Determinación de la variabilidad genética

El análisis para estimar la variabilidad genética y de esta manera agrupar las especies en estudio, se llevó a cabo utilizando dos algoritmos diferentes tal y como se describe en la sección de materiales y métodos. Los alineamientos de las secuencias relacionadas al género *Satureja* y *Eryngium*, se muestran en los Anexos XI.1 y XI.2, únicamente se muestran los realizados con el programa MegAlign de DNASTAR 7.2.

En los alineamientos (Anexos XI.1 y XI.2) se marca con sombra roja aquellos residuos que difieren de las secuencias en estudio, además se marca la secuencia consenso, misma que está representada por un código de colores que va desde el negro (para indicar el residuo menos común), azul oscuro, azul cielo, verde, naranja y rojo (para indicar el residuo idéntico). Tanto para *S. macrostema*, como para *E. carlinae* se observa que el mayor porcentaje de identidad se da entre las plantas más estrechamente relacionadas, es decir pertenecientes al mismo género. Incluso para *S. macrostema*, se observa una secuencia que coincide al 100% con la secuencia en estudio, se trata de *S. macrostema* var. *leavigata*, lo que facilita la certificación en la identificación taxonómica de este espécimen.

##### VII.1.4.1. *S. macrostema* (Benth) Briq.

Los porcentajes de identidad (similaridad genética) obtenidos del alineamiento entre las especies relacionadas al género *Satureja* se muestran en el (Figura 6). Los dendrogramas construidos con los dos algoritmos se muestran en las (Figuras 7 y 8). De la Figura 6, se puede observar que existe una especie idéntica a *S. macrostema* (Benth) Briq., la cual es *S. macrostema* var. *leavigata* con un porcentaje de identidad del 100% y una divergencia 0, lo que permite tener la certeza de que se trata de la misma especie, la especie a la que sigue en cercanía es *S. macrostema* var. *macrostema* con una identidad de 97.3% y divergencia de 2.7. Otras de las especies de géneros relacionados utilizadas para robustecer el análisis que tuvieron un gran porcentaje de identidad fueron *O. sulfurea* y *O. vanuatuensis* con 86 y 85% respectivamente.

En la (Figura 7) se observa el dendrograma más parsimonioso, obtenido por medio del programa MegAlign de DNASTAR 7.2. de las especies relacionadas al género *Satureja*, se puede ver claramente la formación del primer grupo superior que incluye a *S. macrostema* var. *laevigata*, *S. macrostema* (Benth) Briq. y *S. macrostema* var. *macrostema*, donde las dos primeras no muestran diferencia alguna. El segundo grupo que le sigue incluye a *Sideritis gomeraea*, *Sideritis lotsyi* y *Stachys hirta*. En el tercer grupo se encuentran *O. sulfurea* y *O. vanuatuensis*. Finalmente *S. hortensis*, así como los grupos externos *A. thaliana* y *F. oxysporum* no muestran agrupación. La secuencia consenso determinó la raíz de las secuencias analizadas a 39.6% de disimilaridad.

De igual manera en la (Figura 8) se presenta el dendrograma realizado con el método de agrupación UPGMA mediante el programa CLC Free Workbench 4.6.2, donde además se muestra los resultados del análisis “bootstrap” realizado con 1000 replicas. Las agrupaciones formadas son exactamente las mismas que con el algoritmo presentado en la (Figura 7). Los valores de los índices de confianza “bootstrap” presentados en los nodos del dendrograma fueron 75.9 a 100%, valores arriba de 90% indican alta confiabilidad. El valor del índice en el nodo del grupo donde se encuentra la especie en estudio fue de 100%, lo que robustece el presente análisis.

		Percent Identity												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
Divergence	1	■	52.3	62.8	62.1	60.1	60.5	58.6	60.1	59.5	59.8	60.5	1	<i>Arabidopsis thaliana</i> ((U43225).seq
	2	77.4	■	52.1	51.6	51.5	52.4	50.9	51.5	52.6	53.1	52.1	2	<i>Fusarium oxysporum</i> (AF242876).seq
	3	52.2	81.0	■	98.3	86.0	87.2	76.8	86.0	82.5	82.7	82.9	3	<i>Oxera sulfurea</i> (AF220413).seq
	4	53.6	82.7	1.7	■	85.3	86.5	76.2	85.3	81.8	82.0	82.2	4	<i>Oxera vanuatuensis</i> (AF219230).seq
	5	58.1	80.9	15.5	16.4	■	97.3	75.1	100.0	86.5	87.5	91.7	5	<i>S. macrostema</i> var. <i>laevigata</i> (AY094152),
	6	57.3	79.1	14.1	15.0	2.7	■	75.3	97.3	87.1	88.1	92.8	6	<i>S. macrostema</i> var. <i>macrostema</i> (AY094158)
	7	60.4	80.8	27.6	28.4	30.0	29.7	■	75.1	75.4	75.8	75.6	7	<i>Satureja hortensis</i> (AY227143).seq
	8	58.1	80.9	15.5	16.4	0.0	2.7	30.0	■	86.5	87.5	91.7	8	<i>Satureja macrostema</i> (Benth) Briq..seq
	9	60.0	79.0	19.8	20.7	14.8	14.1	29.4	14.8	■	98.1	91.8	9	<i>Sideritis gomeraea</i> (DQ900761).seq
	10	59.4	77.8	19.8	20.7	13.7	13.0	28.9	13.7	1.7	■	92.1	10	<i>Sideritis lotsyi</i> (DQ900764).seq
	11	57.1	80.7	19.5	20.4	8.8	7.6	29.2	8.8	8.5	8.3	■	11	<i>Stachys hirta</i> (AF335643).seq
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		

Figura 6. Porcentaje de identidad y divergencia, con el programa MegAlign de DNASTAR 7.2., de las secuencias ITS1-5.8S-ITS2 de las especies relacionadas al género *Satureja*.

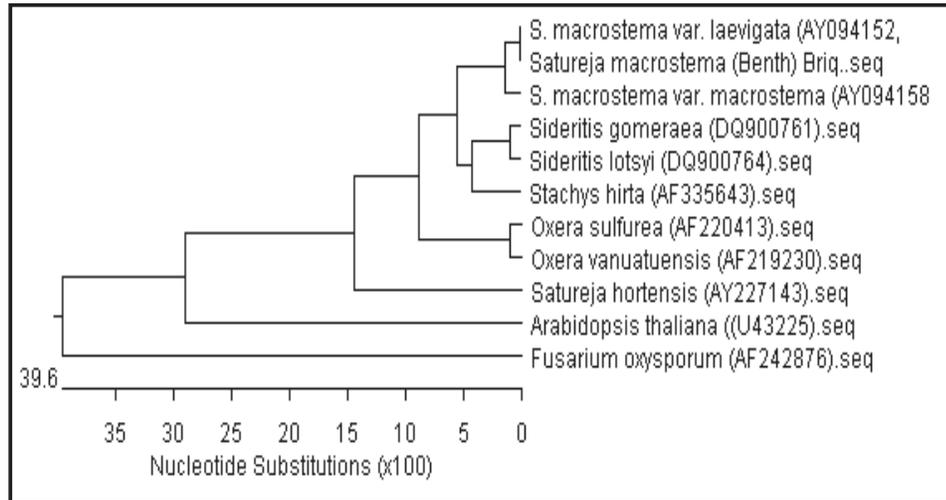


Figura 7. Dendrograma más parsimonioso obtenido a partir de las secuencias ITS1-5.8S-ITS2 para las especies relacionadas al género *Satureja*, obtenido mediante el algoritmo ClustalW por medio del programa MegAlign de DNASTAR 7.2.. Los valores inferiores indican el porcentaje de disimilaridad entre los taxa.

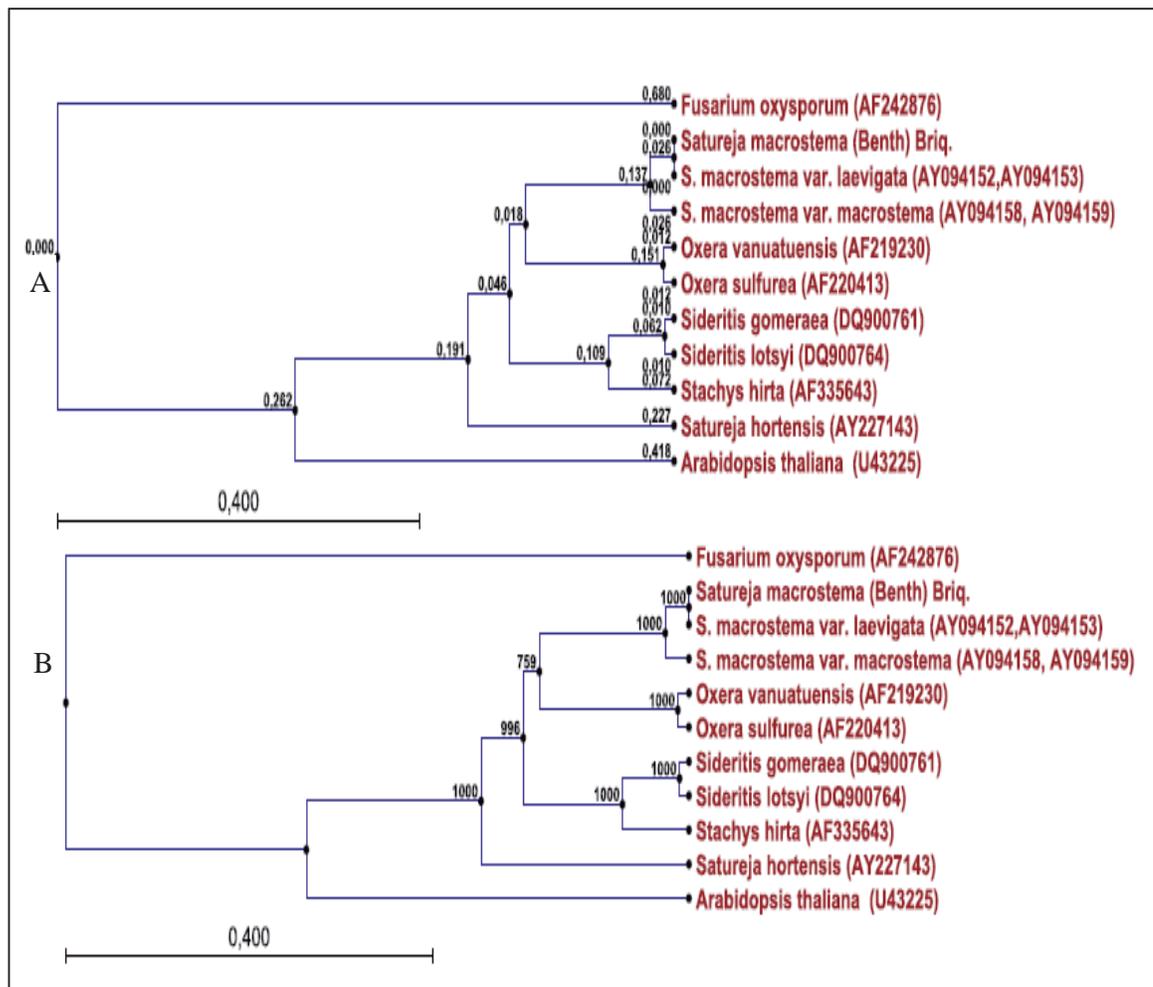


Figura 8. Dendrograma a partir de las secuencias ITS1-5.8S-ITS2 para las especies relacionadas al género *Satureja*, obtenido por el método de agrupación UPGMA mediante el programa CLC Free Workbench 4.6.2. Los valores en los nodos indican A. Los porcentajes de disimilaridad entre los taxa y B. Los valores del análisis de remuestreo bootstrap.

De esta manera con los resultados obtenidos podemos concluir que la especie clasificada mediante taxonomía tradicional como *S. macrostema* (Benth) Briq. es *S. macrostema* var. *leavigata*. Las secuencias de la región ITS1 e ITS2 de esta última especie ya están reportadas en el banco de datos GenBank bajo los números de accesión AY094152 y AY094153.

#### VII.1.4.2. *E. carlinae* Delar F.

Los porcentajes de identidad (similaridad genética) obtenidos del alineamiento entre las especies relacionadas al género *Eryngium* se muestran en la Figura 9. Los dendrogramas construidos con los dos algoritmos se muestran en las (Figuras 10 y 11). En la Figura 9 se puede observar que existe una especie con un alto porcentaje de identidad a *E. carlinae*, la cual es *E. campestre* con una identidad del 98.4% y una divergencia 1.6, lo que permite ubicar a la especie en estudio dentro del género *Eryngium*. La especie a la que sigue en cercanía es *E. billardieri* con una identidad de 97.4% y divergencia de 2.6. De manera general todas las especies del género *Eryngium* utilizadas en el análisis mostraron porcentajes de identidad altos del alrededor del 81%. Otras de las especies de géneros relacionados utilizadas para robustecer el análisis que tuvieron un gran porcentaje de identidad fueron *Lichtensteinia* sp., *L. trifida*, *S. canadensis*, *S. chinensis*, *S. elata*, *S. rubriflora* con valores altos de alrededor de 80% de identidad.

En la (Figura 10) se observa el dendrograma más parsimonioso, obtenido por medio del programa MegAlign de DNASTAR 7.2. de las especies relacionadas al género *Eryngium*, se puede ver claramente que en el grupo donde se encuentra la especie en estudio (*E. carlinae*), se localizan de igual forma *E. campestre* y *E. billardieri*. Otro grupo bien definido es el formado por las especies del género *Sanicula*. Finalmente los grupos externos *A. thaliana* y *F. oxysporum* no muestran agrupación. La secuencia consenso determinó la raíz de las secuencias analizadas a 43.1% de disimilaridad.

La (Figura 11) presenta el dendrograma realizado con el método de agrupación UPGMA mediante el programa CLC Free Workbench 4.6.2, donde además se muestra los resultados del análisis de remuestreo “bootstrap” realizado con 1000 replicas. Las agrupaciones formadas son exactamente las mismas que con el

algoritmo presentado en la (Figura 10). El valor de 100% en el índice de confianza “bootstrap” en nodo donde se agrupa la especie en estudio (*E. carlinae*) permitió robustecer el análisis y sin lugar a duda ubicar a esta especie dentro del género *Eryngium* y muy cercana en identidad genética a las especies *E. campestre* y *E. billardieri*.

		Percent Identity														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
Divergence	1	■	57.9	58.1	57.4	59.0	59.2	47.6	59.9	60.0	58.8	59.0	60.1	59.1	1	<i>Arabidopsis thaliana</i> (U43225).seq
	2	62.3	■	99.0	97.4	82.7	81.9	51.2	82.3	81.5	81.0	81.8	81.4	80.7	2	<i>Eryngium billardieri</i> (AF077886).seq
	3	61.9	1.0	■	98.4	83.1	82.2	50.3	82.6	81.6	81.7	82.5	81.8	81.4	3	<i>Eryngium campestre</i> (AF077887).seq
	4	63.6	2.6	1.6	■	81.5	80.7	49.5	81.1	80.1	80.2	81.1	80.4	80.1	4	<i>Eryngium carlinae</i> Delar F. seq
	5	58.9	18.7	18.2	20.4	■	92.6	51.8	80.9	80.8	86.3	87.1	85.8	86.8	5	<i>Eryngium cervantesii</i> (AF031960).seq
	6	58.5	19.8	19.5	21.6	6.1	■	52.2	81.8	81.7	85.6	86.5	85.1	86.2	6	<i>Eryngium vesiculosum</i> (U72388).seq
	7	92.5	81.5	83.9	86.7	77.7	76.1	■	50.8	50.9	51.9	51.7	51.8	52.1	7	<i>Fusarium oxysporum</i> (AF242876).seq
	8	57.9	20.3	19.9	21.8	21.3	20.2	81.4	■	97.5	79.4	80.4	79.3	79.8	8	<i>Lichtensteinia</i> sp.(DQ368859).seq
	9	57.5	21.4	21.2	23.2	21.4	20.3	81.1	2.5	■	79.5	80.1	79.2	79.8	9	<i>Lichtensteinia trifida</i> (DQ368861).seq
	10	60.7	21.7	20.8	22.7	14.1	14.8	78.0	24.0	23.8	■	96.6	95.1	96.2	10	<i>Sanicula canadensis</i> (AF031967).seq
	11	60.0	20.6	19.7	21.4	13.1	13.8	78.5	22.6	23.0	2.9	■	95.9	96.9	11	<i>Sanicula chinensis</i> (AF031965).seq
	12	57.8	21.5	21.0	22.8	15.1	15.8	78.8	24.4	24.5	4.8	3.9	■	95.6	12	<i>Sanicula elata</i> (AF031966).seq
	13	60.1	22.4	21.5	23.2	13.7	14.5	77.8	23.8	23.7	3.7	2.9	4.6	■	13	<i>Sanicula rubriflora</i> (AF077907).seq
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		

Figura 9. Porcentaje de identidad y divergencia, con el programa MegAlign de DNASTAR 7.2., de las secuencias ITS1-5.8S-ITS2 de las especies relacionadas al género *Eryngium*.

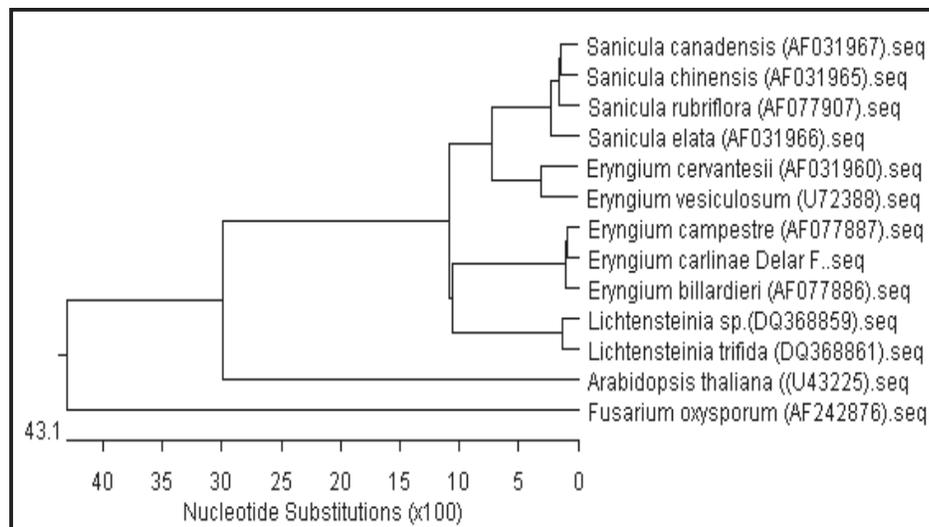


Figura 10. Dendrograma más parsimonioso obtenido a partir de las secuencias ITS1-5.8S-ITS2 para las especies relacionadas al género *Eryngium*, obtenido mediante el algoritmo ClustalW por medio del programa MegAlign de DNASTAR 7.2.. Los valores inferiores indican el porcentaje de disimilaridad entre los taxa.

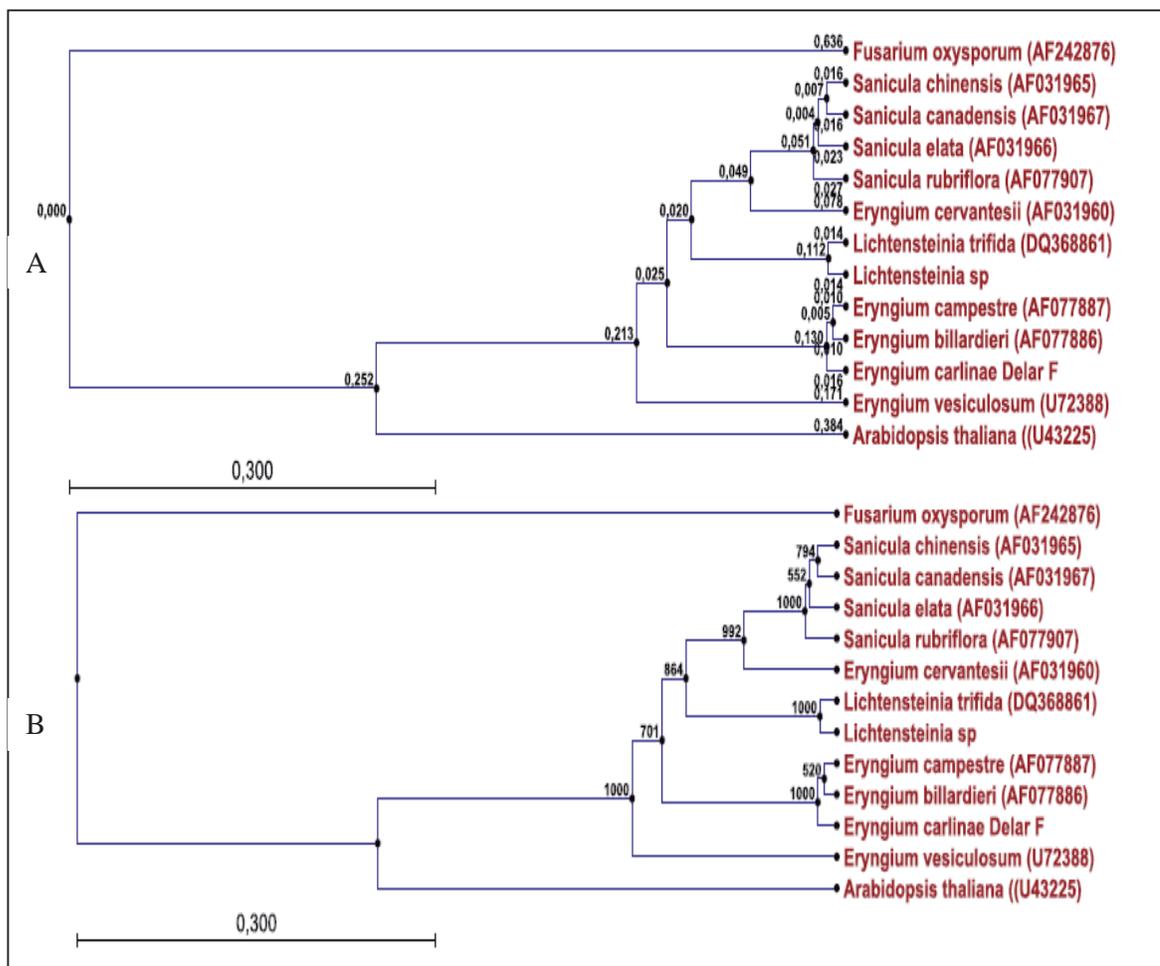


Figura 11. Dendrograma más parsimonioso obtenido a partir de las secuencias ITS1-5.8S-ITS2 para las especies relacionadas al género *Eryngium*, obtenido mediante el algoritmo ClustalW por medio del programa MegAlign de DNASTAR 7.2.. Los valores inferiores indican el porcentaje de disimilitud entre los taxa.

Con los resultados obtenidos, la especie en estudio fue clasificada como *E. carlinae* Delar F. La secuencia de la región ITS (ITS1-5.8S-ITS2) del nrADN de esta especie fue reportada al banco de datos (GenBank) por medio del software Sequin 2.1, el número de acceso provisto fue: EU089972 (Anexo XI.3).

## VII.2. Composición química de los extractos crudos de *S. macrostema* y *E. carlinae*.

Al realizar el análisis por CG-EM (98% de confiabilidad) de los extractos crudos de hojas de *S. macrostema* y hojas mas pedúnculos florales de *E. carlinae* obtenidos por pulverización y extracción con etanol, se identificaron 26 metabolitos para *S. macrostema* y 21 metabolitos para *E. carlinae* (Cuadros 10 y 11), como principales constituyentes, en su mayoría del grupo de los terpenoides. La utilización conjunta

de la CG y la espectrometría de masas permite aunar las notables cualidades de separación de la primera, con las propiedades analíticas de la segunda. La identificación de los compuestos se realizó por comparación del patrón de fragmentación correspondiente al ión molecular, el pico base y los fragmentos más característicos de acuerdo a la biblioteca NIST2002.

Cuadro 10. Compuestos mayoritarios del extracto etanólico de hojas de *S. macrostema* (Benth) Briq.

<b>NURITE</b>			
<b>Compuesto</b>	<b>[mg/L]</b>	<b>Compuesto</b>	<b>[mg/L]</b>
1,8-cineol	55	Isoeugenol	<1
1-noneno	36	Limoneno	5700
$\alpha$ -pineno	20	Mentol	1010
$\alpha$ -terpineol	100	Menteno	305
$\beta$ -pineno	22	Metil-éster-decanoato	<1
Canfeno	19	Mirceno	22
Cedrol	<1	$\rho$ -cimeno	<1
Citronelol	150	Alcohol de patchouli	<1
Citronenal	15	Óxido-1 piperitona	750
Ácido decanoico	<1	Piperitenona	95
Dodecanal	190	Óxido de piperitenona	1500
EO	255	Pulegona	180
Isoborneol	<1	Espatulenol	150

Al integrar el área en los cromatogramas obtenidos (Figuras 12 y 13) se determinaron los compuestos mayoritarios para *S. macrostema* Benth Briq.: limoneno (35.54%, con un tiempo de retención,  $Tr=1.44$ ), óxido de piperitona (25.71%,  $Tr=20.23$ ), piperitona (10.10%,  $Tr=21.95$ ), mentol (7.27%,  $Tr=0.46$ ), dodecanal (5.38%,  $Tr=14.86$ ), menteno (4.43%,  $Tr=1.23$ ), espatulenol (3.51%,  $Tr=12.08$ ), pulegona (2.59%,  $Tr=7.11$ ),  $\alpha$ -terpineol (1.91%,  $Tr=3.00$ ), citronelol (1.91%,  $Tr=9.59$ ) (Figura 12).

Cuadro 11. Compuestos mayoritarios del extracto etanólico de hojas y pedúnculos florales de *E. carlinae* Delar F.

<b>HIERBA DEL SAPO</b>					
<b>Compuesto</b>	<b>[mg/L]</b>	<b>Compuesto</b>	<b>[mg/L]</b>	<b>Compuesto</b>	<b>[mg/L]</b>
Acetato de Linalilo	<1	Mirceno	256	cis-ocimeno	<1
$\alpha$ -felandreno	44	N.I.	<2	Limoneno	22
allo-Ocimeno	156	$\rho$ -cimeno	78	Linanol	35
$\alpha$ -pineno	278	$\rho$ -felandreno	56	Trans-ocimeno	<1
$\alpha$ -terpineno	<1	$\rho$ -pineno	120	$\alpha$ - $\gamma$ -terpineno	78
$\alpha$ -terpineol	67	Sabineno	78		
Borneol	367	Terpinen-4-ol	35		
Cariolfileno	225	Terpinoleno	66		

Para el caso de *E. carlinae* Delar F. los compuestos mayoritarios fueron  $\rho$ -pineno (13.47%, Tr=1.04), sabineno (6.69%, Tr=27.34), borneol (6.58%, Tr=24.19),  $\alpha$ -pineno (4.24%, Tr=1.53), mirceno (3%, Tr=13.48), cariofileno (2.73%, Tr=23.3) y cis ocimeno (1.76%, Tr=1.95).  $\alpha$ - $\gamma$ -terpineno (1.52%, Tr=1.68) (Figura 13).

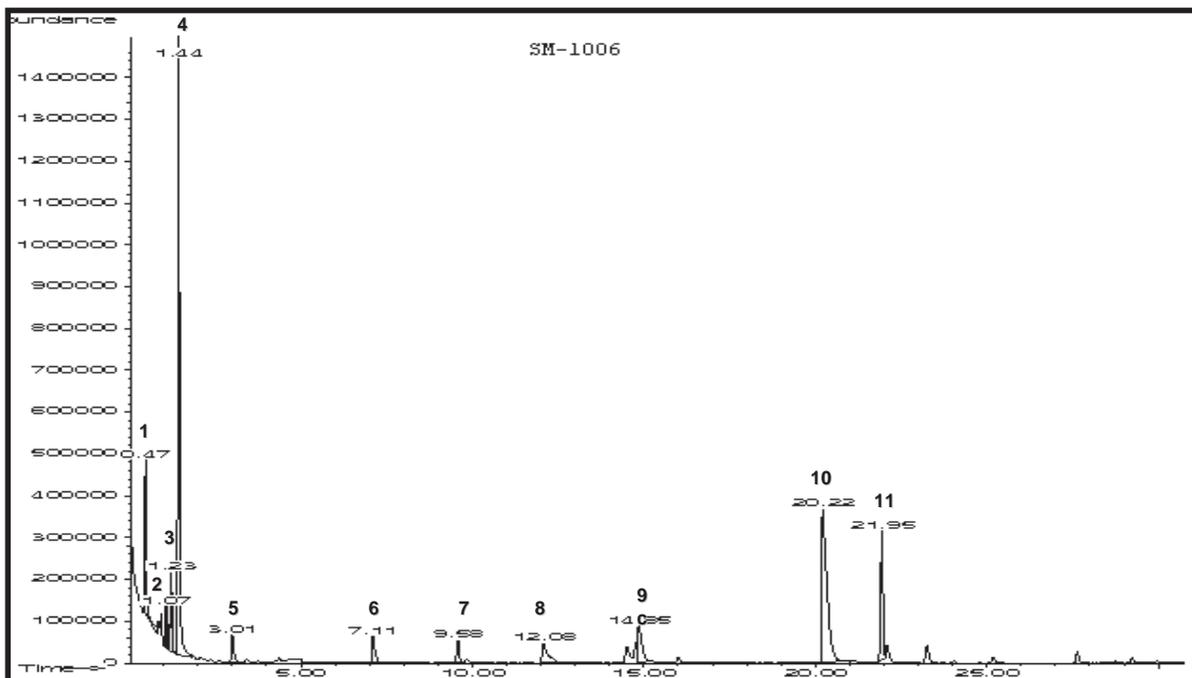


Figura 12. Cromatograma del extracto etanólico de *Satureja macrostema* (Benth) Briq. Compuestos mayoritarios: 1. mentol, 2. óxido de etileno, 3. menteno, 4. limoneno, 5. terpineol, 6. pulegona, 7. citronelol, 8. espatulenol, 9. dodecanal, 10. Óxido de piperitona, 11. Piperitona

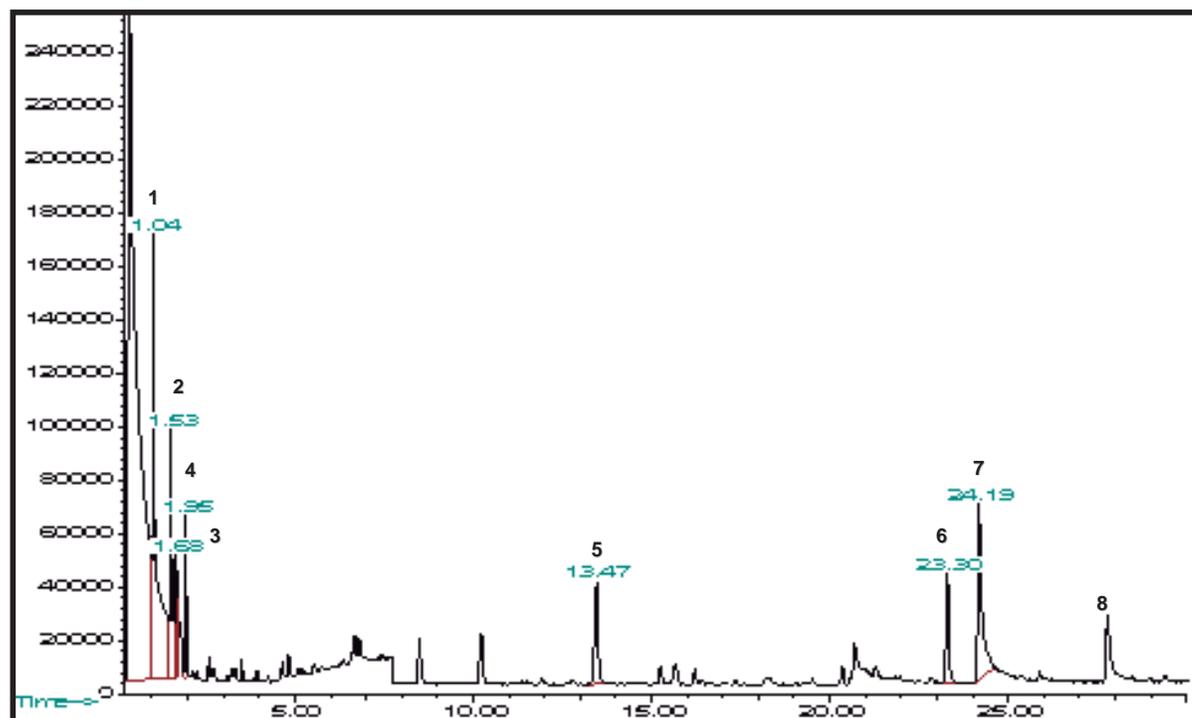


Figura 13. Cromatograma del extracto etanólico de hojas y pedúnculos florales de *Eryngium carlinae* Delar F. Compuestos mayoritarios: 1.  $\rho$ -pineno, 2.  $\alpha$ -pineno, 3.  $\alpha$ - $\gamma$ -terpineno, 4. cis ocimeno, 5. mirceno, 6. cariofileno, 7. borneol, 8. sabineno

### **VII.3. Estandarización del sistema de extracción, análisis y purificación de los terpenoides mayoritarios.**

Tal como se describió en la sección de materiales y métodos, se separaron 25 fracciones de los extractos etanólicos de cada planta, por medio de cromatografía en columna, para ello se usó la información del tiempo que duró la corrida de CG-EM y el número de fracciones a separar, que permitió estimar mediante el tiempo de retención de cada compuesto, en que fracción se colectaría el compuesto a separar.

Los resultados obtenidos en el análisis de CG-EM de las 25 fracciones de cada planta, permitieron caracterizar a varios terpenoides, de los cuales solo se seleccionaron los terpenoides mayoritarios para su purificación y concentración, bajo el criterio de que la acción antimicrobiana del aceite esencial se debe a los compuestos mayoritarios (Kan *et al.*, 2006; Kotan *et al.*, 2007). Se seleccionaron 5 terpenoides para el caso de nurite y 2 para hierba del sapo (Cuadro 12).

La concentración de los terpenoides para obtener una solución concentrada del cual se pudieran preparar varias dosis, se realizó siguiendo las condiciones estandarizadas inicialmente al separar las 25 fracciones por cromatografía en columna. Dichas condiciones, como cantidad de gel de sílice 60 Sigma® utilizada para empacar la columna, condiciones de corrida, volúmenes de solventes utilizados, se repitió en la realización de cada cromatografía en columna hasta obtener dicha solución concentrada.

Como se ve en el Cuadro 12, todos los terpenoides se pudieron purificar y concentrar con relativa facilidad a excepción del limoneno. Para obtener los stocks, las fracciones obtenidas en las distintas repeticiones de las cromatografías en columna se llevaron a sequedad y se resuspendieron en etanol, tal y como se describió anteriormente. Las dosis que se prepararon de cada compuesto fueron de 500, 250, 100 y 50 mg/L. Para el caso del limoneno, éste se obtuvo comercialmente, de esta manera se obtuvieron todos los terpenoides para ser usados en los análisis de la evaluación de la actividad antimicrobiana, como se describirá más adelante.

Cuadro 12. Terpenoides purificados (TN=nurite, HS=hierba del sapo)

FRACCIÓN	COMPUESTO	[Soln. concentrada] mg/L
1TN	$\alpha$ -pineno	68
	$\beta$ -pineno	34
	$\rho$ -Pineno	134
	Limoneno	9300
	Mentol	1120
2TN	Mentol	1340
5TN	Pulegona	470
9TN	Espatulenol	1160
15TN	Óxido piperitona	3000
10HS	Mirceno	490
17HS	Borneol	1360

#### VII.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana

Antes de realizar los bioensayos, se determinó el período óptimo de incubación para cada hongo u oomiceto. Debido a que el tiempo varió para cada microorganismo, se seleccionaron los tiempos en los que el crecimiento micelial fue el máximo, sincronizando los tiempos de crecimiento de todos los microorganismos utilizados en este estudio. Los tiempos seleccionados fueron los siguientes: *F. oxysporum* (4 días), *B. cinerea* (4 días), *C. lindemuthianum* (10 días), *P. capsici* (6 días) y *P. cinnamomi* (8 días).

Los bioensayos con los extractos crudos se realizaron antes de realizar los bioensayos con los metabolitos purificados. Los resultados se muestran en los Cuadros 13 y 14, Figuras 14, 15, 16 y 17.

Las Figuras 14 y 15, junto con las Cuadros 13 y 14 muestran los resultados de la inhibición ejercida por los terpenoides mayoritarios, ensayados por separado, además de los extractos crudos de *S. macrostema* y *E. carlinae*, sobre los hongos y oomicetos en estudio. Se pueden observar distintos grados de inhibición, lográndose valores altos de hasta el 100% por algunos compuestos. Todos los resultados fueron obtenidos en base a comparación con el tratamiento control, 50  $\mu$ L de etanol absoluto, que no inhibe el desarrollo del micelio de los hongos y oomicetos.

#### VII.4.1. Extractos crudos

La inhibición ejercida por los extractos crudos de *S. macrostema* y *E. carlinae* estuvo en el rango de 19.4 a 49.6% sobre el crecimiento micelial de los diferentes microorganismos. Los mejores porcentajes de inhibición en los bioensayos con los extractos crudos fueron observados sobre los hongos *C. lindemuthianum* y *B. cinerea*, mostrando 49.6 y 38.5% respectivamente para el caso del extracto de *S. macrostema* y 36.6 y 39.1% en el caso del extracto de *E. carlinae* (Cuadros 13 y 14). El microorganismo menos susceptible a la acción del extracto crudo de *S. macrostema* fue el oomiceto *P. capsici* con solo 25.5% de inhibición sobre su crecimiento (Figura 14); de igual forma se observó una leve acción antioomiceto sobre este microorganismo con el extracto crudo de *E. carlinae* ejerciendo este solo un 19.4% de inhibición (Figura 14).

#### VII.4.2. Terpenoides extraídos de *S. macrostema* (Benth) Briq.

Una vez realizados los bioensayos con los extractos crudos, se evaluó la actividad antifúngica y antioomiceto de los terpenoides purificados. Para el caso de los bioensayos con los terpenoides extraídos de *S. macrostema*, los mejores porcentajes de inhibición fueron observados sobre *C. lindemuthianum*, siendo el espatulenol y el óxido de piperitona, los metabolitos que lograron inhibir en un 100% el crecimiento micelial de este hongo, sin embargo también se observaron valores de inhibición superiores al 50% ejercidos por el mentol.

En cuanto a los resultados obtenidos con las diferentes dosis ensayadas se observa una tendencia en que a mayor concentración de los terpenoides, mayor es el porcentaje de inhibición, no obstante estas diferencias no son estadísticamente significativas. Como ya se mencionó, el espatulenol inhibió el crecimiento micelial de *C. lindemuthianum* en un 100%, esto en los bioensayos con todas las dosis ensayadas (50-500 mg/L), en cuanto al óxido de piperitona se observó que la dosis de 500 mg/L fue en la que se logró esta inhibición del 100%. En el caso del mentol los porcentajes de inhibición sobre *C. lindemuthianum* fueron de 52, 55.3, 56 y 58.5%, para las dosis de 50, 100, 250 y 500 mg/L respectivamente (Cuadro 13, Figuras 14 y 15).

PORCENTAJES DE INHIBICIÓN EJERCIDOS POR LOS TERPENOIDES DE <i>Satureja macrostema</i> (Benth) Briq. (NURITE) SOBRE HONGOS Y OOMICETOS FITOPATÓGENOS																				
COMUESTO	C+	ECTN	F1	L	2TN (Mentol)			5TN (Pulegona)			9TN (Es patulenol)			15TN (Oxido de piperitona)						
					50	100	250	500	50	100	250	500	50	100	250	500	50	100	250	500
DOSIS (mg/L)																				
Hongo/oomiceto	D	ND	ND	250	50	100	250	500	50	100	250	500	50	100	250	500	50	100	250	500
<i>F. oxysporum</i>	100	29.7 <sup>ns</sup>	9.8	27.5 <sup>ns</sup>	22.5	22.5	22.5	27.0 <sup>ns</sup>	21	23	23.4 <sup>ns</sup>	18	18.9	23.4	19.8	17.1	23.4 <sup>ns</sup>	28.8 <sup>ns</sup>	19.8	19.8
<i>B. cinerea</i>	100	38.5 <sup>ns</sup>	15	10.3	24.4	25.6	31.4 <sup>ns</sup>	37.8 <sup>ns</sup>	22	24	28.8	26.3	37.8 <sup>ns</sup>	23.1	26.9	30.8 <sup>ns</sup>	32.7 <sup>ns</sup>	37.8 <sup>ns</sup>	35.9 <sup>ns</sup>	35.9 <sup>ns</sup>
<i>C. lindemuthianum</i>	100	49.6 <sup>ns</sup>	20	23.9	52.0 <sup>ns</sup>	55.3 <sup>**</sup>	56.0 <sup>**</sup>	58.5 <sup>**</sup>	17	28	27.6	100 <sup>**</sup>	100 <sup>**</sup>	100 <sup>**</sup>	100 <sup>**</sup>	34.1	39.8	39.8	100 <sup>**</sup>	100 <sup>**</sup>
<i>P. capsici</i>	100	25.5 <sup>ns</sup>	6.1	15.8	5.6	11.8	20.1 <sup>ns</sup>	23.6 <sup>ns</sup>	13	17	18.8	9	11.1	11.8	18.1	8.3	17.4	7.6	10.4	10.4
<i>P. cinnamomi</i>	100	32.7 <sup>ns</sup>	9	9.6	16	16.7	16.7	25	18	24	32.1 <sup>ns</sup>	5.1	5.1	7.1	8.3	10.9	16	16.7	17.3	17.3

C+: Tecto 60, hongos (1 mg/L)

C+: Mefenoxam, oomicetos (100 mg/L)

Cuadro 13. Porcentajes de inhibición ejercidos por los terpenoides extraídos de *S. macrostema* (Benth) Briq. (Nurite) sobre hongos y oomicetos fitopatógenos. L= Limoneno (250 mg/L), F1= Fracción 1, ND= No determinada. <sup>ns</sup>Diferencia significativa, <sup>\*\*</sup>Diferencia no significativa respecto a ECTN (Extractos crudo de TN: nurite), de acuerdo a un análisis de varianza y a una prueba de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ) por medio del programa Statistica 7.0.

PORCENTAJES DE INHIBICIÓN EJERCIDOS POR LOS TERPENOIDES DE <i>Eryngium carlinae</i> Delar F. (HIERBA DEL SAPO) SOBRE HONGOS Y OOMICETOS FITOPATÓGENOS									
COMPUESTO	C+	ECHS	10HS (Mirceño)			17HS (Borneol)			
			50	100	250	50	100	250	500
Hongo/oomiceto	D	ND	DOSIS (mg/L)						
<i>F. oxysporum</i>	100	29.7 <sup>ns</sup>	24.3 <sup>ns</sup>	25.2 <sup>ns</sup>	26.1 <sup>ns</sup>	11.7	19.8	22.5	27.0 <sup>ns</sup>
<i>B. cinerea</i>	100	39.1 <sup>ns</sup>	18.6	21.2	23.7	28.8	29.5	30.8 <sup>ns</sup>	37.2 <sup>ns</sup>
<i>C. lindemuthianum</i>	100	36.6 <sup>ns</sup>	24.4	26.0 <sup>ns</sup>	27.6 <sup>ns</sup>	17.9	22	26	34.1 <sup>ns</sup>
<i>P. capsici</i>	100	19.4 <sup>ns</sup>	12.5	14.6 <sup>ns</sup>	15.3 <sup>ns</sup>	9.7	9	11.8	16.0 <sup>ns</sup>
<i>P. cinnamomi</i>	100	34 <sup>ns</sup>	4.5	5.8	6.4	21.2	21.8	25.0 <sup>ns</sup>	30.8 <sup>ns</sup>

C+:Tecto 60, hongos (1 mg/L)

C+:Mefenoxam, oomicetos (100 mg/L)

Cuadro 14. Porcentajes de inhibición ejercidos por los terpenoides extraídos de *E. carlinae* Delar F. (Hierba del sape) sobre hongos y oomicetos fitopatogénos. ND= No determinada. \*\*Diferencia significativa, <sup>ns</sup>Diferencia no significativa respecto a ECHS (Extractos crudo de HS: hierba del sape), de acuerdo a un análisis de varianza y a una prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) por medio del programa Statistica 7.0.

Los porcentajes de inhibición obtenidos con el limoneno en una dosis de 250 mg/L (L) y con la fracción 1 (F1) (la cual contiene  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\rho$ -pineno, limoneno y mentol) siendo el limoneno en dicha fracción el terpenoide que se encuentra en mayor concentración, fueron porcentajes de inhibición bajos que van del 9.6 al 27.5% para el caso del limoneno y 6.1 a 19.7% para en el caso de la fracción F1, esto en los diferentes microorganismos ensayados. Sobre *C. lindemuthianum*, hongo más susceptible a la acción antifúngica de los terpenoides ensayados, los porcentajes de inhibición ejercidos por el limoneno (L) y la fracción uno (F1), fueron de 23.9 y 19.7% respectivamente (Cuadro 13).

Para *F. oxysporum*, el mejor porcentaje de inhibición sobre el crecimiento, en los bioensayos con los terpenoides purificados de *S. macrostema*, fue logrado por el óxido de piperitona dentro de la dosis intermedia de 250 mg/L, obteniéndose una inhibición de 28.8%, valor cercano al porcentaje de inhibición obtenido por el extracto crudo de nurite de donde se extrajo (29.7%). Además el mentol en una dosis de 500 mg/L mostró una actividad antimicrobiana de 27% de igual forma valor semejante al 29.7% del extracto crudo. Los demás terpenoides ensayados mostraron resultados similares en su acción antimicrobiana, resultando en un 23.4% de inhibición tanto para la pulegona y el espatulenol, en las dosis de 250 mg/L. Para el caso del limoneno en la dosis ensayada de 250 mg/L se obtuvo una inhibición muy semejante a la lograda por el óxido de piperitona y el mentol, siendo este valor de 27.5%, valor de igual manera semejante al del extracto crudo. El valor más bajo en la inhibición ejercida por estos terpenoides purificados sobre este microorganismo fue el de la fracción F1 con 9.8% de inhibición. Se observan dos tendencias en los valores de los porcentajes de inhibición respecto a las diferentes dosis ensayadas, para el caso específico de este microorganismo; la primera es semejante a la observada para *C. lindemuthianum*, es decir son valores que obedecen a la concentración del metabolito, a mayor concentración, mayor porcentaje de inhibición sobre el crecimiento, esta tendencia es observada con mentol y la pulegona; la segunda tendencia que se observa es para el espatulenol y el óxido de piperitona, en esta, las dosis intermedias son en las que se observan los mejores porcentajes de inhibición. Cabe mencionar que los resultados obtenidos en los porcentajes de inhibición del crecimiento sobre este microorganismo, son valores bajos, y en la mayoría de los casos las diferencias en los resultados con las diferentes dosis, no son estadísticamente significativas (Cuadro 13, Figuras 14 y 15).

En el caso de *B. cinerea*, los resultados obtenidos, de igual forma con los terpenoides purificados de *S. macrostema*, muestran las dos tendencias anteriormente observadas para *F. oxysporum*. La primera tendencia se observa con el mentol, en el que con las dosis de 50, 100, 250 y 500 mg/L se observan los porcentajes de inhibición de 24.4%, 25.6%, 31.4% y 37.8% respectivamente. Por otro lado esta primera tendencia también fue observada con la pulegona, mostrando porcentajes de inhibición de 21.8%, 24.4% y 28.8% para las dosis de 50, 100 y 250 mg/L. La segunda tendencia en la que los valores más altos en los porcentajes de inhibición se encuentran dentro de las dosis intermedias, fue observada con el espatulenol y el óxido de piperitona; el primero con valores de 26.3, 37.8, 23.1 y 26.9% para las dosis de 50, 100, 250 y 500 mg/L; y para el óxido de piperitona con estas mismas cuatro dosis se obtuvieron porcentajes de inhibición de 30.8, 32.7, 37.8 y 35.9% respectivamente. Como se puede observar el valor más alto de 37.8% en la inhibición fue obtenido tanto por el mentol, espatulenol y el óxido de piperitona. Los resultados con el limoneno y la fracción F1 fueron los más bajos siendo estos de 10.3 y 14.7% respectivamente (Cuadro 13, Figuras 14 y 15).

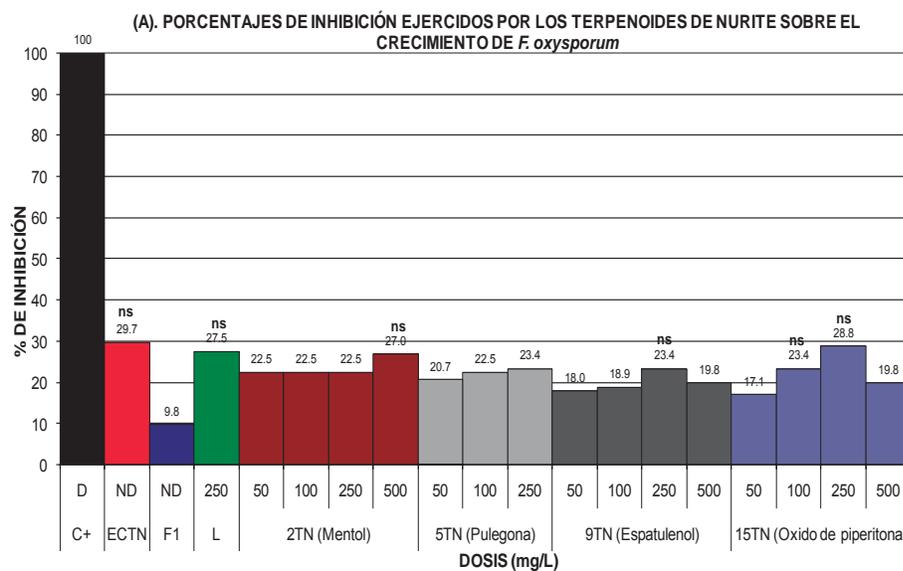
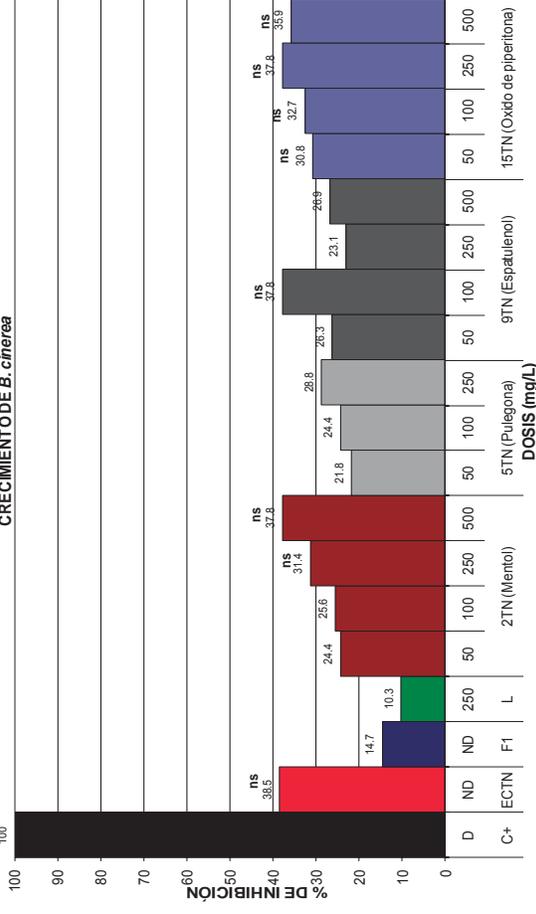
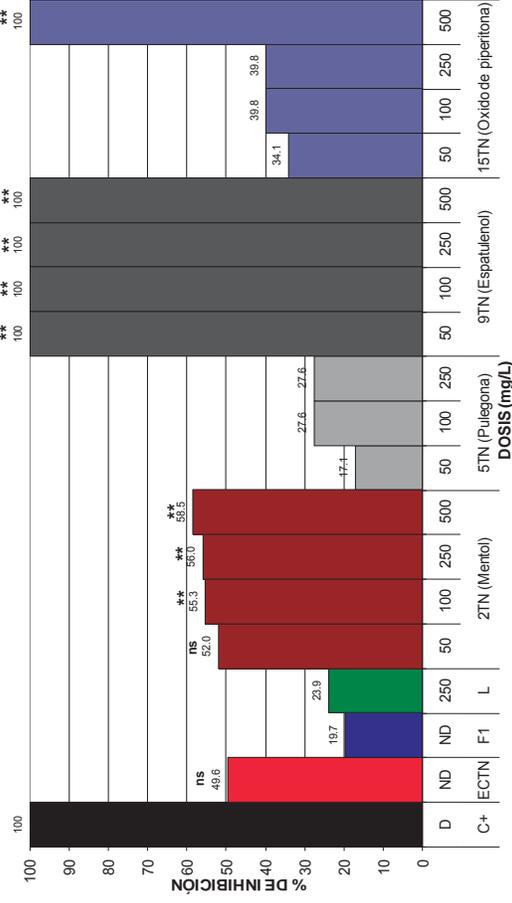


Figura 14. Porcentajes de inhibición ejercidos por los terpenoides extraídos de *S. macrostema* (Benth) Briq. (Nurite) sobre: **A.-** *F. oxysporum* (4 días); **B.-** *B. cinerea* (4 días); **C.-** *C. lindemuthianum* (10 días); **D.-** *P. capsici* (6 días); **E.-** *P. cinamoni* (8 días). \*\*Diferencia significativa; <sup>ns</sup>Diferencia no significativa respecto a ECTN, de acuerdo a un análisis de varianza y a una prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) por medio del programa Statistica 7.0

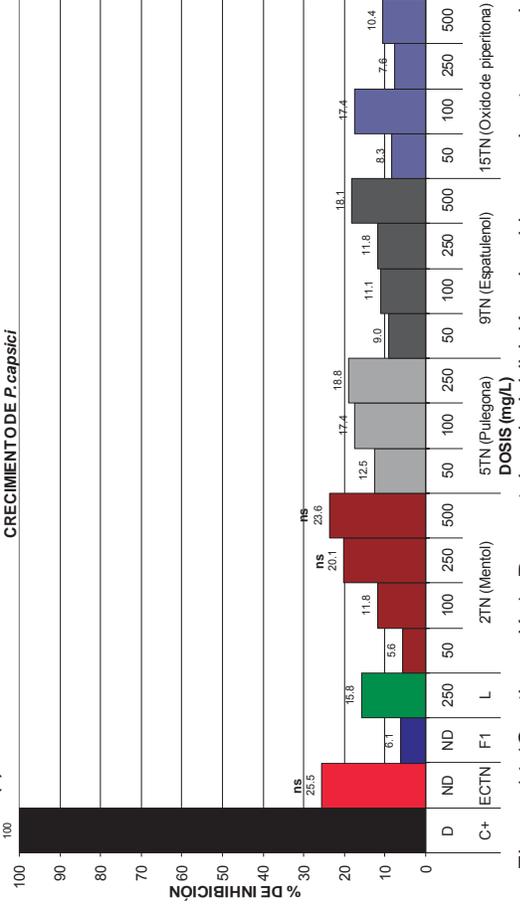
(B). PORCENTAJES DE INHIBICIÓN EJERCIDOS POR LOS TERPENOIDES DE NURITE SOBRE EL CRECIMIENTO DE *B. cinerea*



(C). PORCENTAJES DE INHIBICIÓN EJERCIDOS POR LOS TERPENOIDES DE NURITE SOBRE EL CRECIMIENTO DE *C. indomethianum*



(D). PORCENTAJES DE INHIBICIÓN EJERCIDOS POR LOS TERPENOIDES DE NURITE SOBRE EL CRECIMIENTO DE *P. capsici*



(E). PORCENTAJES DE INHIBICIÓN EJERCIDOS POR LOS TERPENOIDES DE NURITE SOBRE EL CRECIMIENTO DE *P. cinamomi*

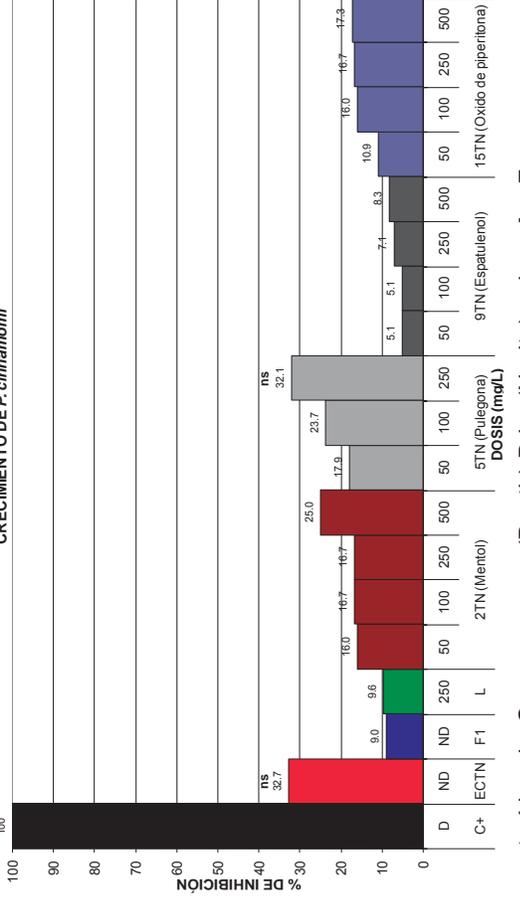


Figura 14 (Continuación). Porcentajes de inhibición ejercidos por los terpenoides extraídos de *S. macrostema* (Bentn) Briq. (Nurite) sobre: **A.- *F. oxysporum*** (4 días); **B.- *B. cinerea*** (4 días); **C.- *C. indomethianum*** (10 días); **D.- *P. capsici*** (10 días); **E.- *P. cinamomi*** (8 días). \*\*Diferencia significativa; ns Diferencia no significativa respecto a ECTN, de acuerdo a un análisis de varianza y a una prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) por medio del programa Statistica 7.0.

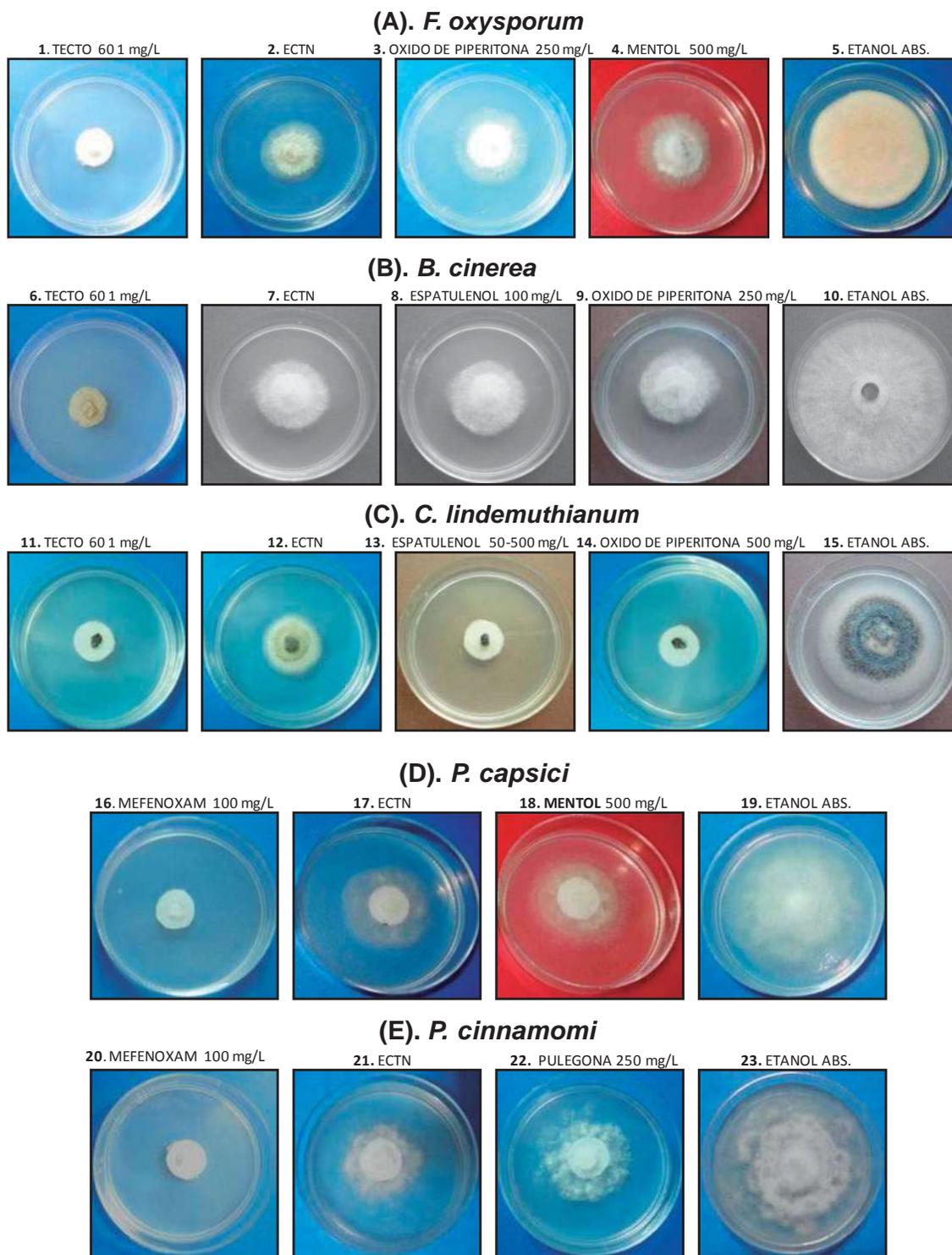


Figura 15. Inhibición del crecimiento del micelio en hongos y oomicetos fitopatógenos (método de discos impregnados) por terpenoides de *S. macrostema* (Benth) Briq. (Nurite) en **(A)**. *F. oxysporum* a los 4 días del cultivo: **1**. Tecto 60 mg/L; **2**. Extracto crudo de nurite; **3**. Óxido de piperitona 250 mg/L; **4**. Mentol 500 mg/L; **5**. Etanol absoluto; **(B)**. *B. cinerea* a los 4 días del cultivo: **6**. Tecto 60 mg/L; **7**. Extracto crudo de nurite; **8**. Epatulenol 100 mg/L; **9**. Óxido de piperitona 250 mg/L; **10**. Etanol absoluto; **(C)**. *C. lindemuthianum* a los 10 días del cultivo: **11**. Tecto 60 mg/L; **12**. Extracto crudo de nurite; **13**. Epatulenol 50-500 mg/L; **14**. Óxido de piperitona 500 mg/L; **15**. Etanol absoluto; **(D)**. *P. capsici* a los 6 días del cultivo: **16**. Mefenoxam 100 mg/L; **17**. Extracto crudo de nurite; **18**. Mentol 500 mg/L; **19**. Etanol absoluto; **(E)**. *P. cinnamomi* a los 8 días del cultivo: **20**. Mefenoxam 100 mg/L; **21**. Extracto crudo de nurite; **22**. Pulegona 250 mg/L; **23**. Etanol absoluto

Finalmente los resultados que se obtuvieron con los terpenoides extraídos de *S. macrostema* para los dos oomicetos *P. capsici* y *P. cinnamomi* fueron los que mostraron porcentajes de inhibición más bajos. Se observan las dos tendencias mencionadas anteriormente en cuanto al nivel de inhibición de acuerdo a la dosis, de esta manera, para *P. capsici* se observó que el mentol, la pulegona y el espatulenol ejercieron un leve incremento en la inhibición del microorganismo al aumentar la dosis; no obstante para el óxido de piperitona, la dosis intermedia de 100 mg/L fue la que mostró la mejor actividad antimicrobiana. Para *P. cinnamomi* se observó que existe mayor susceptibilidad a la acción antimicrobiana de los terpenoides siguiendo una sola tendencia en los porcentajes de inhibición, así los mejores resultados fueron ejercidos por la pulegona (32.1% en la dosis de 500 mg/L) y el mentol (25% en la dosis de 500 mg/L), estos resultados son muy semejantes a los ejercidos por el extracto crudo. De igual manera el limoneno y la fracción F1 ejercieron un porcentaje de inhibición muy bajo sobre estos oomicetos (Cuadro 13, Figuras 14 y 15).

#### **VII.4.3. Terpenoides extraídos de *E. carlinae* Delar F.**

La actividad antifúngica y antioomiceto ejercida por los dos terpenoides mayoritarios extraídos de *E. carlinae* mostró solo la tendencia de inhibición del crecimiento micelial, en la que a mayor concentración de los terpenoides, hubo mayor porcentaje de inhibición, para todos los microorganismos ensayados. El microorganismo más susceptible a la acción de estos terpenoides fue *B. cinerea*. El borneol en una dosis de 500 mg/L ejerció una inhibición en el crecimiento de 37.2%, valor muy cercano al ejercido por el extracto crudo de hierba del sapo (39.1%), por otro lado el mirceno solo ejerció una inhibición del 23.7% sobre el crecimiento de este microorganismo (Cuadro 14, Figuras 16 y 17).

El segundo microorganismo más susceptible fue *C. lindemuthianum*, el cual fue inhibido en su crecimiento en 34.1% y 27.6% bajo la acción del borneol y el mirceno respectivamente, ambos en dosis de 500 mg/L; valores igualmente cercanos al obtenido por el extracto crudo de hierba del sapo (36.6%) del que se extrajeron (Cuadro 14, Figuras 16 y 17).

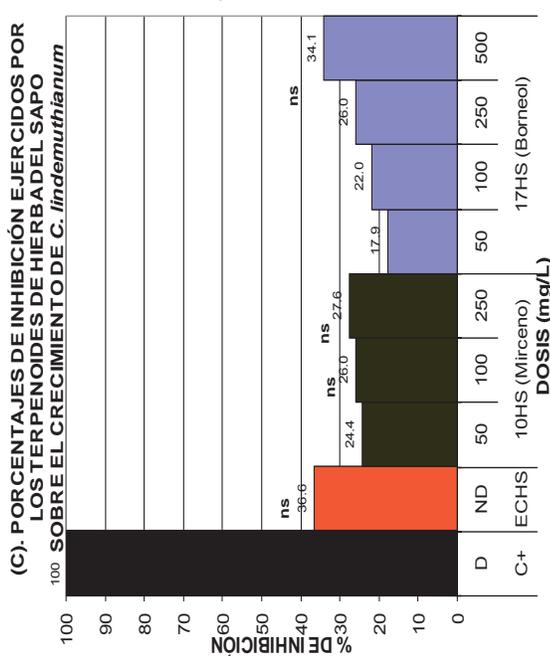
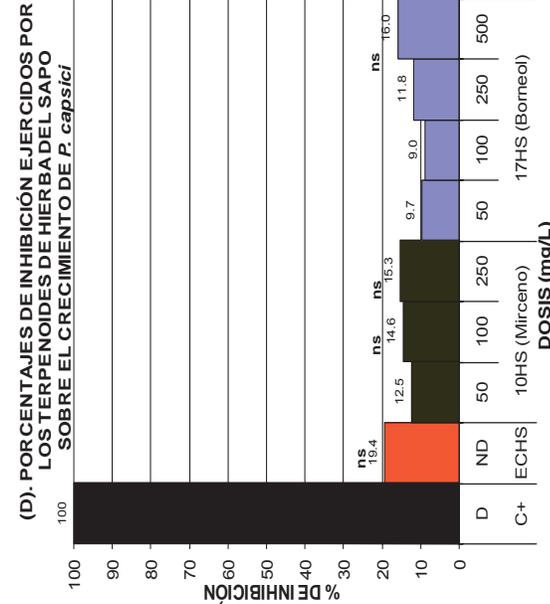
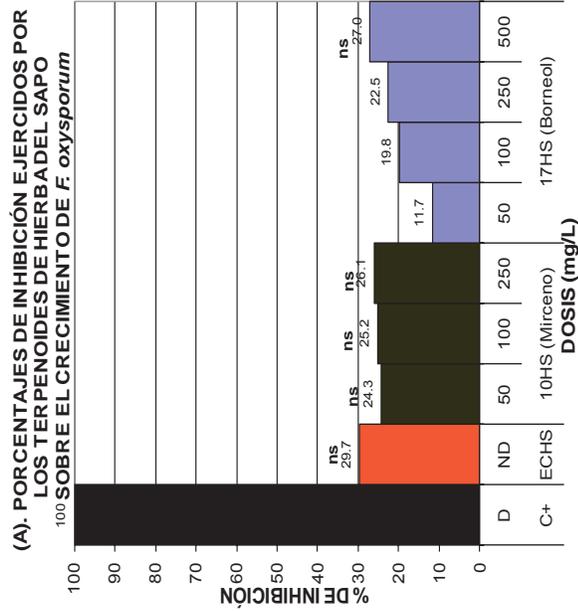
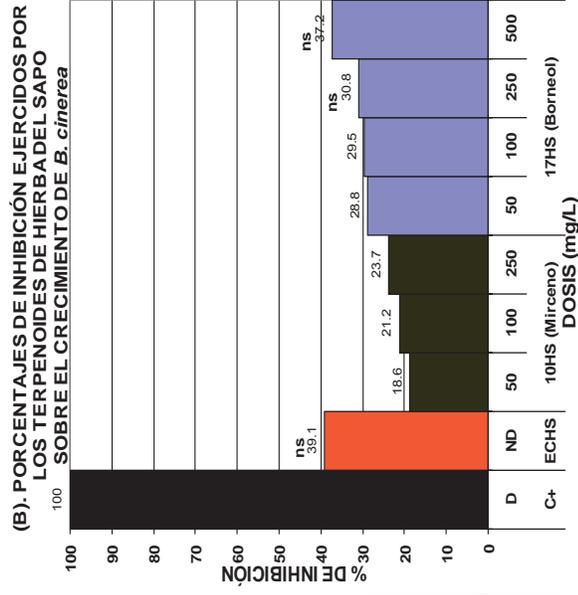


Figura 16. Porcentajes de inhibición ejercidos por los terpenoides extraídos de *E. carlinae* Delar F. (Hierba del saapo) sobre: **A.-** *F. oxysporum* (4 días); **B.-** *B. cinerea* (4 días); **C.-** *C. lindemuthianum* (10 días); **D.-** *P. capsici* (6 días); **E.-** *P. cinamomi* (8 días). \*\*Diferencia significativa; <sup>ns</sup>Diferencia no significativa respecto a ECHS, de acuerdo a un análisis de varianza y a una prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) por medio del programa Statistica 7.0.

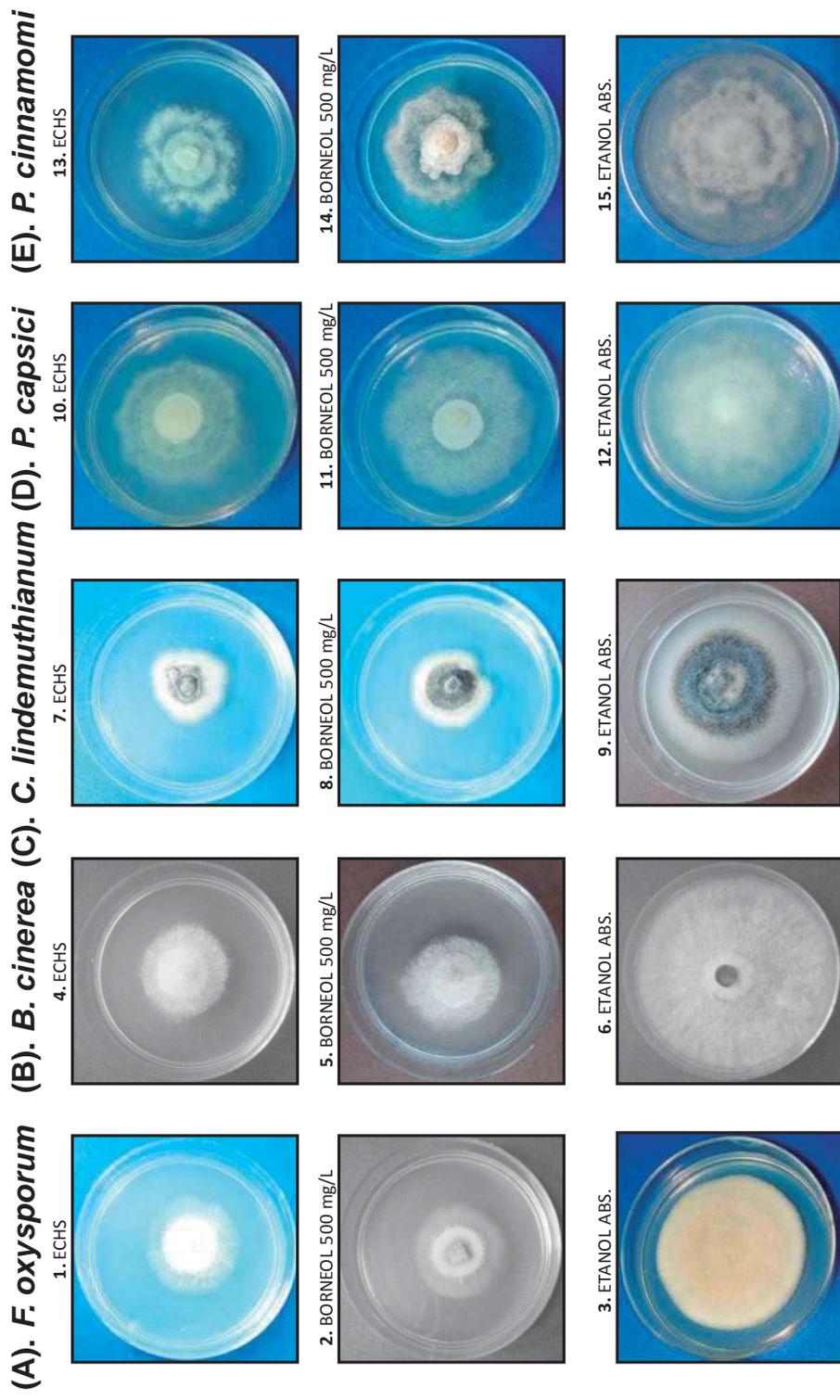


Figura 17. Inhibición del crecimiento del micelio en hongos y oomicetos fitopatógenos (método de discos impregnados) por terpenoides de de *E. carlinae* Delar F. (Hierba del sapo) en (A). *F. oxysporum* a los 4 días del cultivo: **1.** Extracto crudo de hierba del sapo; **2.** Borneol 500 mg/L; **3.** Etanol absoluto; (B). *B. cinerea* a los 4 días del cultivo: **4.** Extracto crudo de hierba del sapo; **5.** Borneol 500 mg/L; **6.** Etanol absoluto; (C). *C. lindemuthianum* a los 10 días de cultivo: **7.** Extracto crudo de hierba del sapo; **8.** Borneol 500 mg/L; **9.** Etanol absoluto; (D). *P. capsici* a los 6 días del cultivo: **10.** Extracto crudo de hierba del sapo; **11.** Borneol 500 mg/L; **12.** Etanol absoluto; (E). *P. cinnamomi* a los 8 días del cultivo: **13.** Extracto crudo de hierba del sapo; **14.** Borneol 500 mg/L; **15.** Etanol absoluto.

La susceptibilidad ejercida por el mirceno y el borneol sobre *F. oxysporum* estuvo dentro del rango de 11.7 a 27% de inhibición, de esta manera, el borneol ejerció inhibiciones de 11.7, 19.8, 22.5 y 27% en dosis de 50, 100, 250 y 500 mg/L respectivamente. Para el mirceno en las dosis de 50, 100 y 250 mg/L, los resultados fueron de 24.3, 25.2 y 26.1% de inhibición respectivamente (Cuadro 14, Figuras 16 y 17).

Finalmente para los oomicetos *P. capsici* y *P. cinnamomi*, los porcentajes de inhibición ejercidos por los terpenoides extraídos de *E. carlinae*, fueron porcentajes bajos. Para *P. capsici*, los resultados fueron de 12.5, 14.6 y 15.3% de inhibición ejercidos por el mirceno en dosis de 50, 100 y 250 mg/L; en el caso del borneol en dosis de 50, 100, 250 y 500 mg/L, los porcentajes de inhibición fueron de 9.7, 9, 11.8 y 16%; sin embargo todos estos resultados concuerdan con el bajo porcentaje de inhibición ejercido por el extracto crudo de hierba del sapo (19.4%) sobre este microorganismo. Tal como ocurrió con la inhibición ejercida con los terpenoides extraídos de *S. macrostema*, *P. cinnamomi* mostró mayor grado de susceptibilidad que *P. capsici*, logrando el borneol inhibir hasta en un 30.8% en una dosis de 500 mg/L, las dosis de 50, 100 y 250 mg/L ejercieron porcentajes de inhibición de 21.2, 21.8 y 25%. En el caso de del mirceno los porcentajes de inhibición ejercidos sobre este microorganismo fueron los más bajos en comparación con los porcentajes ejercidos por todos los terpenoides sobre todos los microorganismos, siendo estos de 4.5, 5.8 y 6.4% en dosis de 50, 100 y 250 mg/L (Cuadro 14, Figuras 16 y 17).

#### **VII.5. Composición química de los extractos crudos de plantas en distintos estados de desarrollo**

Los resultados se muestran en los Cuadros 15 y 16, así como en los cromatogramas reportados en los Anexos XI.4 y XI.5. Para el caso de *S. macrostema* se muestrearon plantas de 15, 30, 45 y 90 días de edad; para el caso de hierba del sapo plantas antes, durante y después de la floración así como plantas en fructificación. Como se puede ver en las Cuadros 15 y 16, la variación de compuestos es afectada en gran medida por el estado vegetativo en el que se encuentre la planta. En general, los terpenoides del

grupo de los monoterpenos y sesquiterpenos fueron el grupo dominante en los aceites esenciales de ambas plantas.

#### **VII.5.1. *S. macrostema* (Benth) Briq.**

El Cuadro 15 muestra los compuestos que fueron identificados a partir de los extractos etanólicos de plantas de nurite en distintos estados de desarrollo. Se identificaron terpenos volátiles como el grupo dominante de compuestos en el aceite esencial, se puede ver que a medida que la planta va aumentando su desarrollo, la expresión de compuestos también va aumentando.

Se puede observar en el extracto de plantas de 15 días de edad que el compuesto dominante es la pulegona (95.85%), encontrándose también en mucho menor cantidad el  $\beta$ -elemenono (4.15%) (Cuadro 15-A). El extracto de plantas a los 30 días de edad no presenta gran diferencia respecto al primero, aquí solo se ve disminuida la concentración de la pulegona hasta 77.09% y aparecen el isopreno y la isopiperitona en porcentajes de 14.57 y 8.84% respectivamente (Cuadro 15-B). En general se puede observar esta tendencia de descenso en la concentración del metabolito principal (pulegona) de los extractos crudos de esta planta hasta el extracto de 45 días en el que la pulegona se encontró en un porcentaje de 60.30% junto con la verbenona en 39.70% (Cuadro 15-C).

Finalmente la composición del extracto etanólico de plantas adultas (90 días) (Cuadro 15-D), expresa la mayor diversidad de compuestos terpenicos, encontrando entre los mayoritarios al limoneno (35.44%), óxido de piperitona (25.71%), piperitona (10.10%), otros compuestos importantes son el menteno (4.43%), el espatulenol (3,51%) la pulegona (2.59%), este último metabolito muestra la mayor disminución en la concentración respecto a las plantas más jóvenes.

Cuadro 15. Compuestos (CG/EM) que constituyen los extractos crudos de hojas y tallos de *S. macrostema* (Benth) Briq. (Nurite en distintas etapas de desarrollo).

COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	CONTENIDO EN EL ACEITE (%)
<b>A. <i>S. macrostema</i> (Benth) Briq. (15 días)</b>		
Pulegona	10.47	95.85
β-elemenono	12.47	4.15
<b>B. <i>S. macrostema</i> (Benth) Briq. (30 días)</b>		
Pulegona	10.49	77.09
Isopreno	11.49	14.57
Isopiperitona	12.49	8.34
<b>C. <i>S. macrostema</i> (Benth) Briq. (45 días)</b>		
Pulegona	10.52	60.30
Verbenona	12.49	39.70
<b>D. <i>S. macrostema</i> (Benth) Briq. (90 días)</b>		
Mentol	0.46	7.27
Óxido de etileno	1.07	1.64
Menteno	1.23	4.43
Limoneno	1.44	35.54
Terpineol	3.00	1.91
Pulegona	7.11	2.59
Citronelol	9.59	1.91
Espatuleno	12.08	3.51
Dodecanal	14.86	5.38
Óxido de piperitona	20.23	25.71
Piperitona	21.95	10.10

#### VII.5.2. *E. carlinae* Delar F.

Para los extractos etanólicos de plantas de *E. carlinae* obtenidos en diferentes estados de desarrollo se pudo ver un comportamiento semejante al observado en *S. macrostema*, el compuesto mayormente expresado en los estadios jóvenes en plantas antes de la floración fue el germacreno D (99%), tal y como se ve en la Cuadro 16-A. En las plantas durante la floración se pudo ver una gran diversificación de compuestos, la mayoría de tipo monoterpeno y sesquiterpeno, entre los compuestos mayoritarios identificados en esta etapa de desarrollo se encuentran el L-α-pineno (20.90%), L-α-farneseno (15.78%), patchoulano (11.45%) entre otros (Cuadro 16-B).

Cuadro 16. Compuestos (CG/EM) que constituyen los extractos crudos de hojas y tallos de *E. carlinae* Delar F. (Hierba del sapo) en distintas etapas de desarrollo.

COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	CONTENIDO EN EL ACEITE (%)
<b>A. <i>E. carlinae</i> Delar F. (Plantas antes de la floración)</b>		
Germacreno D	12.22	99
<b>B. <i>E. carlinae</i> Delar F. (Plantas durante la floración)</b>		
1R- $\alpha$ -Pinoeno	7.03	7.54
L- $\alpha$ -Pinoeno	7.69	21.90
$\beta$ -Mirceno	7.92	0.85
1S- $\alpha$ -Pinoeno	8.74	1.57
$\alpha$ -Farneseno	12.09	4.07
L- $\alpha$ -farneseno	12.20	15.78
Zingibereno	12.33	7.04
$\beta$ -Sesquifelandreno	12.42	3.23
$\alpha$ -Terpineol	12.62	2.42
Cis-piperileno	14.13	8.97
Patchoulano	14.20	11.45
$\epsilon$ -Ciclogeranioleno	14.31	1.18
Cis-3-nonen-1-ol	14.73	1.82
<b>C. <i>E. carlinae</i> Delar F. (Plantas después de la floración)</b>		
1R- $\alpha$ -Pinoeno	7.03	6.06
L- $\alpha$ -Pinoeno	7.70	13.84
$\beta$ -Mirceno	7.92	0.64
$\beta$ -Bergamoteno	11.80	4.76
4-Metil-1,4-heptadieno	11.94	2.00
Cis-ocimeno	12.03	1.76
$\alpha$ -Bisabolol	12.09	2.89
Isoledeno	12.20	21.81
Bergamoteno	12.34	5.09
$\beta$ -Sesquifelandreno	12.43	2.65
Peruviol	12.62	7.15
Cis,cis-2,4-hexadieno	13.42	6.98
Cis-piperileno	14.13	7.87
Patchoulano	14.20	9.31
1,10-decanodiol	14.73	3.02
Acido docosanoico, etil ester	16.84	1.66
<b>D. <i>E. carlinae</i> Delar F. (Plantas en fructificación)</b>		
p-Pinoeno	1.04	13.47
$\alpha$ -Pinoeno	1.53	4.24
$\alpha$ - $\gamma$ -Terpineno	1.68	1.52
Cis-ocimeno	1.95	1.76
Mirceno	13.48	3.00
Cariofileno	23.30	2.73
Borneol	24.19	6.58
Sabineno	27.34	6.69

Los compuestos identificados en los extractos de plantas después de la floración no variaron mucho respecto a los identificados en plantas antes de la floración, se puede observar prácticamente el mismo patrón, solo que si hay diferencia en las concentraciones de estos, los compuestos mayoritarios son el isodeleno (21.81%), el L- $\alpha$ -pineno (13.84%), el patchoulano (9.31%) entre otros (Cuadro 16-C). Además de esto se pueden ver otros compuestos que no se identificaron en el extracto de plantas antes de la floración.

Finalmente en la Cuadro 16-D se puede ver los compuestos principales identificados en plantas en fructificación. Se observa como compuesto mayoritario el  $p$ -Pineno (13.47%), el sabineno (6.69%) y el borneol (6.58%).

## VIII. DISCUSIÓN

### VIII.1. Clasificación molecular de las plantas en estudio mediante nrADN-ITSs

Con relación a la región de los ITSs, ésta ha sido considerada como una fuente muy útil de caracteres para estudios filogenéticos en angiospermas (Baldwin *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que mediante la amplificación de los espaciadores transcritos internos (ITSs) del ADN ribosomal nuclear (nrADN), se puede clasificar molecularmente muchas especies de plantas de una manera rápida y eficiente.

Aunque la amplificación de ADN genómico por PCR es usada habitualmente en muchos laboratorios, los resultados de amplificación del ADN extraído con el buffer CTAB en nuestro estudio no dio la amplificación sino hasta después de varios intentos en donde se estandarizaron tanto el protocolo de extracción del ADN, realizando una precipitación con isopropanol, así como las condiciones de amplificación del coctel, esto debido a que las especies en estudio son ricas en aceites esenciales y contienen gran cantidad de compuestos fenólicos.

Al ser los ITSs una región variable y estar flanqueando la subunidad conservada 5.8S la alineación de las secuencias es facilitada (Walsh, 2000). El hecho de que se presenten cientos de copias por célula de los nrADN, facilita su amplificación con los iniciadores específicos, por esta razón la amplificación de la región ITS1-5.8s-ITS2 por medio de los iniciadores específicos ITS1 e ITS4 se llevó a cabo sin dificultad, una vez encontradas las condiciones adecuadas para la reacción en cadena de la polimerasa.

Para el caso específico de los ITSs, la información obtenida necesita ser convertida a datos cualitativos (Avice, 1994). Los ITSs se analizan por medio de métodos de distancia, parsimonia o máxima similitud con los que se obtiene una filogenia (Swofford, 1996). La presentación gráfica de las relaciones genéticas entre organismos se representa en un sistema de reconstrucción tipo árbol (dendrograma), el cual se construye por medio de un método de agrupamiento. Las presentaciones gráficas

consisten de nodos (unidades taxonómicas) y ramas (rutas conectando a los nodos) (Avise, 1994).

El análisis de secuencias de ADN basada en la amplificación por PCR y la secuenciación de marcadores moleculares específicos se ha hecho un técnica molecular frecuente y ampliamente aceptada ya que permite la aproximación en la reconstrucción de la filogenia y la taxonomía de plantas. En contraste con los animales, donde los principales marcadores moleculares utilizados para estudios filogenéticos son una corta secuencia de ADN mitocondrial en los genes de la citocromo c oxidasa 1 (CO1) (Hebert *et al.*, 2003), las secuencias de ADN mitocondrial de plantas rara vez han sido utilizadas como fuente de marcadores filogenéticos, debido a que se presume una tasa lenta de sustituciones nucleotídicas. Bakker *et al.* (2000) confirmaron que las plantas contienen secuencias mitocondriales con niveles adecuados de variación para su taxonomía discriminando a nivel de especie, sin embargo, los espaciadores internos transcritos (ITSs) de la región nuclear cistronica ribosomal (18S-5.8S-26S) siguen siendo la región más comúnmente secuenciada para la investigación en sistemática molecular de plantas.

En los resultados de este trabajo, al alinear las secuencias obtenidas con secuencias de especies relacionadas ya reportadas en la base de datos GenBank y construir los dendrogramas respectivos tanto con el algoritmo de la máxima parsimonia, utilizando el programa MegAlign de DNASTAR 7.2; como con el algoritmo del método de agrupación UPGMA, mediante el programa CLC Free Workbench 4.6.2; nos permitieron ubicar taxonómicamente las especies en estudio. Con relación a la variabilidad genética de los géneros *Satureja* e *Eryngium* se puede observar que el mayor porcentaje identidad es entre las plantas más estrechamente relacionadas. De acuerdo a Appels *et al.* (1992), las sustituciones, deleciones e inversiones nucleotídicas de la región ITS1-5.8S-ITS2 reflejan consistentemente la sistemática en Angiospermas. El autor menciona que los valores de divergencia genética superiores a 1% indican la presencia de especies diferentes

Los valores de divergencia y porcentaje de identidad con los que se pudo ubicar taxonómicamente a los especímenes estudiados fueron de 0 y 100% para *S.*

*macrostema*. Como se puede ver, según lo publicado por Appels *et al.* (1992); para *S. macrostema*, la divergencia de 0 obtenida respecto a el otro espécimen reportado *S. macrostema* var. *leavigata* permite concluir que se trata de la misma especie logrando de esta manera la clasificación a nivel de género y especie. Las secuencias de especímenes relacionados utilizadas para robustecer el análisis y permitir la certificación taxonómica que siguieron en cercanía mostraron valores de divergencia y porcentajes de identidad de 2.7 y 97.3% hasta los valores más lejanos obtenidos de 30 y 75.1% valores para las especies *S. macrostema* var. *macrostema* y *S. hortensis* respectivamente.

En el caso de *E. carlinae* Delar F., los valores de divergencia y porcentaje de identidad fueron de 1.6 y 98.4%, la divergencia de 1.6 obtenida respecto a *E. campestre*, de acuerdo al mismo autor (Appels *et al.*, 1992), estos datos permitieron ubicar taxonómicamente a esta especie a nivel de género. Esta divergencia ubicaría a esta especie como taxa cercana a *E. campestre* pero con suficiente disimilaridad para considerarla especie diferente, no obstante la identificación realizada fenotípicamente mediante taxonomía tradicional permite ubicarla a nivel de género y especie como *E. carlinae* Delar F. Las secuencias de las especies relacionadas a *E. carlinae* Delar F. mostraron valores de divergencia y porcentajes de identidad que fueron de 2.6 y 97.4% y los más lejanos fueron de 23.2 y 80.1% para *E. billardieri* y *S. rubriflora* respectivamente.

La construcción de los dendrogramas respectivos por medio de los dos algoritmos y los dos diferentes programas de cómputo permitió validar el análisis al obtener las diferentes agrupaciones que permitieron la visualización de acuerdo a la cercanía en sus genotipos. Igualmente los grupos externos usados como control permitieron la visualización de los clades de una manera muy clara.

Finalmente, las pruebas estadísticas para obtener índices de confianza, permitieron concluir con las clasificaciones taxonómicas de ambos especímenes. Para ello se construyeron los dendrogramas utilizando el índice “bootstrap”, método de remuestreo con reemplazamiento por medio de los cuales se realizan replicas y se determinan los porcentajes de veces que se repitió un nodo (Felsenstein, 1985). Los valores en los

índices “bootstrap” de 100% para los nodos en los que se agruparon las especies en cuestión nos permitieron afinar nuestros resultados, ya que según lo reportado valores superiores a 95% son altamente confiables (Felsenstein, 1985).

Para *S. macrostema* (Benth) Briq., la secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 no fue reportada al banco de datos GenBank, debido a que ya existían en la base de datos las secuencias idénticas para los ITS1 y ITS2 (AY094152 y AY094153); sin embargo, la secuencia de la región ITS (ITS1-5.8S-ITS2) del nrADN de *E. carlinae* Delar F. si fue reportada al banco de datos del GenBank (EU089972) (Ver Anexo XI.3).

## **VIII.2. Composición química, variación en su composición en distintos estados de desarrollo y actividad antimicrobiana de los extractos crudos de las plantas en estudio**

### **VIII.2.1. *S. macrostema* (Benth) Briq.**

El género *Satureja* presenta gran variabilidad en la concentración y composición de sus aceites esenciales no solo debido a la existencia de diferentes especies y subespecies, sino también a numerosos parámetros, principalmente el ambiente y las condiciones climáticas. Se ha reportado en diversas especies del género *Satureja* que la composición química de sus aceites esenciales, puede variar en gran proporción, sin embargo existen metabolitos constitutivos, por ejemplo para los aceites esenciales de plantas de *S. montana* de Croacia, Bosnia y Herzegovina, se han encontrado concentraciones de carvacrol siempre superiores al 84.19%, estos resultados indican la presencia de un metabolito secundario mayoritario (kuštrak *et al.* 1996; Gülluce *et al.* 2003; Skočibušić y Bezić, 2003).

El género *Satureja* comprende alrededor de 200 especies, de los cuales solo algunas han estado involucradas en algún estudio científico. Con referencia a estudios anteriores el carvacrol y el timol en particular se consideran los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de muchas especies del género *Satureja* originarias de Croacia (Miloš *et al.* 2001; Skočibušić y Bezić, 2004; Bezić *et al.*, 2005). Sin embargo la especie *S. macrostema* (Benth) Briq. de este estudio difiere en su composición en gran medida encontrándose como metabolitos principales al limoneno y

al óxido de piperitona y encontrándose ausentes los metabolitos mencionados anteriormente, como ya se sugirió existen diferentes parámetros para que se de esta diferencia.

Cazin y *et al.* (1985) reportaron grandes variaciones en la concentración relativa de los principales compuestos del aceite esencial de *S. montana*, entre los compuestos reportados como constituyentes están carvacrol (5–69%), linalool (1–62%),  $\alpha$ -terpineno (1–31%) y *p*-cimeno (3–27%). De igual manera se ha reportado como principales compuestos del aceite esencial de *S. hortensis* al timol (29%), carvacrol (26.5%),  $\alpha$ - $\gamma$ -terpineno (22.6%) y *p*-cimeno (9.3%) entre otros terpenoides (Gülluce *et al.* 2003). De acuerdo a Azaz *et al.* (2002), el carvacrol (42.1–59.2%) fue el principal compuesto en los aceites de *S. icarica*, *S. pilosa* and *S. boissieri* además de otros compuestos importantes identificados como el *p*-cimeno (8.1–35.5%) y el borneol (4.5–6.3%). La presencia de la mayoría de estos terpenoides como constituyentes de los aceites esenciales de plantas del género *Satureja* difiere en variedad de los encontrados en este estudio, sin embargo si se observa la tendencia a la expresión de un metabolito secundario mayoritario que para *S. macrostema* (Benth) Briq. no es el carvacrol sino el limoneno.

Contrariamente a las especies anteriormente citadas según lo reportado por Skočibušić *et al.* (2004), la composición del aceite esencial de *S. cuneifolia* varió totalmente a lo encontrado para *S. montana*, en el aceite esencial de *S. cuneifolia* se encontraron como y metabolitos principales a terpenoides del tipo sesquiterpenico tales como,  $\alpha$ -cubebeno, el espatulenol y el  $\beta$ -cariofileno, encontrándose también monoterpenos como el limoneno y el  $\alpha$ -pineno patrón de terpenoides mas parecidos a los encontrados para *S. macrostema* (Benth) Briq. en este estudio.

Como ya se ha mencionado, diversos estudios han demostrado que la actividad y la composición química de los aceites esenciales de una planta varía considerablemente debido a varios factores, entre los principales tenemos a los quimiotipos, la influencia del ciclo vegetativo, influencia de factores extrínsecos entre los que se pueden incluir los factores del entorno y prácticas de cultivo, la temperatura, la humedad relativa, la

duración total de la insolación y el régimen de los vientos sobre todo en especies que poseen estructuras histológicas de almacenamiento superficiales y finalmente la influencia del proceso de obtención del aceite (Dharmagadda *et al.*, 2004; Kordali *et al.*, 2005; Kan *et al.*, 2006).

En los resultados obtenidos en la composición química de los extractos crudos de plantas de *S. macrostema* (Benth) Briq. de diferentes edades se pudo constatar que la diferencia en la composición química es afectada en gran medida por el estado vegetativo de la planta, además de que la expresión de compuestos aumenta con la edad de la planta. En los extractos de plantas de 15, 30, 45 y 90 días de edad el compuesto que siempre se expresó fue la pulegona en concentraciones de 95.85, 77.09, 60.30 y 2.50% respectivamente, otras plantas en las que se ha reportado presentan este comportamiento con la expresión de metabolitos constitutivos son *S. montana* y *S. cuneifolia* Ten. en las se demostró la gran variabilidad que existe en la composición química en tres estados de desarrollo, y la presencia constitutiva de geraniol en el aceite esencial de *S. montana* y de linalol y borneol en el de *S. cuneifolia*, ambas en tres diferentes estados ontogénicos (Skočibušić, 2003; Skočibušić *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos en el presente estudio respecto a la composición del aceite esencial de plantas de *S. macrostema* Benth Briq. de 90 días de edad concuerdan en gran medida con la composición química encontrada para especies de *S. cuneifolia* de Croacia (Miloš *et al.*, 2001) en los que se reporta muy bajo contenido en timol y carvacrol y alto contenido  $\alpha$ -pineno, limoneno,  $p$ -cimeno y  $\alpha$ -terpineno. De esta manera en los resultados de esta investigación se pueden identificar tendencias comunes en el análisis cualitativo de la composición del extracto crudo de *S. macrostema* respecto a especies del mismo género (kuštrak *et al.* 1996; Gülluce *et al.* 2003; Skočibušić y Bezić, 2003), a pesar de las diferencias de la localidad, las condiciones ambientales y el estadio de desarrollo de la planta. En la concentración de metabolitos en la etapa adulta de *S. macrostema* se destaca el limoneno (35.54%), el óxido de piperitona (25.71%), la piperitona (10.10%), el mentol (7.27%) como constituyentes principales.

Quizá la disminución en la concentración de la pulegona en *S. macrostema* al irse desarrollando se deba a la conversión de este metabolito en otros actuando como precursor en su biosíntesis, de esta manera se explicaría la aparición de un gran diversificación de compuestos en la etapa adulta de la planta, se sabe que la pulegona es biosintetizada a partir del limoneno y se sabe muy poco acerca de la reversibilidad de esta reacción (Bohlmann *et al.*, 1998; Maruyama *et al.*, 2002). Además, se ha reportado este comportamiento en plantas de la familia Lamiaceae, en *Mentha piperita*, la pulegona es el intermediario central en la biosíntesis de mentol y dependiendo de las condiciones ambientales, este metabolito puede ser reducido a mentona y posteriormente a mentol por la pulegona reductasa o oxidado a mentofurano por la mentofurano sintasa, hecho que es altamente influenciado por el estado de desarrollo de la planta y las condiciones ambientales. Para esta especie, el rendimiento del aceite y el contenido de mentol se incrementa con la madurez de las hojas, y bajo condiciones de estrés (relacionadas al estatus de la luz, la temperatura y la humedad), la tendencia es a la acumulación de la pulegona y el mentofurano. El medio por el cual estos factores que influyen en las rutas de biosíntesis de estos terpenoides no están entendidos (Voirin *et al.*, 1990; Soheil y Rodney, 2003).

De acuerdo a la literatura, para especies de la familia Lamiaceae, muchos de los metabolitos purificados para el análisis de la actividad antibacteriana en este estudio, son biosintetizados a partir del limoneno y la pulegona. De esta manera por ejemplo, en la biosíntesis de la piperitona, el óxido de piperitona y el mentol, la ruta biosintética es a partir del limoneno, primeramente a trans-isopiperitenol y después a isopiperitenona. A partir de la isopiperitenona, la ruta puede desviarse para obtener la pulegona y a partir de esta el mentol, o seguir hacia la obtención de piperitona y después al óxido de piperitona (Soheil y Rodney, 2003).

Los metabolitos secundarios producidos por las plantas en sus diferentes estadios de desarrollo, en la competencia natural por nuevos nichos ecológicos o en sus mecanismos de defensa contra microorganismos y depredadores son la fuente natural para buscar alternativas de control de microorganismos que causan daño a la salud animal y vegetal, a los alimentos y causan biodeterioro a materiales diversos (Damián-Badillo, 2007). Los metabolitos secundarios presentes en las plantas son una buena

alternativa para el control y manejo integrado de plagas en la agricultura. En la actualidad los extractos naturales de plantas es una industria que mueve millones de dólares alrededor del mundo. Se conocen aproximadamente 1,340 plantas como potenciales fuentes de componentes antimicrobianos (Gould, 1996), pero se conocen más de 250,000 especies de plantas que contienen una gran diversidad de componentes bioactivos.

En este trabajo se buscaron alternativas de compuestos del tipo terpenoide que inhibieran el crecimiento de hongos y oomicetos fitopatógenos. Los microorganismos ensayados fueron los hongos *F. oxysporum*, *B. cinerea* y *C. lindemuthianum* y los oomicetos *P. capsici* y *P. cinnamomi*. Se ensayaron las actividades ejercidas de un total de 19 diferentes dosis que abarcaron 5 terpenoides purificados del extracto crudo de nurite, una fracción, un control positivo (Mefenoxam 1 mg/L ó Tecto 60 1mg/L) y el extracto crudo

En cuanto a los resultados ejercidos sobre los hongos ensayados, el mayor porcentaje de inhibición obtenido fue sobre *C. lindemuthianum*, mostrando valores del 100% de inhibición con el espatulenol en las 4 dosis ensayadas de 50, 100, 250 y 500 mg/L, otros metabolitos ensayados que ejercieron altos porcentajes de inhibición contra este hongo fueron el mentol y el óxido de piperitona. Cabe mencionar que el porcentaje de inhibición ejercido por el extracto crudo en contra de *C. lindemuthianum* fue del 49.6% valor inferior al 100% ejercido con el espatulenol purificado de este. Siguiendo este mismo orden se observó que *B. cinera* tuvo porcentajes de inhibición con los compuestos espatulenol, mentol y óxido de piperitona en dosis de 250, 500 y 250 mg/L de 37.8%, valor similar al 38.5% del extracto crudo de donde se purificaron. Finalmente con *F. oxysporum* se obtuvieron porcentajes de inhibición de 28.8,% con el óxido de piperitona y el limoneno en las dosis de 250 y 250 mg/L respectivamente.

Resultados de la actividad antimicrobiana de extractos crudos de *S. macrostema* (Benth) Briq. en contra de algunos hongos ya han sido reportados por Damián-Badillo (2007), en donde se evaluó el efecto antifúngico, encontrando un buen grado de inhibición con los hongos *C. albicans*, *C. lindemuthianum*, *M. circinelloides*, *S. cerevisiae* y *S. schenckii*). Por su parte Shimoni *et al.* (1993) evaluaron la actividad

antifúngica de las fracciones volátiles de los aceites esenciales de cuatro plantas aromáticas silvestres de Israel, una de las cuales fue *S. thymbra*, las fracciones fueron probadas contra *F. oxysporum*, *M. phaseolina*, *B. cinerea* y *E. turcicum* y los resultados mostraron un efecto fungistático, resultando el efecto mayormente significativo el ejercido sobre *B. cinerea* con un 44% de inhibición.

Otros estudios de la actividad antimicrobiana de extractos metanolicos de *S. hortensis* han mostrado actividad antifúngica y esta propiedad se les atribuye a los compuestos mayoritarios timol, carvacrol y eugenol (Gülluce *et al.*, 2003; Chorianopulus *y et al.*, 2004). No obstante también hay reportes en *S. parnassica parnassica* heldr. & sart ex boiss, *S. thymbra* y *S. spinosa* en los que compuestos como el 1-8 cineol, el camfor, el borneol, el espatulenol y el óxido de cariofileno fueron identificados como los agentes antimicrobianos, presumiblemente debido a la actividad sinérgica de metabolitos menos activos como el  $\gamma$ -terpineno y el *p*-cimeno (Chorianopulus *et al.*, 2004). Al igual que en otras especies de *Satureja* como *S. montana* L. y *S. cuneifolia*, donde sus aceites esenciales mostraron actividades antifúngicas contra *C. albicans*, *A. fumigates* y *S. cerevisiae*; estos aceites contienen carvacrol, *p*-cimeno,  $\gamma$ -terpineno, borneol, timol,  $\beta$ -cubebeno, limoneno,  $\alpha$ -pineno, espatulenol,  $\beta$ -cariofileno, camfor y borneol (Skočibušić y Bezić, 2004).

Este es el primer reporte donde se ensaya la actividad antioomiceto de una especie del genero *Satureja*, especialmente contra *P. capsici* y *P. cinnamomi*. Los porcentajes de inhibición obtenidos para estos dos oomicetos fueron los más bajos dentro de todo el panel de microorganismos ensayados. Para *P. cinnamomi* se observó que la pulegona ejerció un 32.1% de inhibición con la dosis de 500 mg/L, esta inhibición es muy semejante a la ejercida por el extracto crudo de donde se extrajeron dichos terpenoides. Estos resultados no concuerdan con los reportados para otras plantas en los que la fracción terpenoide es a la que se le atribuye la actividad antioomiceto. Damián-Badillo (2007), reporto la inhibición del crecimiento al 100% en *P. cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, y *P. mirabilis* por la acción de extractos cloroformo-metanol de hojas de plantas de *Artemisia ludoviciana* Nutt. En el mismo estudio además se detectaron ocho de los compuestos con propiedades antifúngicas y antioomiceto en la fracción activa, siendo también en su mayoría monoterpenos, aunque los más representativos fueron

borneol (46.9%), camfor (17.9%) y *cis*-verbenol (2.56%), que representan el 67.36% de la fracción total. Por otra parte, se ha reportado que el extracto crudo de *Eucalyptus citriodora* y aceites esenciales de otras especies vegetales inhiben el crecimiento micelial de oomicetos como *P. infestans* (Schwan-Estrada, 1998; Mine Soylu *et al.*, 2006).

Dentro de los metabolitos encontrados, es importante mencionar la toxicidad de la pulegona (abortiva y hepatotóxica), sin embargo, este metabolito disminuye gradualmente su concentración a medida que la planta se va desarrollando (Maciag *et al.*, 2007). Por este motivo, se desaconsejaría la aplicación de plantas de nurite, *S. macrostema* (Benth) Briq., en estadios tempranos de desarrollo como agente terapéutico en la medicina popular.

#### **VIII.2.2. *E. carlinae* Delar F.**

Este es el primer reporte que muestra la composición química y la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *E. carlinae* Delar F., los compuestos encontrados en el aceite esencial son en su gran mayoría del tipo terpenoide, abundando los monoterpenos y en menor cantidad los sesquiterpenos, el patrón de compuestos mayoritarios incluye compuestos como el *p*-pineno (13.47%), el sabineno (6.69%), el borneol (6.58%), el  $\alpha$ -pineno (4.24%), el mirceno (3%), el cariofileno (2.73%), el *cis*-ocimeno (1.76%) y  $\alpha$ - $\gamma$ -terpineno (1.52%). Algunos de estos compuestos coinciden con los reportados en la literatura para otras especies de este mismo género, sin embargo el patrón general es altamente diferente. Cardozo *et al.* (2004) reportaron la composición química del aceite esencial de hojas de *E. foetidum* L. encontrando que los principales constituyentes fueron 2,4,5-trimetilbenzaldehído (27.7%), (e)-2-dodecenal (27.5%), carotol (8.8%), 3-dodecenal (5.2%) y  $\gamma$ -terpineno (3.8%). Por su parte Martins *et al.* (2003) encontraron cantidades de monoterpenos hidrocarbonatos y sesquiterpenos, además de un gran número en altas proporciones de aldehídos aromáticos y lineales. Como se puede ver nuevamente la composición de los aceites de plantas de diferentes especies puede variar ampliamente debido a los numerosos factores. También ya han sido reportadas la composición química del aceite esencial de *E. bungei* Boiss. Morteza-Semnani (2005) encontró 16 compuestos entre los que

destacaron cuminol (55.3%), el terpinoleno (14.6%), el carvacrol (8.9%) y el limoneno (7.5%), patrón de compuestos de tipo terpenoide más afín a las plantas en estudio.

Como ya se ha referido, la composición del aceite esencial de una planta es afectada por varios factores entre los que destacan el estado de desarrollo en el que se encuentren y la parte de la planta de donde se separen los compuestos. Palá-Paúl (2002) reportó la composición de *E. aquifolium* encontrando como compuestos mayoritarios del aceite esencial de tallos y hojas al Germacreno D (46%) y el mircereno (13.8%), mientras que en el aceite de inflorescencias, identificó como mayoritarios al Germacreno D (30.3%) y al sesquicineol (26.7%), seguidos por el mirceno (4.7%),  $\alpha$ -eudesmol (3.3%),  $\alpha$ -pineno (3.1%), bicicloGermacreno (3.1%),  $\delta$ -cadineno (2.8%), *epi*- $\alpha$ -muurolol (2.7%),  $\alpha$ -bisabolol (2.3%) y *epi*- $\alpha$ -bisabolol (2.2%). Estos resultados son comparables con nuestros resultados en los que determinamos la composición de plantas en distintos estados de desarrollo.

En el patrón de la acumulación de compuestos en los extractos crudos de plantas de *E. carlinae* en distintos estados de desarrollo, se puede ver que el compuesto mayormente expresado en los estadios jóvenes en plantas antes de la floración fue el germacreno D (99%). En plantas durante la floración se pudo observar una gran diversificación de compuestos, la mayoría del tipo terpenoide, entre los compuestos mayoritarios identificados en esta etapa se encuentran el L- $\alpha$ -pineno (20.90%), L- $\alpha$ -farneseno (15.78%), patchoulano (11.45%). En plantas después de la floración se puede observar prácticamente el mismo patrón, la diferencia radica principalmente en las concentraciones de los compuestos y aquí se expresa mayoritariamente el isoleodeno (21.81%). La última etapa corresponde a plantas adultas en fructificación, extracto de donde se purificaron los compuestos mayoritarios para estudios posteriores, aquí se observa una reducción en la diversificación de compuestos. La presencia elevada de germacreno D en plantas antes de la floración se puede explicar por la necesidad de la planta de ser polinizada, ya que se sabe que este metabolito puede actuar como feromona atrayendo a los insectos, de igual manera este metabolito puede actuar como insecticida o agente antimicrobiano en etapas de desarrollo tempranas de la planta (Maciag *et al.*, 2007). La presencia de isoleodeno en plantas después de la floración se debe principalmente a la conversión del germacreno D en este y otros metabolitos

(Moreno-Dorado *et al.* 2003). Sin embargo, no se descarta la posible acción ligeramente tóxica de esta especie debido a la presencia del germacreno cuya estructura da origen, por oxidación, a una serie de compuestos de tipo lactónico que producen reacciones citotóxicas (Dewick, 1998)

De igual forma se evaluó la actividad antimicrobiana de dos terpenoides extraídos del extracto crudo de hierba del sapo, un control positivo (Mefenoxam 1 mg/L y Tecto 60 1 mg/L) y el extracto crudo.

Los terpenoides de *E. carlinae* Delar F. mostraron actividad antifúngica más baja en comparación con los extraídos de *S. macrostema*, sin embargo, cualquier forma de control que reduzca la incidencia o severidad de la enfermedad, o incremente la producción del cultivo, aun cuando no haya aparentemente un efecto significativo en la reducción de la enfermedad o inóculo, es de gran ayuda para lograr un manejo ecológico, ya que el impacto al ambiente puede ser mínimo o nulo (Zavaleta-Mejía, 2000). La actividad antifúngica encontrada sobre *B. cinerea* fue de 37.2% ejercida por el borneol en una dosis de 500 mg/L, el extracto crudo de *E. carlinae* Delar F. ejerció un porcentaje de inhibición sobre *B. cinerea* de 39.1%. De igual manera sobre *C. lindemuthianum* y *F. oxysporum* los porcentajes de inhibición ejercidos por el borneol en la dosis de 500 mg/L fueron de 34.1% y 27% y por los extractos crudos de 36.6% y 29.7% respectivamente. Las actividades antioomiceto ejercidas por los dos terpenoides y el extracto crudo de hierba del sapo mostraron porcentajes de inhibición bajos. De esta manera la inhibición más alta lograda fue 30.8% sobre *P. cinnamomi* con el borneol en una dosis de 500 mg/L, no habiendo diferencia con el valor de 34.0% obtenido con el extracto crudo.

Aunque no existen estudios de actividad antifúngica ni antioomiceto en especies del género *Eryngium*, la actividad antimicrobiana ya ha sido evidenciada. Ndip *et al.* (2007) evaluaron la actividad antibacteriana de algunas plantas medicinales en las que incluyeron a *E. foetidum*, obteniendo resultados de inhibición sobre *Helicobacter pylori*. En estudios reportados por Kotan *et al.* (2007) se demostró de igual forma el alto potencial antimicrobiano que tienen las especies de este género al evaluar la actividad

antibacteriana de *E. thurifolium* boiss sobre *X. axonopodis* pv. *Vesicatoria*, principal causa de la enfermedad de la mancha bacteriana en chile y tomate.

### **VIII.3. Aspectos generales**

La aplicación de aceites esenciales de plantas es una técnica económica y muy efectiva que se adapta fácilmente al manejo integrado de plagas trayendo varias ventajas hacia medio ambiente, al considerarse selectivos y de menor impacto; ya que estos no persisten mucho tiempo en el medio y sus parámetros farmacocinéticos son poco tóxicos a organismos superiores por lo que causan menos daños al medio ambiente (Lemma, 1973).

Por otro lado la técnica de evaluación de la actividad antimicrobiana es uno de los parámetros que hay que tener en cuenta para la interpretación correcta de los resultados, por ejemplo la técnica de difusión por discos en agar empleada en este estudio es utilizada para generar datos cualitativos, aunque también nos permite conocer datos cuantitativos (Hammer *et al.*, 1999). En esta técnica la inhibición obtenida no sólo depende de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor de la capa de agar, del pH y de la composición del medio de cultivo, de la capacidad de difusión del producto en ese medio, de la temperatura y de la atmósfera de incubación, de la velocidad de crecimiento del microorganismo, y del tamaño del inóculo y fase de crecimiento del microorganismo en estudio (INPPAZ, 2000). Por tal motivo, en los resultados de inhibición obtenidos, las dosis intermedias y las bajas, en ocasiones pudieran presentar resultados de inhibición mejores, debido al parámetro de difusión, principalmente de los compuestos en los aceites esenciales o bien los compuestos mismos purificados. Además es muy importante destacar las propiedades físicas de los terpenoides que afectan negativamente la realización de los bioensayos tal como lo es la baja solubilidad de éstos en los medios de cultivo, lo cual nos lleva a considerar si el gradiente de concentración que se produce alrededor del disco es uniforme, entre otras cosas.

Aunque a menudo los extractos naturales deben su actividad biológica al sinergismo entre sus diversos compuestos ya que éstos por separado poseen mucha menor

actividad que cuando se encuentran juntos, no se descarta la posibilidad de encontrar efectos antagónicos en los compuestos ensayados, ya que en muchos de nuestros resultados, la inhibición ejercida fue mayor en los compuestos purificados que en los extractos crudos (Smith-Schalkwijk, 1999; Poppenga, 2001).

Los mecanismos exactos de acción de muchos extractos naturales, no se conocen de forma exhaustiva, pero se sabe que generalmente, deben su actividad bacteriostática o bactericida a la sobrecarga a la que someten a la membrana celular de los microorganismos encontrándose en esta un sitio de acción, hecho que determina que pierda su control e integridad (Calvo *et al.*, 2006). El mecanismo de acción antimicrobiano de los principales compuestos en los aceites esenciales (terpenos lipofílicos (monoterpenos y sesquiterpenos volátiles) se base probablemente en su solubilidad en las biomembranas. A altas concentraciones pueden influenciar el ambiente de las proteínas de membrana (canales iónicos, transportadores, receptores) y de esta manera cambiar su conformación y su bioactividad (Wink, 2003). Recientemente se ha esclarecido un poco más el mecanismo de acción de aceites esenciales en algunas saturejas (savory) contra membranas celulares de bacterias midiendo el pH intracelular, las concentraciones de ATP y observaciones de microscopia electrónica de células bacterianas tratadas con aceites esenciales (Oussalah *et al.*, 2006; Di Pasqua *et al.*, 2007).

## IX. CONCLUSIONES

- Se clasificó molecularmente a la especies ubicadas mediante taxonomía tradicional como *S. macrostema* (Benth) Briq. como *S. macrostema* var. *leavigata* y *E. carlinae* Delar F. como *Eryngium* sp.
- Se identificaron 26 metabolitos para nurite siendo mayoritarios el limoneno y el óxido de piperitona, mientras que para hierba del sapo se identificaron 21, encontrando como principales al borneol y al mirceno.
- La variación en la composición química de plantas en distintos estados de desarrollo, mostró que la pulegona fue el terpenoide en mayor concentración en plantas jóvenes de nurite, disminuyendo en la etapa de madurez. Para hierba del sapo se encontró que el germacreno D es el metabolito principal en plantas antes de la floración, desapareciendo después de la floración.
- Se encontró actividad antimicrobiana en los extractos crudos de las plantas en estudio, respecto a la actividad antifúngica, la mayor inhibición fue obtenida con el espatulenol en cualquier dosis (50, 100, 250 y 500 mg/L) y el óxido de piperitona en la dosis de 500 mg/L, ambos con 100% de inhibición contra *C. lindemuthiamum*. Mientras que la actividad antioomiceto obtenida fue menor, ejerciendo la pulegona a 500 mg/L un 32.1% de inhibición contra *P. cinnamomi*.

## X. LITERATURA CITADA

1. **Abad**, M., Bermejo, P., González, E., Iglesia, I., Irurzun, A. y Carrasco, L. 1999. Antiviral activity of Bolivian plant extracts. *Gen Pharmacol.* 32:499-503.
2. **Agrios**, G. 1999. *Fitopatología*. Uteha Noriega Editores, segunda edición.
3. **Aguilar**, J. 2002. Especiación recombinacional y relaciones filogenéticas de *S. macrostema* var. *laevigata*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Colima. Colima, Colima, México. 156pp.
4. **Aguilar**, M., Muñoz, H.J., Hernández, M., Bello, M. y Salgado-Garciglia, R. 2004. Observaciones fenológicas de *Satureja macrostema* (Benth) Briq. en dos localidades de Michoacán, México. *Ciencia Forestal en México* 29: 91-111.
5. **Appels**, R. y Dvorak, J. 1992. Relative rates of divergence of spacer and gene sequences within the rDNA region of species in the Triticeae: implications for the maintenance of homogeneity of a repeated gene family. *Theor. Appl. Gen.* 63: 361-365.
6. **Asselbergh**, B., Curvers, K., Franca, S.C., Audenaert, K., Vuylsteke, M., Van, F. y Höfte, M. 2007. Resistance to *Botrytis cinerea* in sitiens, an Abscisic Acid-Deficient Tomato Mutant, Involves Timely Production of Hydrogen Peroxide and Cell Wall Modifications in the Epidermis. *Plant Physiology* 144:1863–1877.
7. **Avise**, J. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall. New York. 512p.
8. **Azaz**, D., Demirci, F., Satil, F., Kürkçüoğlu, M., y Başer, K. 2002. Antimicrobial activity of some *Satureja* essential oils. *Z. Naturforsch* 57:817-821.
9. **Babadoost**, M., y Islam, S. 2003. Fungicide seed treatment effects on seedling damping-off of pumpkin caused by *Phytophthora capsici*. *Plant Dis.* 87:63-68.
10. **Baddi**, M., Flores, A., Foroughbakhch, R., Quiroz, H. y Torres, R. 1996. Ecología de manejo integrado de plantas (MIP) con observaciones sobre control microbiano de insectos. Publicación de la Universidad Autónoma d Nuevo León “Avances recientes en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*” pp: 21-29.
11. **Bakker**, F., Culham, A., Pankhurst, C. y Gibby, M. 2000 Mitochondrial and chloroplast DNA-based phylogeny of *Pelargonium* (Geraniaceae). *Am. J. Bot.* 87:727-734.
12. **Baldwin**, B. 1993. Molecular phylogenetics of *Calycadenia* (Compositae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA: chromosomal and morphological evolution examined. *Amer J. Bot.* 80:222-238.
13. **Baldwin**, B. 1995. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Mol. Phyl. Evol* 1: 3-16.
14. **Barrero**, A., Cuerva, J., Herrador, M. y Valdivia, M. 2001. A new strategy for the synthesis of cyclic terpenoids based on the radical opening of acyclic epoxy polyenes. *Journal of Organic Chemistry*, 66, 4074-4078.
15. **Bekesiova**, I., Nap, J. y Mlynarova, L. 1999. Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia*. *Plant Molecular Biology Reporter* 17:269-277.
16. **Benito**, E., Arranz, M. y Eslava, A.P. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Rev. Iberoam Micol.* 17:S43-S46.
17. **Benli**, M., Yiğit, N. y Kaya, I., 2007. Antimicrobial Activity of Various Extracts of *Satureja hortensis* L. *Journal of Applied Biological Sciences* 1: 25-31.

18. **Berenbaum**, M. 1995. The chemistry of defense: theory and practice. Proceedings National Academy of Sciences. USA, 234p.
19. **Betancourt**, A. y Gutierrez, D. 1999. Proyecto Mercados Verdes Herbolarios. Informe técnico final. Fondo de América del Norte para la Cooperación Ambiental (FANCA), Ecología Y Desarrollo de Tlaxcala y Puebla A.C. México, D.F. 250p.
20. **Bezić**, N., Skočibušić, M. y Dunkić, V. 2005. Phytochemical composition and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. and *Satureja cuneifolia* Ten. essential oils. Acta Bot. Croat. 64:313–322.
21. **Bohlmann**, J., Meyer-Gauen, G y Croteau, R. 1998. Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, pp. 4126-4133.
22. **Boyras**, N. y Özcan, M. 2006. Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey. *International Journal of Food Microbiology* 107: 238-242.
23. **Burzaco**, A. 1995. Contribución al estudio fitoquímico del sauzgatillo: *Vitex agnus-castus* L. (*Verbenaceae*). Tesis doctoral (Inéd.). Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid 198p.
24. **Calviño**, C. y Martínez, S. 2007. Nuevas citas para Argentina y Uruguay, y notas sobre *Eryngium* Sect. Panniculata (Apiaceae). *Darwiniana* 45:68-76.
25. **Calvo**, M., Angulo, E., Costa-Batllo, P., Shiva, C., Adelantado, C. y Vicente A. 2006. Natural Plant Extracts and Organic Acids: Synergism and Implication on Piglet's Intestinal Microbiota. *Biotechnology* 5: 137-142.
26. **Cantino**, P., Harley, R. y Wagstaff, S. 1992. Genera of Labiatae status and classification. In *Advances in Labiatae Science*. Harley, R., Reynolds, J. Eds.; Royal Botanical Gardens: Kew, London, UK. pp. 511-52.
27. **Cardozo**, E., Rubio, M., Rojas, L. y Usubillaga, A. 2004. Composition of the essential oil from the leaves of *Eryngium foetidum* L. from the Venezuelan Andes. *Journal of essential oil research* 16:33-34.
28. **Cazin**, C., Jonard, R., Alain, P. y Pellecuer, J. 1985. L'évolution de la composition des essentielles chez divers chemotypes des Sarriette des montagnes (*Satureja montana* L.) obtenus par l'isolement in vitro des apex. *CR Acad. Sc., Paris* 6:237-240.
29. **Chen**, F., Ro, D-K., Petri, J., Gershenzon, J., Bohlmann, J., Pichersky, E. y Tholl, D. 2004. Characterization of a Root-Specific Arabidopsis Terpene Synthase Responsible for the Formation of the Volatile Monoterpene 1,8-Cineole. *Plant Physiology* 135: 1955-1966.
30. **Chorianopoulos**, N., Evergetis, E. Mallouchos, A., Kalpoutzakis, E., Nychas, G. y Haroutounian, S. 2006. Characterization of the Essential Oil Volatiles of *Satureja thymbra* and *Satureja parnassica*: Influence of Harvesting Time and Antimicrobial Activity. *J. Agric. Food Chem.* 54: 3139-3145.
31. **Chorianopoulos**, N., Kalpoutzakis, E., Aligannis, N. Mitaku, S., Nychas, G. J. y Haroutounian, S.A. 2004. Essential oils of *Satureja*, *Origanum* and *Thymus* Species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Journal Agricultural Food Chemistry* 52: 8261-8267.
32. **Ciani**, M., Menghini, L., Mariani, F., Pagiotti, R., Menghini, A. y Fatichenti, F. 2000. Antimicrobial properties of essential oil of *Satureja montana* L. on pathogenic and spoilage yeasts, *Biotechnology Letters* 22:1007-1010.
33. **Coffey**, M. 1992. Phytophthora root rot of avocado. Pages 423-444 in: *Plant Diseases of Fruit Crops*. J. Kumar, H.S. Chaube, U.S. Singh, and A.N. Mukhopadhyay, eds. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J. 456 p.

34. **Covián-Nares**, J.F. 1999. Evaluación del efecto del extracto de chilcuague (*Heliopsis longipes* A. Gray Blake) sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos. Tesis de maestría. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. UMSNH. 62p.
35. **Cowan**, M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin. Microbiol. Rev. 12:564–582.
36. **Damián-Badillo**, L. 2007. Efecto antifúngico de los extractos de plantas medicinales de la región centro occidente de México. Tesis de Doctorado en ciencias. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas–UMSNH. 123p.
37. **Dewick**, P. 1998. “Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach”; John Wiley y Sons; W. Sussex-England, (1998)-Cap. 5.
38. **Dharmagadda**, V., Naik, S., Mittal, P. y Vasudevan, P. 2004. Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. Bioresource Tech 96: 1235-1240.
39. **Di Pasqua**, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D. y Mauriello, G. 2007. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. J. Agric. Food Chem. 55: 4863-4870.
40. **Dixon**, R. 2001. Natural Products and Plant Disease Resistance. Macmillan Magazines Ltd. Nature 411: 843-847.
41. **Domínguez**, X. 1985. Métodos de investigación fitoquímica México. Ed. Limusa. 133p.
42. **Edwards**, K. 2001. Molecular Tools for Screening Biodiversity. Edited by Karp, A., Isaac, P.G., Ingram, D.S., Kluwer, D.S. Academic Publishers. Pp.22-23.
43. **FAO**. 2002. Hacia la agricultura sostenible. Foro de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, obtenido de: [www.fao.org/inicio.htm](http://www.fao.org/inicio.htm).
44. **Felsenstein**, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791.
45. **Fokialakis**, N., Kalpoutzakis, E., Tekwani, B., Khan, S., Kobaisy, M., Skaltsounis, A. y Duke, S. 2007. Evaluation of the antimalarial and antileishmanial activity of plants from the Greek island of Crete. J. Nat. Med. 61:38–45.
46. **Freeman**, S., Katan, T., y Shabi, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases for various fruits. Plant Dis. 82:596-605.
47. **García-Chávez**, A., Ramírez-Chávez, E. y Molina-Torres, J. 2004a. Actividad Biocida de las Alcamidas de Raíces de *Heliopsis longipes* (Gray) Blake. Rev Esp Fitoterapia 18: 121-127.
48. **García-Chávez**, A., Urias-Silvas, J., Martínez-Soriano, J. y Molina-Torres, J. 2004b. Phylogenetic analysis of genus *Heliopsis* and subtribe Zinniinae (Asteraceae: Heliantheae) based on ITS sequences. Plant Syst. Evol. 12:77-87.
49. **Gaudeul**, M. y Till-Bottraud, I. 2004. Reproductive biology of the endangered alpine species *Eryngium alpinum* L.: phenology, pollination ecology and pollen and seed dispersal. Annals of Botany 93:711-721.
50. **González**, D. 1998. Marcadores Moleculares para los Estudios Comparativos de la variación en Ecología y Sistemática. Rev. Mex. Mic. 14:1-21.
51. **González**, F., Walls, S. y Mancilla, M. 2005. Detección mediante PCR-RFLP de *Fusarium oxysporum* f.sp. *fragariae* agente causal de fusariosis en frutilla. Boletín Micológico 20:63-72.
52. **Gören**, A., Topçu, G., Blsel, G., Blsel, M., Wilkinson, J. y Cavanagh, H. 2004. Analysis of essential oil of *Satureja thymbra* by hydrodistillation, thermal desorber, and headspace GC/MS techniques and its antimicrobial activity. Natural Product Research. 18:189-195.

53. **Gottlieb**, L. 1971. Gel electrophoresis: new approach to the study of evolution. *BioScience* 2: 939-944.
54. **Gould**, G. 1996. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *J. Food Prot. (Supl)*: 82-86.
55. **Güllüce**, M., Sokmen, M., Daferera, D.; Agar, G., Ozkan, H.; Kartal, N., Polissiou, M., Sokmen, A. y Sahin, F. 2003. In Vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3958-3965.
56. **Hammer**, K., Carson, C. y Riley, T. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86:985-990.
57. **Hammond-Kosack**, K. y Parker, J. 2003. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14:177-93.
58. **Hebert**, P., Ratnasingham, S. y DeWaard, J. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. B.* 270 *Suppl* 1, S96-S99.
59. **Hillis**, D., Mable, B., Larson, A., Davis, S. y Zimmer, E. 1996. Nucleic Acids IV: Sequencing and cloning. En: *Molecular Systematics*. Hillis, D., Moritz, C., Mable, B. (Eds.) Segunda Edición. Sinauer Associates Inc. Massachusetts. pp. 321-378.
60. **Hua-Van**, A.; Langin, T. y Daboussi, M. 2001. Evolutionary history of the impala transposon in *Fusarium oxysporum*. *Mol. Biol. Evol.* 18:1959-1969.
61. **INPPAZ**-Instituto Panamericano de Protección de los Alimentos y Zoonosis. 2000. Taller Internacional sobre Vigilancia de Salmonella y de la Resistencia Antimicrobiana en Patógenos Transmitidos por los Alimentos. Buenos Aires-Argentina.
62. **Jasmina**, G. 2005. Chemical Composition and Antifungal Activities of Essential Oils of *Satureja thymbra* L. and *Salvia pomifera* ssp. calycina (Sm.) Hayek. *J. Essent Oil Res* 18:367-371.
63. **Jobes**, D., Hurley, D. y Thien, L. 1995. Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides, and RNA. *Taxon* 44:379-386.
64. **Judelson**, H., y Blanco, F. 2005. The spores of *Phytophthora* weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews-Microbiology* 3:47-57.
65. **Kan**, Y., Uçan, U., Kartal, M., Aaltun, L., Aslan, S., Sayar, E. y Ceyhan, T. 2006. GC-MS Analysis and Antibacterial Activity of Cultivated *Satureja cuneifolia* Ten. *Essential Oil. Turk J Chem.* 30: 253 -259.
66. **Kartal**, M., Mitaine-Offer, A., Abu-Asaker, M., Miyamoto, T., Calis, I., Wagner, H. y Lacaille-Dubois, M. 2005. Two new triterpene saponins from *Eryngium campestre*. *Chem. Pharm. Bull.* 53:1318-20.
67. **Kartal**, M., Mitaine-Offer, A., Paululat, T., Abu-Asaker, M., Wagner, H., Mirjolet, J., Guilbaud, N. y Lacaille-Dubois, M. 2006. Triterpene saponins from *Eryngium campestre*. *J Nat Prod.* 69:1105-8.
68. **Katan**, T. 1999. Current status of vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. *Phytoparasitica* 27:51-64.
69. **Kaufmann**, M. y Wink, M. 1994. Molecular systematics of the nepetoideae (family Labiatae): phylogenetic implications from rbcL gene sequences. *Z. Naturforsch. C.* 49, 635-645.
70. **Khalid**, L., Pérez-Espinoza, A., Pineda, M. y Ruiz-Rubio, M. 1996. Purification and characterization of tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *Applied Environmental Microbiology* 62:1604-1609.

71. **Kordali, S., Cakir, A., Mavi, A., Kilic, H. y Yildirim, A.** 2005. Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish *Artemisia* species. *Journal Agricultural Food Chemistry* 53: 1408- 1416.
72. **Kotan, R., Dadasoglu, F., Kordali, S., Cakir, A., Dikbas, N. y Cakmakci, R.** 2007. Antibacterial activity of essential oils extracted from some medicinal plants, carvacrol and thymol on *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye causes bacterial spot disease on pepper and tomato. *Journal of Agricultural Technology* 3: 299-306.
73. **Küpeli, E., Kartal, M., Aslan, S. y Yesilada, E,** 2006. Comparative evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptiva activity of Turkish *Eryngium* species. *Journal of Ethnopharmacology* 107: 32–37.
74. **Kumar, S. y Filipski, A.** 2001. Molecular phylogeny reconstruction. *Encyclopedia of Life Sciences /www.els.net.*
75. **Kumar, S. y Rzhetsky A.** 1996. Evolutionary relationships of eukaryotic kingdoms. *J. Mol. Evol.* 42:183-193.
76. **Kuštrak, D., Kuftinec, J., Blažević, N. y Maffei, M.** 1996. Comparison of the essential oil composition of two subspecies of *Satureja montana*. *J. Essent. Oil Res.* 11:7-13.
77. **Lafontaine, D. y Tollervey, D.** 2001. The function and synthesis of ribosomes. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 514-520.
78. **Lagouri, V. y Boskou, D.** 1996. Nutrient antioxidants in oregano. *Int J Food Sci Nutr.* 47: 493-497.
79. **Lahlou, M.** 2004. Methods to Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential Oils. *Phytother. Res.* 18: 435–448.
80. **Lemma, A.** 1973. Schistosomiasis: the social challenge of controlling a man-made disease. *Impact Sci. Soc.* 23: 33-142.
81. **Leonian, L.** 1922. Stem and fruit blight of pepper caused by *Phytophthora capsici* sp. nov. *Phytopathology* 12:401-408.
82. **Liston, A, Robinson, W., Oliphant, J., y Álvarez-Buylla, E.** 1996. Length variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers of non-flowering seed plants. *Syst Bot;* 21:1-12.
83. **Luna-Martínez, F., Rodríguez-Guerra, R., Victoria-Campos, M. y Simpson, J.** 2007. Development of a molecular genetic linkage map for *Colletotrichum lindemuthianum* and segregation analysis of two avirulence genes. *Curr Genet* 51:109–121.
84. **Macią, A., Milaković, D., Christensen, H., Antolović, V. y Kalemba D.** 2007. Essential oil composition and plant-insect relations In scots pine (*Pinus Sylvestris* L.). *Scientific Bulletin Of The Technical University Of Lodz No. 1008-Food Chemistry and Biotechnology, Vol. 7.*
85. **Manners, J.** 1993. Principles of plant pathology. Second edition, Cambridge University Press.343p.
86. **Margulis, L. y Schwarts K.** 2000. Five Kingdoms: an illustrated guide to the phyla of life on earth. W.H. Freeman and company, New York.
87. **Martínez, S. y Galotti, L.** 2001. Las especies de *Eryngium* Sect. Foetida (Apiaceae) en la Argentina. *Darwiniana* 39:155-169.
88. **Martins, A., Salgueiro, L., Proenca, C., Vila, R., Canigueral, S., Tomi, F. y Casanova, J.** 2003. Essential oil composition of *Eryngium foetidum* from S. Tome e Principe. *Journal of Essential Oil Research* 15:93-95.
89. **Maruyama, T., Saeki, D., Ito, M. y Honda, G.** 2002. Molecular Cloning, Functional Expression and Characterization of *d*-Limonene Synthase from *Agastache rugosa*. *Biol. Pharm. Bull.* 25:661-665.

90. **Matheron, M.** y Porchas, M. 2000. Impact of Azoxystrobin, Dimethomorph, Fluazinam, Fosetyl-Al, and Metalaxyl on Growth, Sporulation, and Zoospore Cyst Germination of Three *Phytophthora* spp. *Plant Disease* 84: 454-458.
91. **Mendoza-Zamora, C.** 1991. Histopatología y especies de *Tranzschelia* que atacan durazno y ciruelo en el estado de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 10: 35-37.
92. **Menzies, J.** y Jarvis, W. 1994. The infestation of tomato seed by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Pathology* 43:378-386.
93. **Miloš, M., Radonić, A., Bezić, N.** y Dunkić, V. 2001. Localities and seasonal variations in the chemical composition of essential oils of *Satureja montana* L. and *Satureja cuneifolia* Ten. *Flav. Fragr. J.* 16:157-160.
94. **Mine Soylu, E., Soner, S.** y Kurt, S. 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Micopathologia* 161:119-128.
95. **Moghaddam, F., Moridi Farimani, F., Salahvarzi, S.** y Amin, G. 2007. Chemical Constituents of Dichloromethane Extract of Cultivated *Satureja khuzistanica*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 4:95-98. Published online doi: 10.1093/ecam/nel065.
96. **Mohammadreza, V.** 2008. Variation in the essential oil composition of *Artemisia annua* L. of different growth stages cultivated in Iran. *African Journal of Plant Science* 2: 016-018.
97. **Moreno, A.** 2006. Aplicaciones biotecnológicas del gen *afp* (Anfifungal protein) de *Aspegillus giganteus* para la protección de plantas frente a la infección por patógenos. Tesis de doctorado. IBMB-CSIC de Barcelona. 167p.
98. **Moreno-Dorado, F., Lamers, Y., Mironov, G., Wijnberg, J.** y De Groot, A. 2003. Chemistry of (+)-aromadendrene. Part 6: Rearrangement reactions of ledene, isodene and their epoxides. *Tetrahedron* pp:7743-7750.
99. **Morteza-Semnani, K.,** 2005. Essential Oil Composition of *Eryngium bungei* Boiss., *Journal of Essential Oil Research.* 17:485-486.
100. **Muñoz, R., Flores, G., y Martínez, P.** 2003. La biología de *Colletotrichum lindemuthianum*. *Plan Biol.* 43-52.
101. **Ndip, R., Malange Tarkang, A., Mbullah, S., Luma, H., Malongue, A., Ndip, L., Nyongbela, K., Wirmum, C.** y Efangé, S. 2007. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of extracts of selected medicinal plants from North West Cameroon. *J Ethnopharmacol.* 114:452-7.
102. **Nelson, P., Dignan, M.** y Anaissie, E. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbiol Rev.* 7:479-504.
103. **Newman, D, Cragg, G.** y Snader, K. 2000. The influence of natural products on drug discovery. *Nat. Prod. Report* 17: 215-34.
104. **Nuez, F.** y Carrillo, J. 2000. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Ed. U.P.V.
105. **Osbourn, A. E.** 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant cell* 8:1821-1831.
106. **Oussalah, M., Caillet, S.** y Lacroix, M. 2006. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 69:1046-1055.

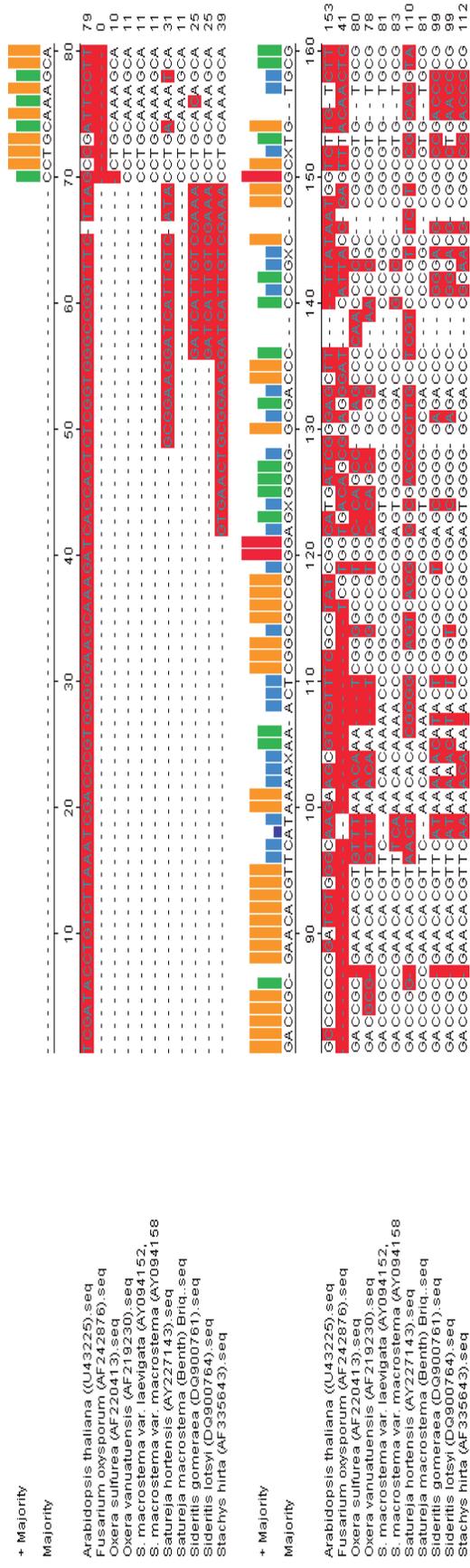
- 107. Palá-Paúl, J.** 2002. Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género "*Eryngium*" L., en la península ibérica. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid 269p.
- 108. Palá-Paúl, J., Brophy, J., Pérez-Alonso, M., Usano, J. y Soria, S.** 2007. Essential oil composition of the different parts of *Eryngium corniculatum* Lam. (Apiaceae) from Spain. *J Chromatogr A.* 1175:289-293.
- 109. Palá-Paúl, J., Pérez-Alonso, M., Velasco-Negueruela, A., Vadaré, J., Villa, A., Sanz, J. y Brophy, J.** 2005a. Essential oil composition of the different parts of *Eryngium bourgatii* Gouan from Spain. *J Chromatogr A.* 1074:235-239.
- 110. Palá-Paúl, J., Pérez-Alonso, M., Velasco-Negueruela, A., Vadaré, J., Villa, A., Sanz, J. y Brophy, J.** 2005b. Analysis of the essential oil composition from the different parts of *Eryngium glaciale* Boiss. from Spain. *J Chromatogr A.* 1094:179-182.
- 111. Paquin, B., Laforest M., Forget L., Roewer I., Wang Z., Longcore J y Lang B.F.** 1997. The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression. *Curr. Genet.* 31:380-395.
- 112. Perdigó, M. y Llauro, M.** 1984. Nueva aportación al estudio biosistemático del género *Eryngium*. *Lazaroa* 6:189-198.
- 113. Pérez-Moreno, L., Durán-Ortiz, L., Ramírez-Malagón, R., Sánchez-Pale, J. y Olalde-Portugal, V.** 2004. Sensibilidad *in vitro* de aislados del hongo *Phytophthora capsici* a fungicidas. *Fitosanidad-Primera Convención Mundial del Chile* 144-150.
- 114. Perfect, S., Hughes, H., O'Connell, R. y Green, J.** 1999. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genet. Biol.* 27:186-198.
- 115. Pino, J., Rosado, A. y Fuentes, V.** 1997. Composition of the Leaf Oil of *Eryngium foetidum* L. from Cuba. *J. Essent. Oil Res.* 9:467-468.
- 116. Pino-Rodríguez, S., Prieto-González, S., Pérez-Rodríguez, M. y Molina-Torres, J.** 2004. Género *Erythrina*: Fuente de Metabolitos Secundarios con Actividad Biológica. *Acta Farm. Bonaerense* 23: 252-258.
- 117. Pirtillä, A., Hirsikorpi, M., Kämäräinen, T., Jaakola, L. y Hohtola, A.** 2001. DNA Isolation Methods for Medicinal and Aromatic Plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:273a-f.
- 118. Poppenga, R.** 2001. Risk associated with the use of herbs and other dietary supplements veterinary. *Clin. North Am. Equine Practic.* 17: 455-477.
- 119. Rafalski, J. y Tingey, S.** 1993. Genetic diagnostic in plant breeding: RAPDs microsatellites and machines. *TIG* 9:275-280.
- 120. Rhodes, M.** 1994. Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. *Plant Mol. Biol.* 24: 1-20.
- 121. Rodríguez, M. y Arencibia, A.** 2002. Principales tipos de marcadores del polimorfismo de los ácidos nucleicos. Técnicas analíticas. En: *Marcadores Moleculares Nuevos Horizontes en la Genética y en la Selección de Plantas*. Ed. por Cornide Hernández et al., Editorial Félix Varela. La Habana. 367p.
- 122. Romero, C.** 1998. Hongos Fitopatógenos. Revista Publicada por la Dirección del Patronato Universitario. A. C. Perteneciente a la Universidad Autónoma Chapingo. 19-23.
- 123. Rzedowski, J y Rzedowski, G.** 2001. Flora Fanerogámica del Valle de México. Volumen II. ENCB-INE. 674p.

- 124. Salgado-Garciglia, R.** 1995. Productos naturales vegetales utilizados como agroquímicos. Boletín Quetzal, UMSNH-Facultad de Biología. 3:28-30.
- 125. Sánchez-Pérez, J. de la L., Alcántar-Rocillo, J. J., Coria-Avalos, V. M., Anguiano-Contreras, J., Vidales-Fernández, I., Tapia-Vargas, L. M., Aguilera-Montañez, J. L., Hernández-Ruiz, G. y Vidales-Fernández, J. A.** 2001. Tecnología para la producción de aguacate en México. INIFAP, CIRPAC, C. E. Uruapan. Libro Técnico Num. 1. Michoacán, México, 208 p.
- 126. Schwan-Estrada, K., Stangarlin, J., Cruz, S., Bonaldo, S. y Pascholati, S.** 1998. Efeito do extrato bruto de *Eucalyptus citriodora* no crescimento micelial e germinação de esporos de fungos fitopatogenicos. *Summa Phytopathologica* 21: 101.
- 127. Sefidkon, F., Dabiri, M. y Alamshahi, A.** 2004. Chemical composition of the essential oil of *Eryngium billardieri* F. Delaroche from Iran. *Journal of Essential Oil Research* 16: 42-43.
- 128. Serrato, B.** 2002. Estudio fitoquímico de plantas medicinales. INIFAP-Morelia. 10 p.
- 129. Shimoni, M., Putievsky, E., Ravid, U. y Reuveni, R.** 1993. Antifungal activity of volatile fractions of essential oils from four aromatic wild plants in Israel. *J. Chem. Ecol* 19:1129-1133.
- 130. Shiva-Ramayoni, C.** 2007. Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria-Universidad Autónoma de Barcelona 184p.
- 131. Simon, J., Chadwick, A. y Craker, L.** 1984. Herbs: An Indexed Bibliography, 1971-1980. The Scientific Literature on Selected Herbs, and Aromatic and Medicinal Plants of the Temperate Zone. Archon Books. Hamden, CT. 770 p
- 132. Skočibušić, M., Bezić N y Dunkić V.** 2004. Variability of *Satureja cuneifolia* Ten. essential oils and their antimicrobial activity depending on the stage of development. *European Food Research and Technology*. 218: 367-371.
- 133. Skočibušić, M.** 2003. Chemical Composition and Antimicrobial Variability of *Satureja montana* L. Essential Oils Produced During Ontogenesis. *Journal of Essential Oil Research* 16:387-391.
- 134. Skočibušić, M. y; Bezić, N.** 2003. Chemical Composition and Antidiarrhoeal Activities of Winter Savory (*Satureja montana* L.) Essential Oil. *Pharmaceutical Biology* 41:622-626.
- 135. Skočibušić, M., Bezić, N. y Dunkić, V.** 2006. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia. *Food Chemistry* 96:20-28.
- 136. Skočibušić, M. y Bezić, N.** 2004. Phytochemical Analysis and *in vitro* antimicrobial activity of two *Satureja* species essential oils. *Phytotherapy Research* 18:967-970.
- 137. Smith-Schalkwijk, M.** 1999. Veterinary Phytotherapy: an overview. *Can. Vet. J.* 40:891-892.
- 138. Soheil, S. y Rodney, B.** 2003. Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in peppermint by controlling a downstream monoterpene reductase. *PNAS* 100:14481-14486.
- 139. Stewart, J., Kim, M., James, R., Dumroese, R., y Klopfenstein, N.** 2006. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium commune* isolates from a conifer nursery. *Phytopathology* 96:1124-1133.
- 140. Swofford, D.** 1996. Phylogenetic analysis using parsimony Version 3.0. Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois.

- 141. Thomidis, T. y Michailidis Z.** 2002. Preliminary Evaluation of Nine Fungicides for Control of *Phytophthora cactorum* and *P. citrophthora* Associated with Crown Rot in Peach Trees. *Phytoparasitica* 30:1-9.
- 142. Tu, J.** 1992. *Colletotrichum lindemuthianum* on bean: population dynamics of the pathogen and breeding for resistance. In: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. (Bailey, J. A. and Jeger, M. J., Eds). Wallingford, UK: CAB International, pp. 358-380.
- 143. Vallad, G. y Goodman, R.** 2004. Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. *Crop Sci.* 44:1920-1934.
- 144. Van, J.** 2006. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci* 11: 247–253.
- 145. Vázquez, G., Cuevas, R., Cochrane, S., Iltis, H., Santana, F. y Guzmán, L.** 1995. Flora de Manantlán. UdeG-IMECBIO/University of Wisconsin-Madison, BRIT. Forth Worth, TX, USA. 315p.
- 146. Vidales-Fernández, J.** 2002. Efecto de factores físico químicos sobre la actividad microbiana de la rizósfera del aguacatero (*Persea americana* Mill) para el control de *Phytophthora cinnamomi* (Rands). Tesis de Doctorado Universidad de Colima 120p.
- 147. Voirin, B., Brun, N. y Bayet, C.** 1990. Effects of day length on the monoterpene composition of leaves of *M. x piperita*. *Phytochemistry* 29:749-755.
- 148. Walsh, J.** 2000. Genome evolution: overview. *Encyclopedia of Life Sciences* obtenido de: [www.els.net](http://www.els.net).
- 149. White, T., Bruns, T. Lee, S. y Taylor, J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Innis, M., Gelfand, D. y Sninsky, J. (eds.). pp. 315-322.
- 150. Williams, G., Kubelik, A., Livak, K., Rafalski, J. y Tingey, S.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids. Res.* 18: 6531-6535.
- 151. Wink, M.** 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64:3-19.
- 152. [www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx)**
- 153. [www.semarnat.gob.mx](http://www.semarnat.gob.mx).**
- 154. Yamasaki, K., Nakano, M., Kawahata, T., Mori, H., Otake, T., Ueba, N., Oishi, I., Inami, R., Yamane, M., Nakamura, M., Murata, H. y Nakanishi, T.** 1998. Anti HIV-1 activity of herbs in Labiatae. *Biol. Pharm. bula* 21:828-33.
- 155. Zavaleta-Mejía, E.** 2000. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. *Terra* 17:201-207.
- 156. Zentmyer, G.** 1985. Origen and distribution of *Phytophthora cinnamomi* Cal. *Avocado Soc. Yearbook* 69: 89- 94.

# XI. ANEXOS

## XI.1. Alineamiento de *S. macrostema* (Benth) Briq.

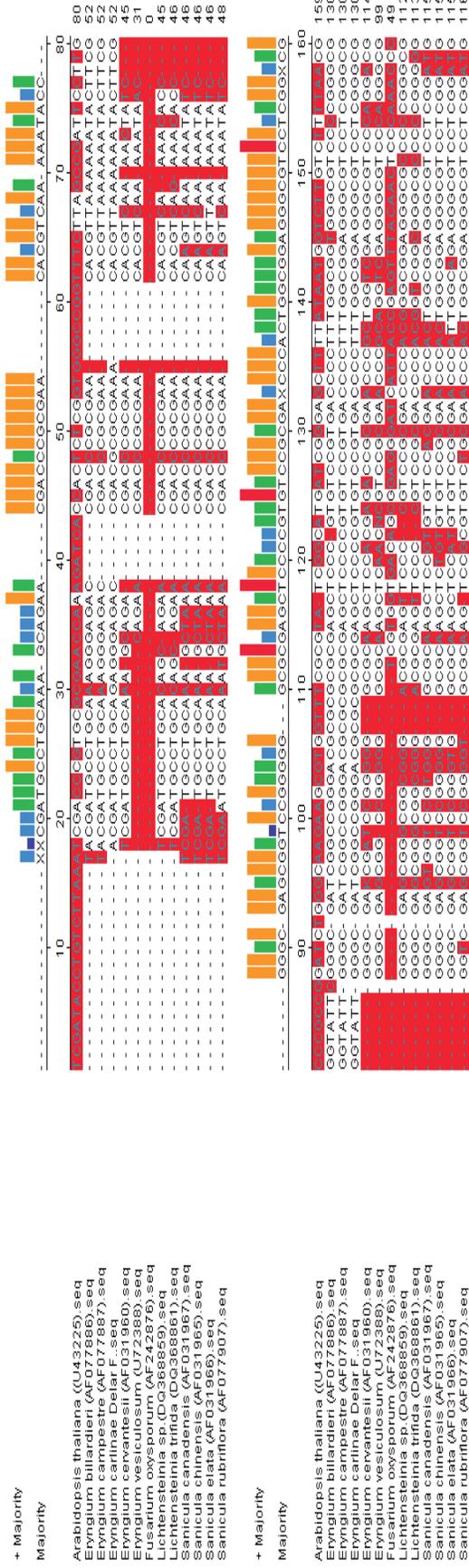


Alineamiento CLUSTALW realizado con el programa MegAlign de DNASTAR 7.2., de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 para *S. macrostema* (Benth) Briq. y géneros de referencia. Se marca con sombra roja los residuos que difieran de *S. macrostema* (Benth) Briq. La secuencia consenso es usada como referencia para el resto de las secuencias e indica el parecido entre las secuencias según la escala de colores - +.





## XI.2. Alineamiento de *E. carlinae* Delar F.



Alineamiento CLUSTALW realizado con el programa MegAlign de DNASTAR 7.2., de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 para *E. carlinae* Delar F. y géneros de referencia. Se marca con sombra roja los residuos que difieran de *E. carlinae* Delar F. La secuencia consenso es usada como referencia para el resto de las secuencias e indica el parecido entre las secuencias según la escala de colores - +.





### XI.3. Reporte de secuencia ITS1-5.8S-ITS2 de *E. carlinae* Delar F. al banco de datos GenBank, numero de acceso EU089972.

NCBI Nucleotide

Search Nucleotide for [ ] Go Clear

Format: GenBank FASTA Graphics More Formats

Download Save Links

GenBank: EU089972.1

#### Eryngium carlinae internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence

Features Sequence

LOCUS EU089972 628 bp DNA linear PLN 29-AUG-2007

DEFINITION Eryngium carlinae internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence.

ACCESSION EU089972

VERSION EU089972.1 GI:156255406

KEYWORDS .

SOURCE Eryngium carlinae

ORGANISM [Eryngium carlinae](#)  
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; campanulids; Apiales; Apiaceae; Saniculoideae; Saniculeae; Eryngium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 628)  
AUTHORS Espino-Garibay, D.F., Garcia-Chavez, A. and Salgado-Garciglia, R.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (09-AUG-2007) Instituto de Investigaciones Quimico-Biologicas, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, Av. Fco. J. Mugica s/n, Felicitas de Rio, Morelia, Michoacan 58030, Mexico

FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..628  
/organism="Eryngium carlinae"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/db\_xref="taxon:463694"  
[misc RNA](#) 1..242  
/product="internal transcribed spacer 1"  
[rRNA](#) 243..405  
/product="5.8S ribosomal RNA"  
[misc RNA](#) 406..628  
/product="internal transcribed spacer 2"

ORIGIN  
1 acgatgcttg cagagggaga cgcagcgcg aaacacgta aaaataact cgggtattg  
61 gcgatcgcc gggacgcgc cgcgagctc cctgtccgt gaccctttg gggaggggc  
121 tctctgggcg ctccggccc acaaaactac ccggcgccg aatgcgccaa ggaatagaa  
181 acgaactgca cgttgtgcc cgtttagcgc gggcgggcc tcggcggtct ttcagaaaca  
241 caaacgactc tcggcaacgc atctcccgcc tctcgcgctc gatgaagaac gtagcgaat  
301 gcgatacttg gtgtgaattg cagaatcccg tgaaccatcg agtctttgaa cgcaagtgc  
361 gcccgaaagc attagcgcca agcgcgagtc gctcgggctc caacgatcg ctcgccccc  
421 aaaccagcac tctagcgcg gctcggggg cggataatgg cctcccgctc atcgctcgca  
481 ggctggccca aaagcgatc ccgctgcgac aggatgtacg gcggcatgtg gttgtgtgaa  
541 aaaggccgct tctcagtgcc gcgtcggctc ccgtcgtcgg tcgcagctct tgtgacgct  
601 ggcggggcca acgctgatgc gtcctcga  
//

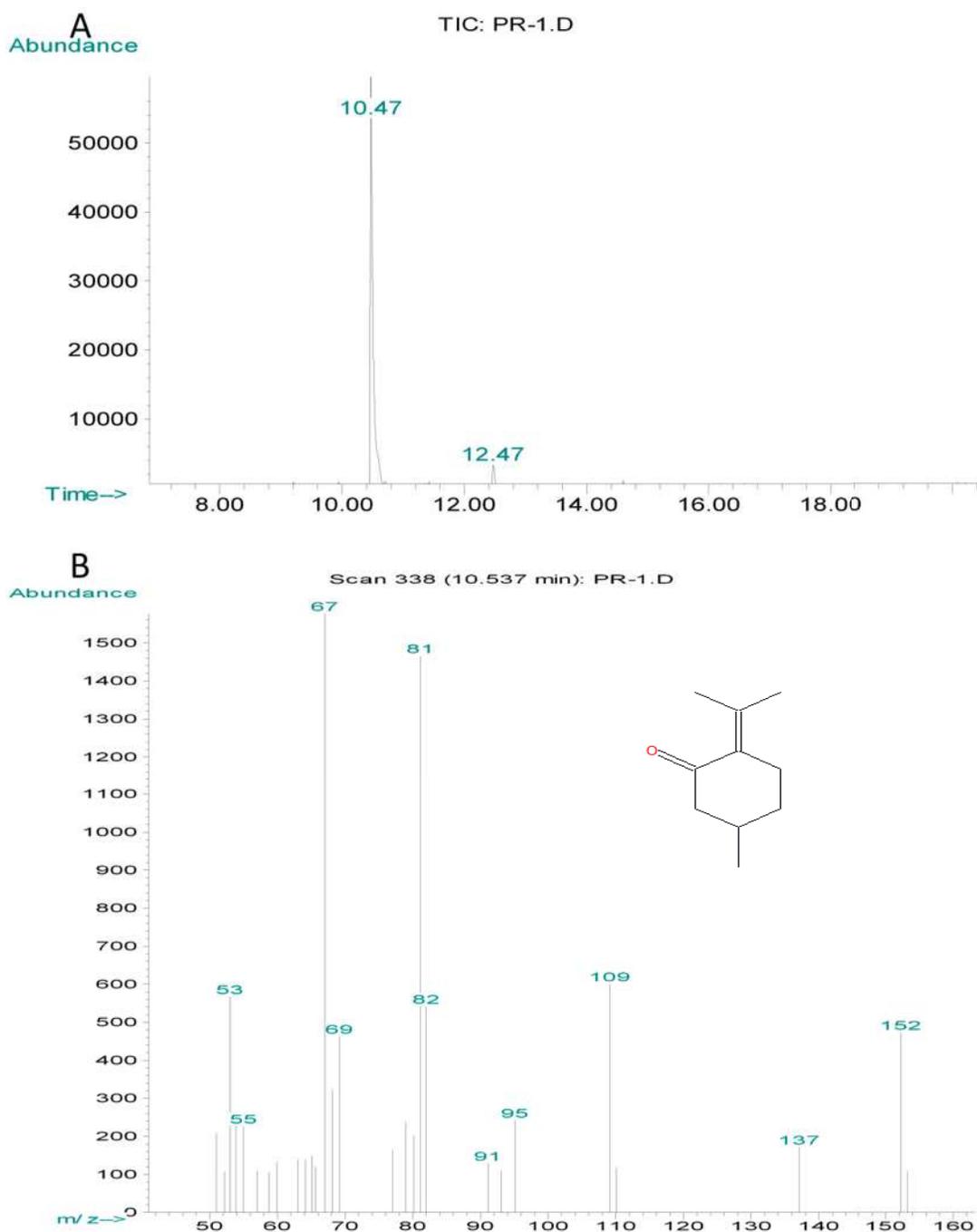
Change Region Shown  
Customize View

Pick Primers  
Design and test primers for this sequence using Primer-BLAST.

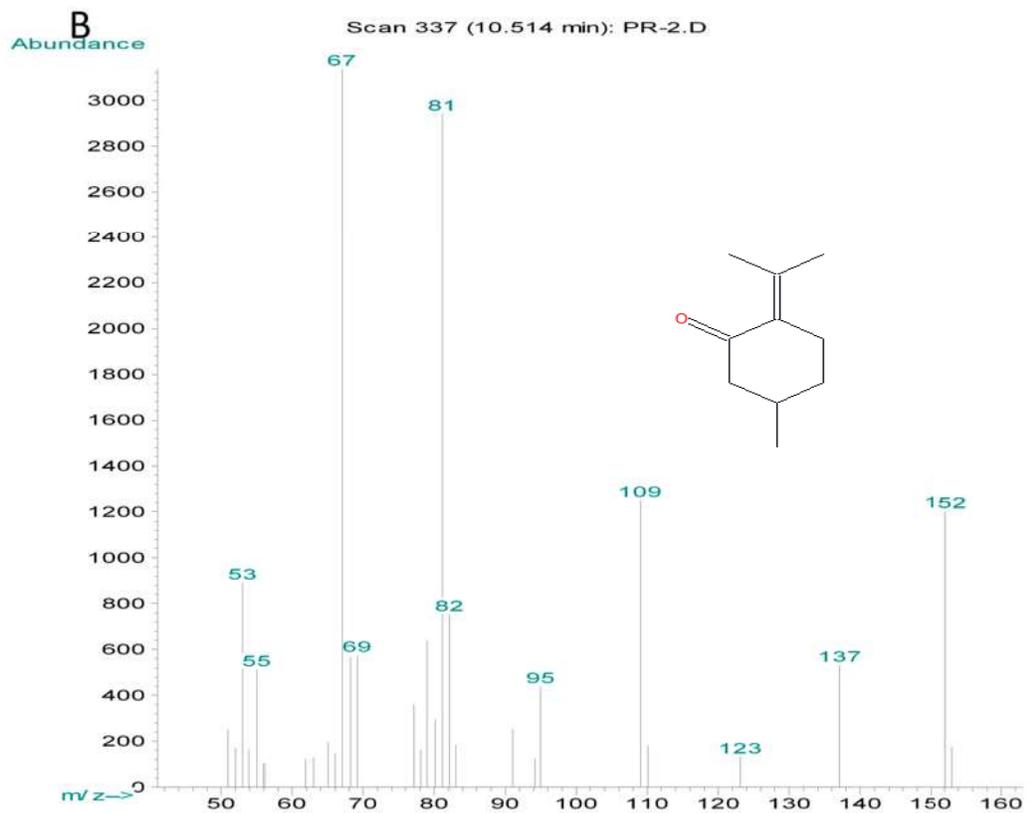
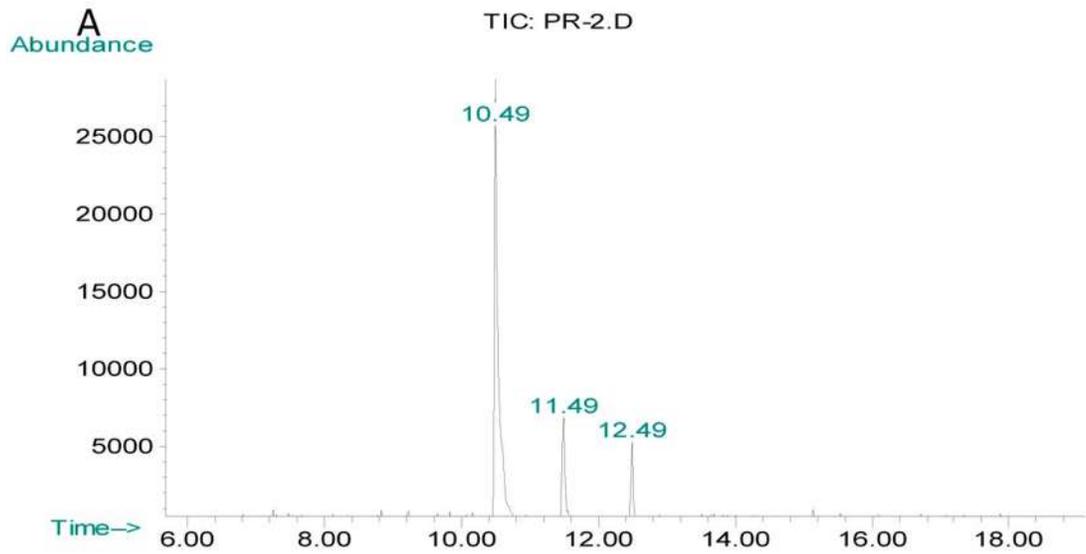
Recent Activity  
Turn On Clear  
Activity recording is turned off.  
Turn recording back on

All links from this record  
Taxonomy  
Related Sequences

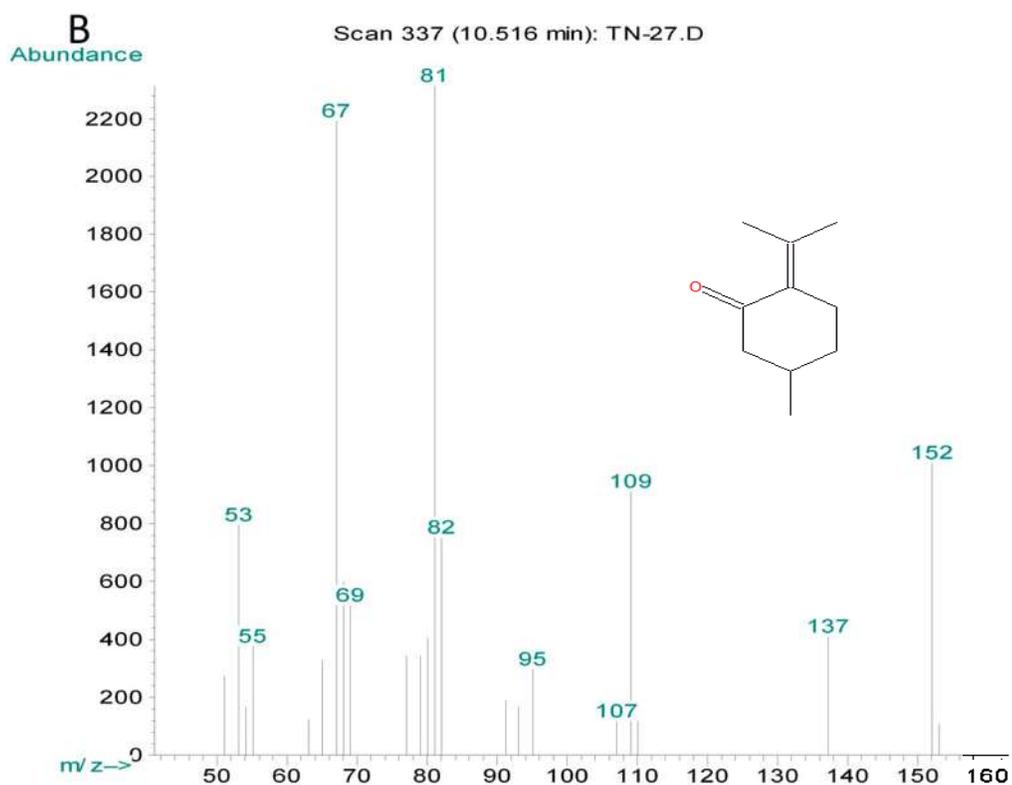
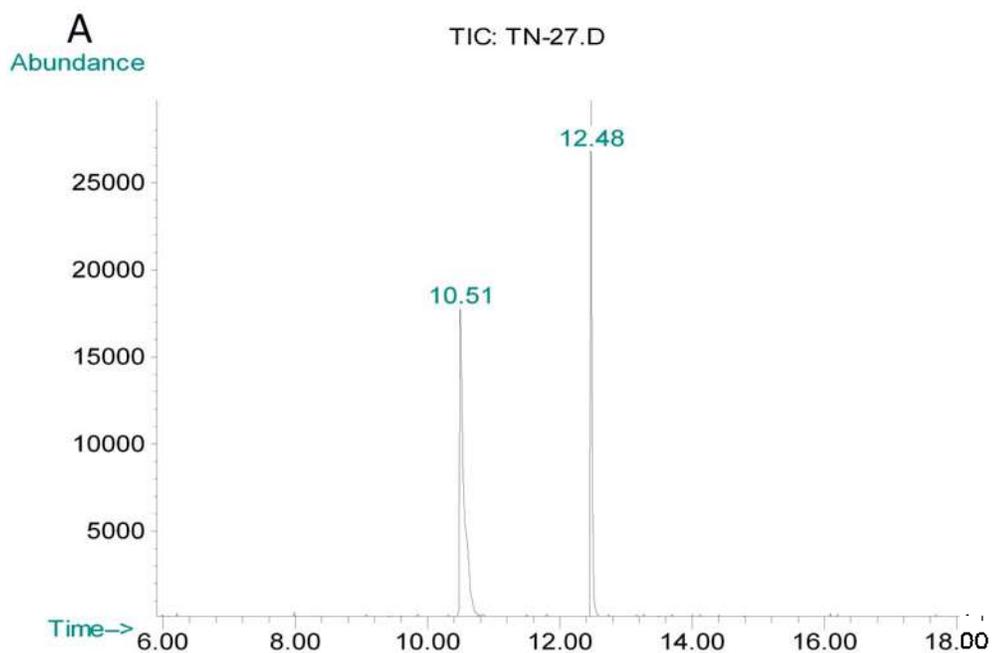
XI.4. Análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de extractos etanólicos de plantas de *S. macrostema* (Benth) Briq. en distintos estados de desarrollo.



A. Cromatograma de gases del extracto etanolico de plantas de *S. macrostema* (Benth) Briq. (Nurite) de 15 días de edad; B. Espectro de masas del componente mayoritario (Pulegona) de acuerdo a la biblioteca NIST 02 por medio del software HPChem Station.

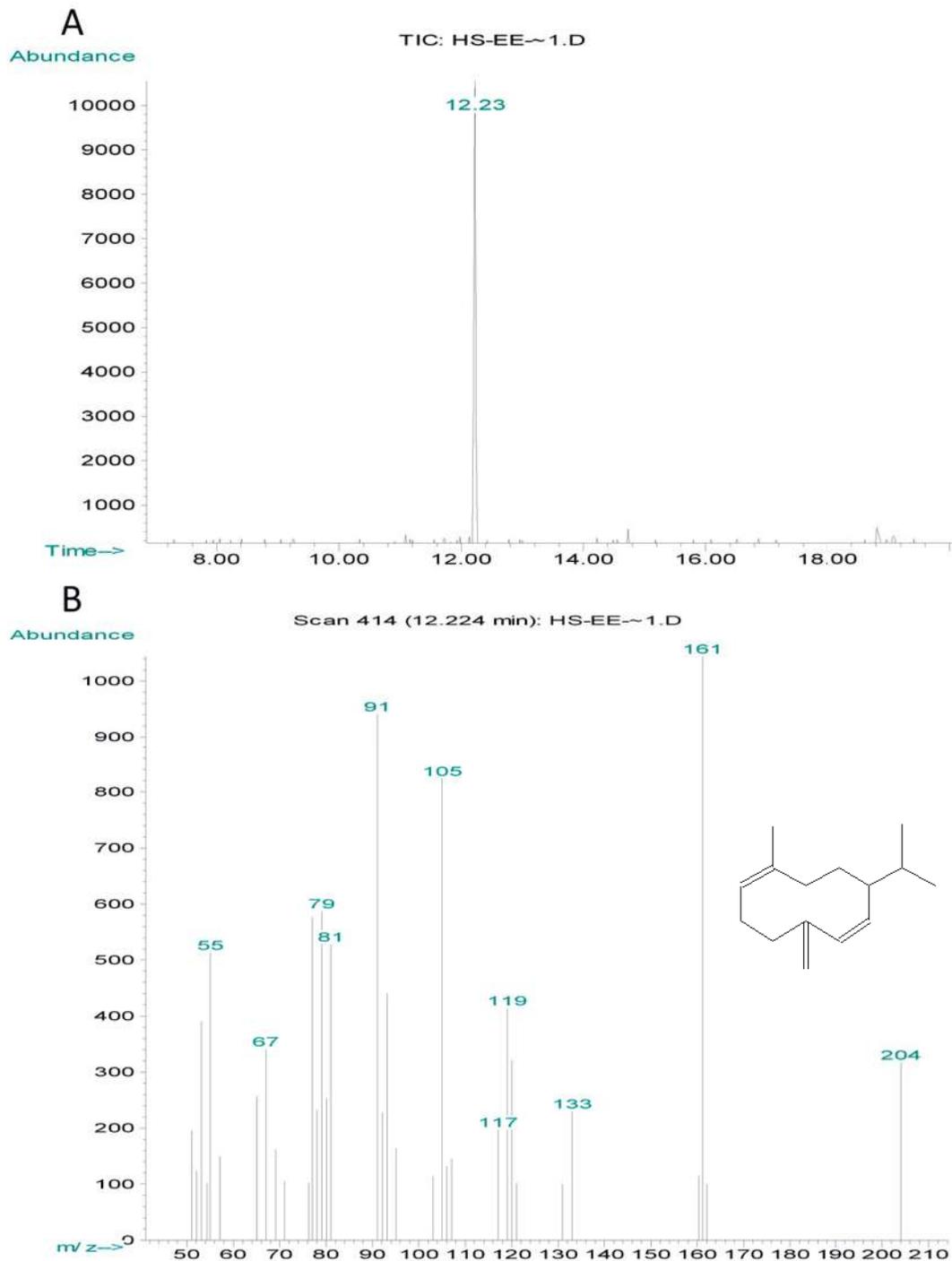


A. Cromatograma de gases del extracto etanolico de plantas de *S. macrostema* (Benth) Briq. (Nurite) de 30 días de edad; B. Espectro de masas del componente mayoritario (Pulegona) de acuerdo a la biblioteca NIST 02 por medio del software HPChem Station.

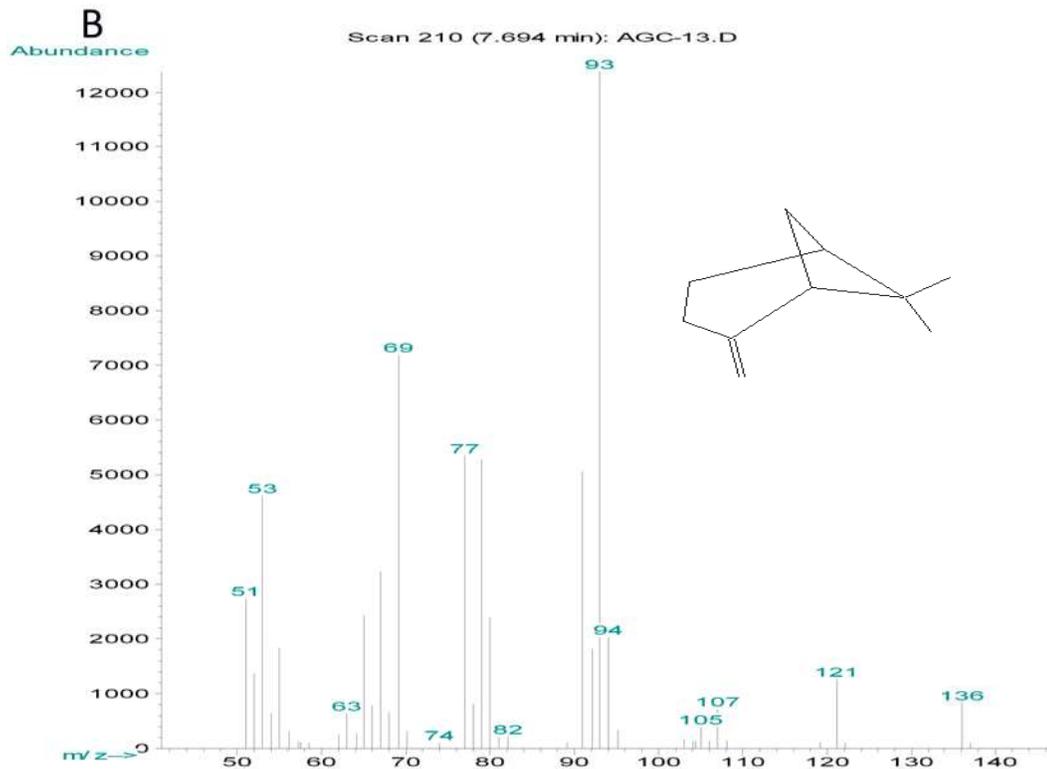
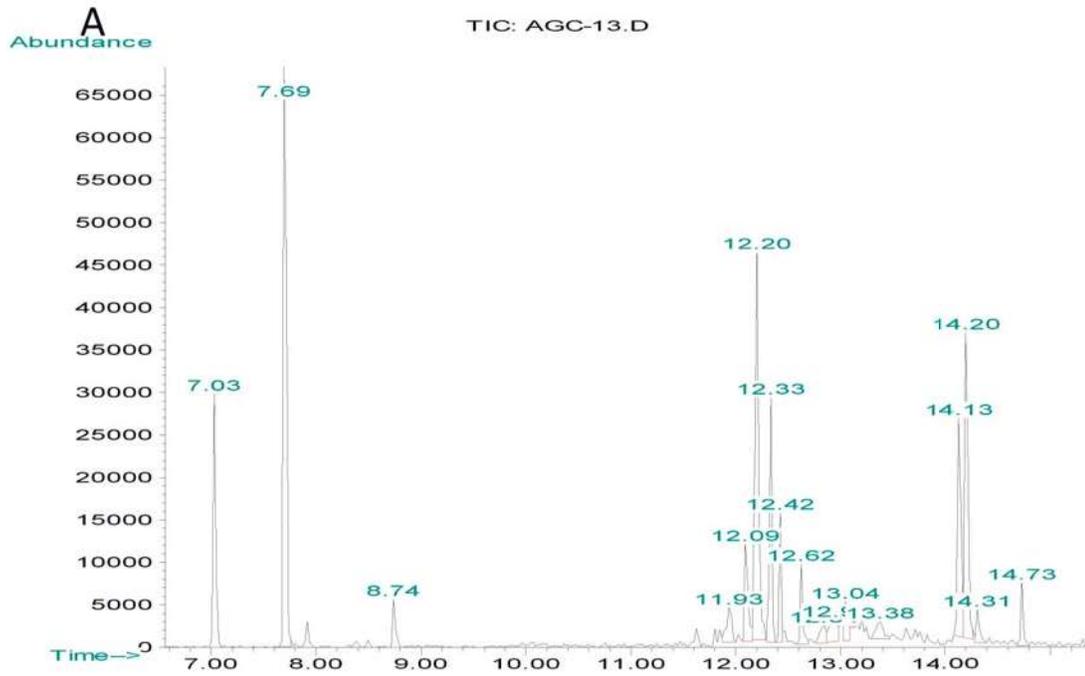


A. Cromatograma de gases del extracto etanólico de plantas de *S. macrostema* (Benth) Briq. (Nurite) de 45 días de edad; B. Espectro de masas del componente mayoritario (Pulegona) de acuerdo a la biblioteca NIST 02 por medio del software HPChem Station.

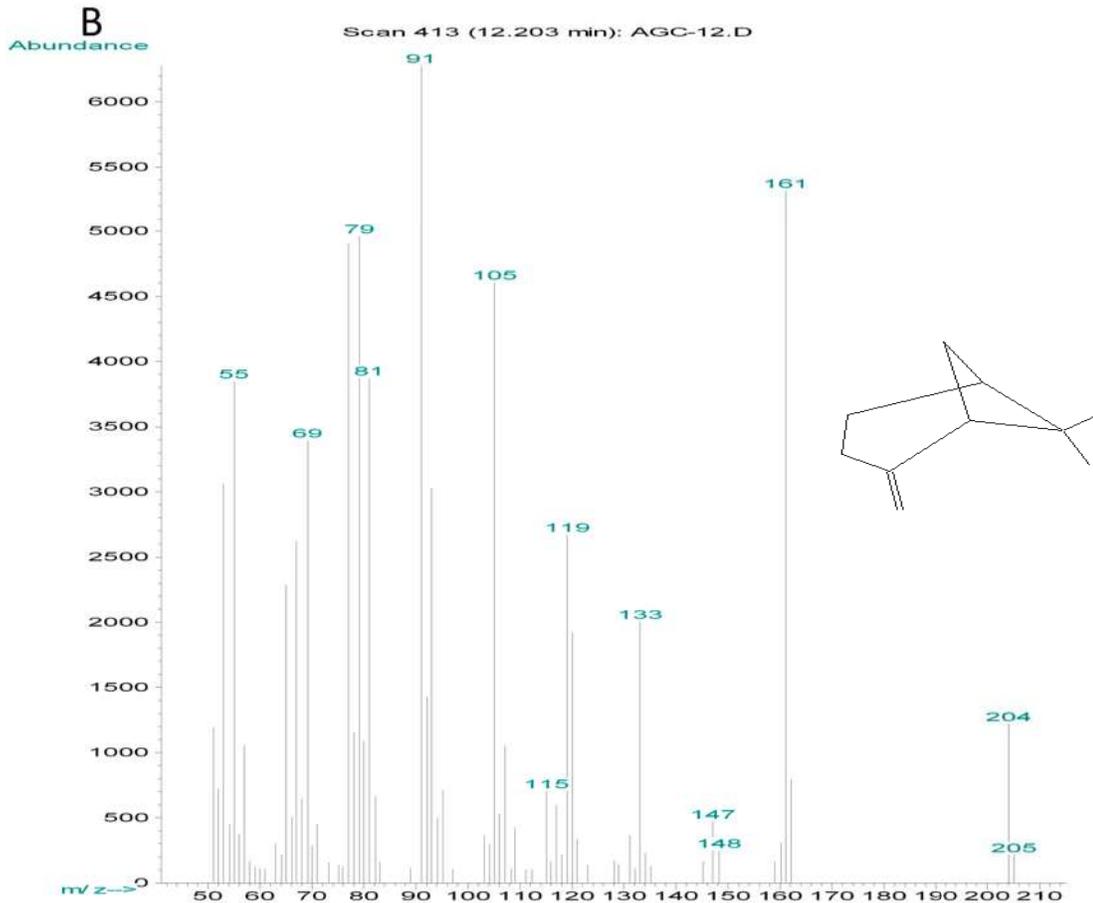
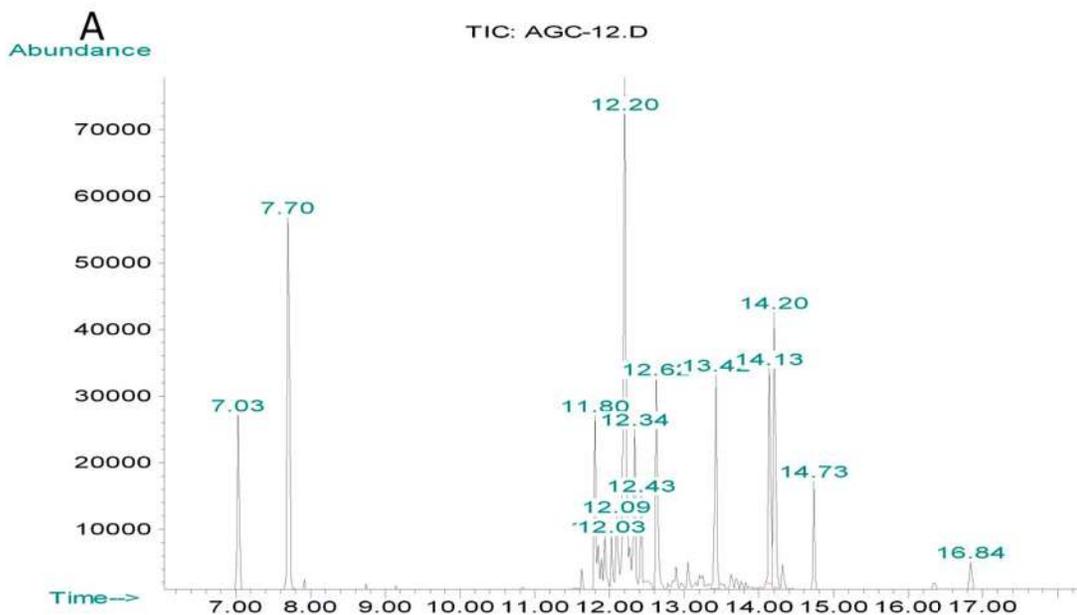
XI.5. Análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de extractos etanólicos de plantas de *E. carlinae* Delar F. en distintos estados de desarrollo.



A. Cromatograma de gases del extracto etanólico de plantas de *E. carlinae* Delar F. (Hierba del sapo) de plantas antes de la floración; B. Espectro de masas del componente mayoritario (Germacrene D) de acuerdo a la biblioteca NIST 02 por medio del software HPChem Station.



A. Cromatograma de gases del extracto etanólico de plantas de *E. carlinae* Delar F. (Hierba del sapo) de plantas durante la floración; B. Espectro de masas del componente mayoritario (L- $\alpha$ -Pinoeno) de acuerdo a la biblioteca NIST 02 por medio del software HPChem Station.



A. Cromatograma de gases del extracto etanólico de plantas de *E. carlinae* Delar F. (Hierba del sapo) de plantas después de la floración; B. Espectro de masas del componente mayoritario (L- $\alpha$ -Pinoeno) de acuerdo a la biblioteca NIST 02 por medio del software HPChem Station.