

# Efectividad Biológica de Extractos de *Tagetes* spp sobre Bacterias Fitopatógenas



**Gabriel Rincón Enríquez**  
**Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar**  
**Miguel Ángel Serrato Cruz**  
**Joaquín Alejandro Qui Zapata**

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C (CIATEJ)  
Subsistema Nacional de Recursos Fitogenéticos (SINAREFI)  
Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS)





# **Efectividad Biológica de Extractos de *Tagetes* spp sobre Bacterias Fitopatógenas**

**Gabriel Rincón Enríquez  
Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar  
Miguel Ángel Serrato Cruz  
Joaquín Alejandro Qui Zapata**



# **Efectividad Biológica de Extractos de *Tagetes* spp. sobre Bacterias Fitopatógenas.**

**ISBN: *en trámite***

Cita correcta:

Rincón-Enríquez G., E. E. Quiñones-Aguilar, J. A. Qui-Zapata y M. A. Serrato-Cruz. 2012. **Efectividad biológica de extractos de *Tagetes* spp sobre bacterias fitopatógenas.** SNICS-SINAREFI, CIATEJ, México.

*Fotografía en portada: Flores de Tagetes lucida (pericón). Fotografía M.A. Serrato C.*

# CONTENIDO

	Página
<i>Prologo</i>	
<i>Resumen</i>	9
<b>1. INTRODUCCION</b>	10
1.1. Diversidad biológica del genero <i>Tagetes</i> en México	11
1.2. Uso del fitorecurso del genero <i>Tagetes</i>	15
1.3. Elaboración de bio-plagicidas a base de extractos de <i>Tagetes</i>	24
1.4. Problemas fitosanitarios provocados por bacterias en plantas	25
1.5. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> y <i>Dikeya dadantii</i> (= <i>Erwinia chrysanthemi</i> )	26
<b>2. OBJETIVO</b>	28
<b>3. MATERIALES Y METODOS</b>	28
3.1. Material biológico	28
3.2. Diseño experimental y variable de respuesta	29
3.3. Análisis estadísticos	30
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSION</b>	31
4.1. Extractos de <i>Tagetes</i> : aceite esencial y fase acuosa	31
4.2. Efecto <i>in vitro</i> de aceite de extractos de <i>Tagetes</i> en el crecimiento de <i>D. dadantii</i> y <i>P. syringae</i>	34
<b>5. CONCLUSIONES</b>	40
<b>6. AGRADECIMIENTOS</b>	40
<b>7. PERSPECTIVAS</b>	40
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	40



## ***Prologo***

Las bacterias responsables de enfermedades en cultivos agrícolas causan pérdidas económicas y productivas significativas, por ejemplo el tizón de halo en frijol provocado por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* y la pudrición blanda inducida por *Dikeya dadantii* que afecta a cultivos como nardo, agaves, lechuga, etc. La resistencia que han adquirido estas bacterias hacia los agroquímicos sintéticos de constante uso ha provocado la necesidad de la búsqueda de otras opciones de convivir con estos microorganismos. Una opción de estas nuevas medidas es el control biológico mediante el uso de extractos vegetales. Específicamente el género *Tagetes* tiene propiedades que han sido mostradas con un gran potencial para tratar problemas contra insectos, nematodos, bacterias, etc. México es centro de origen y distribución de *Tagetes* por lo cual resulta imprescindible el estudio básico y aplicado de este recurso fitogenético que podría traer beneficios a agricultores y consumidores.



# Efectividad Biológica de Extractos de *Tagetes* spp. sobre Bacterias Fitopatógenas

## Resumen

La problemática de enfermedades en plantas se ha incrementado en las últimas décadas. Consecuencia directa de esta problemática ha desencadenado una serie de aspectos relacionados con la contaminación de suelo, aire y agua, además del incremento de la resistencia en los microorganismos causantes de enfermedades vegetales a los compuestos químicos utilizados para su control. En particular, las bacterias causantes de enfermedades en plantas cada vez incrementan su tolerancia a antibióticos agrícolas y compuestos a base de cobre. Alerta a esta situación, los consumidores demandan cada vez más el uso de tecnologías menos agresivas contra el ambiente. En este sentido, el uso de extractos vegetales para tratar enfermedades de tipo bacteriano en plantas está cobrando cada vez mayor importancia. En especial, los extractos de cempoalxóchitl (*Tagetes* spp) han jugado un papel importante en la agricultura precolombina, por lo cual el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto biológico extractos de diferentes especies de *Tagetes* sobre *EDikeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi*) (Dd) y *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Psph) bajo condiciones *in vitro*. La preparación de los extractos se realizó hidroddestilación. Después de ensayos preliminares con aceite de con nueve especies de *Tagetes*, se realizó un experimento factorial 2x4x5 con los factores siguientes: especie bacteriana (2 niveles: Dd y Psph); aceite de especies de *Tagetes* (4 niveles: *T. heterocarpha*, *T. lemmonii*, *T. terniflora* y *T. coronopifolia*); concentraciones de aceite (5 niveles: 1, 25, 50, 75 y 100%); además de un testigo con antibiótico (cloranfenicol). En medio rico Luria Bertoni (LB)-agar se colocaron las cepas bacterianas, sobre la capa de las células bacterianas se pusieron gotas de 10 µL de los aceites esenciales, después de 24 h de crecimiento a 30°C se midió el diámetro de inhibición del crecimiento bacteriano. El análisis de varianza de los halos de inhibición mostró los siguientes resultados: Dd fue más sensible a los extractos de *Tagetes* ( $p \leq 0.05$ , Tukey); *T. heterocarpha* inhibió significativamente más el crecimiento bacteriano que las otras tres especies de *Tagetes* (Tukey,  $p \leq 0.05$ ); la concentración de 25% de aceite esencial mostro tener un efecto significativamente similar al de 50 y 75% (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Estos resultados sugieren que los aceites esenciales de *T. heterocarpha* podrían emplearse como un bioinsumo para el tratamiento de enfermedades bacterianas de importancia agrícola.

## 1. INTRODUCCIÓN

En agricultura orgánica, las plantas de cempoalxóchitl se pueden utilizar en las más variadas formas. A partir de *T. erecta* y *T. patula* se extrae abono orgánico para la tierra de cultivo, no sólo para mejorar la calidad del suelo, sino también para controlar nemátodos en cultivos de piña, fresa, papa, gladiola, etc; en general, en áreas hortícolas y florícolas afectadas por ese tipo de plagas. También se pueden aplicar extractos acuosos y polvos de diferentes partes de la planta (raíces, tallos y hojas, inflorescencias ó toda la planta) para repeler o matar insectos, es decir como nematicida o nematostático; para cultivos en pie o para granos almacenados. La planta presenta piretrinas y tiofenos que son las sustancias vegetales responsables de los efectos contra insectos y gusanos, respectivamente (Serrato-Cruz, 2004). La rotación de maíz con cempoalxóchitl (*T. erecta*) en tierras templadas con antecedentes de plagas en el suelo, como la gallina ciega, abate drásticamente las poblaciones de este insecto, lo cual es una alternativa importante para las áreas maiceras con similares condiciones ambientales. En otros casos, la rotación de cultivos con *Tagetes spp* ó tan sólo su intercalación, constituye estrategias efectivas para controlar nemátodos. En asociación con otros cultivos, como el melón, funciona como barrera para atraer insectos por el colorido de las flores. *T. lunulata* y *T. patula* han tenido efectos fungicidas y bactericidas, mediante la aplicación directa de extractos acuosos a cultivos agrícolas (Chi *et al.*, 2002). En el caso de asociación de cultivos, Gómez-Rodríguez *et al.* (2007) mostraron que el cultivo de jitomate asociado con *T. erecta* fue mas benéfico en características agronómicas (tasa fotosintética, cantidad de flores y frutos, etc.) que el monocultivo o la asociación con amaranto (*Amaranthus hypochondracus*). A pesar de existir conocimiento empírico en el uso de las plantas del genero *Tagetes* como nematicida y larvicida, no se ha aplicado conocimiento científico en el desarrollo productos con valor agregado, como biopesticidas, en especial como biobactericida, por lo cual en este trabajo se presentan las primeras evidencias del efecto que tienen los extractos acuosos y aceites esenciales sobre algunas bacterias fitopatógenas de importancia agrícola.

### 1.1. Diversidad biológica del genero *Tagetes* en México

De un total de 170 países sólo 12 albergan entre un 60 y 70% de la biodiversidad mundial, estos países han sido llamados mega diversos (Neyra y Durand, 1998). México es parte de este grupo de países con un número aproximado de 26000 especies vegetales, ubicándose en cuarto lugar después de Brasil, Colombia y China (Mittermeier y Goettsch, 1992).

Las crónicas y documentos que datan de los primeros años de la conquista indican que en esa época ya se habían domesticado plantas de gran importancia alimenticia para el mundo: maíz (*Zea mays*), frijón común (*Phaseolus vulgaris*), calabaza (*Cucurbita spp*), camote (*Ipomea batatas*), chiles (*Capsicum spp*), cacao (*Theobroma cacao*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), cacahuete (*Arachis hypogea*), vainilla (*Vanilla planifolia*) y amaranto (*Amaranthus spp*). Debido a esto, México es considerado uno de los centros de domesticación de plantas más importantes del mundo. Se estima que más de 118 especies de plantas, pertenecientes a 70 géneros y 39 familias, han sido domesticadas en México (Hernández-Xolocotzi, 1993) con diferentes usos: alimenticio, ornamental, medicinal, textil, condimentos, colorantes, utensilios, bebidas estimulantes, cercas vivas, plantas huésped ó con fines suntuarios. Estos recursos biológicos son comúnmente llamados recursos fitogenéticos. A la fecha, las especies de origen mexicano de interés antropocéntrico registradas en las estadísticas agrícolas nacionales son 50, de las cuales 24 corresponden a cultivos anuales y 26 a plantas perennes. Este grupo de por sí amplio, no incluye numerosas especies con valor de uso en las comunidades rurales. Las especies anuales cultivadas, de origen mexicano más importantes son: maíz, frijón, chile, calabacita, algodón (*Gossypium sp*). Especies de menor significado económico, pero de gran valor en la alimentación nacional, son: amaranto (*Amaranthus spp*), chíca (*Salvia hispanica*), chilacayote (*Cucurbita spp*), epazote (*Dysphania ambrosioides*), guaje (*Leucaena spp*), huazontle (*Chenopodium spp*), pápalo (*Porophyllum ruderale*), quelite (*Chenopodium spp*) y verdolaga (*Portulaca oleracea*). Respecto de las especies perennes también de origen mexicano destacan de manera especial tanto el aguacate Hass (*Persea americana*) como el agave tequilero (*Agave tequilana*). Otros cultivos de gran importancia económica son: agave mezcalero (*Agave spp*),

chayote (*Sechium edule*), nopalitos (*Opuntia* sp) y papaya (*Papaya carica*). Sin embargo, aún existen otros recursos fitogenéticos de origen mexicano poco cultivados y con un enorme potencial para el desarrollo de diferentes productos y servicios como son el nanche (*Byrsonima crassifolia*), la pitahaya (*Hylocerus undatus*), la pitaya (*Stenocerus* spp), la ciruela mexicana (*Spondias* sp), el acullo o hierba santa (*Piper auratum*), el linolue (*Bursera linanoe*), el tejocote (*Crataegus* sp) y el cempoalxóchitl (*Tagetes* spp); entre otras.

Durante el año 2003 el cempoalxóchitl (*Tagetes erecta* L.) fue cultivado para uso suitario, en una superficie de 2000 hectáreas, con una producción de 22243 ton y un valor económico de 38'586,000 pesos; principalmente en los estados de Guerrero, Oaxaca, Puebla y Sinaloa. Sin embargo, los usos potenciales de las plantas de *Tagetes* spp son numerosos: antioxidante en células humanas, pigmento de alimentos, saborizante, perfumería, resina, ornamental, alteración genética con fines de control de malezas, insecticida, nematicida, larvicida, atrayente ó repelente de insectos, abono verde y medicinal (Serrato-Cruz, 2004).

Las plantas del genero *Tagetes* son herbácea anual o perennes, erecta y muy aromáticas, de tallos estriados y hojas pinadas (Figura 1), cuya flor es una cabezuela solitaria conocida como capítulo, inflorescencia que a su vez contiene numerosas flores individuales de los tipos tubulares o ligulares (Figura 2) (Serrato-Cruz, 2006). Las inflorescencias pueden presentar diferente morfología: tipo pompón ó doble (todas la flores individuales liguladas); tipo sencillo ó margarita (una hilera de flores liguladas en la periferia del capítulo o zona radial y numerosas flores individuales tubuladas en el disco floral o zona central) (Chi *et al.*, 2002; Serrato-Cruz, 2006); tipo semidoble (varias hileras de flores liguladas en la zona radial del capítulo y flores de tipo tubular en el disco floral); apétala (sin flores liguladas, solamente flores individuales tubulares) (Gupta *et al.*, 1999; Serrato-Cruz, 2006).



Figura 1. Características generales de plantas de especies del genero *Tagetes*. Detalles de flores, hojas y tallos. (A) *T. remotiflora*; (B) *T. foetidissima*.



Figura 2. Diversidad en las flores de distintas especies del genero *Tagetes*. (A) *T. lucida*; (B) *T. micrantha*; (C) *T. remotifolia*; (D) *T. terniflora*.

El género *Tagetes* (Tageteae; Asteraceae) se compone de alrededor de 55 especies distribuidas principalmente en el continente americano, la mayoría de las cuáles se localizan en México (Turner y Nesom, 1993). La distribución en México de las distintas especies se presenta en la Figura 3.



Figura 3. Distribución geográfica de distintas especies de *Tagetes* en la república mexicana (Serrato-Cruz, 2010).

Las especies relacionadas con la diversidad de campoalxóchitl son: *Tagetes erecta*, *T. lunulata*, *T. patula* y *T. tenuifolia*. La especie más popular es *T. erecta* por sus inflorescencias grandes amarillas o anaranjadas, que son las utilizadas con fines suntuarios en la ceremonia de día de muertos; festividad tradicional mexicana, reconocida a nivel mundial. La especie *T. patula* (clemole ó tlemole) tiene menor popularidad, pero también está asociada con dicha festividad. Esta planta se caracteriza por sus tallos rojizos y por el tamaño medio en el acomodo de sus inflorescencias, sus colores comprenden diferentes tonalidades de amarillo, anaranjado y rojo ó combinaciones de rojo y amarillo. Puede presentar flores individuales liguladas, tubulares, tubiliguladas y combinaciones de éstas; cuando tiene flores liguladas, su número es de ocho en la periferia del disco floral. Las inflorescencias de *T. lunulata* y de *T. tenuifolia* tienen un menor tamaño, con una sola hilera de flores liguladas en la parte externa del disco floral. La diferencia

entre ellas radica en la presencia de una mancha roja en la base de la lígula, esta mancha corresponde a *T. lunulata* cuyo nombre vulgar es “cinco llagas” (Serrato Cruz, 2004).

### 1.2. Uso del fitorecurso del genero *Tagetes*

El género *Tagetes* muestra amplia diversidad fenotípica en características florales, las cuales por ahora solo se aprovechan desde el punto de vista ornamental, sobre todo en la festividad de día de muertos en mes de noviembre. Como planta de ornato, la venta de cempoalxóchitl en maceta ó la venta de semilla tanto de *T. erecta* como *T. patula* de porte bajo para jardín ó maceta, es cada vez más frecuente en mercados y centros comerciales, lo cual es un excelente indicador del uso potencial de este recurso fitogenético, fuera de la temporada usual de día de muertos. Sin embargo existen otros usos que se dan a este fitorecurso, entre ellos se encuentran los siguientes:

#### **Medicinal: antioxidante.**

Desde la época prehispánica se han utilizando las plantas de cempoalxóchitl como medicina; las comunidades indígenas y mestizas siguen empleándolas de manera extensa para atacar los más variados padecimientos. Sin embargo, son pocas las evidencias científicas de la efectividad de tales tratamientos tradicionales (Serrato-Cruz, 2004). Se tiene información empírica de que *T. tenuifolia* controla enfermedades respiratorias de origen bacteriano; los aceites de *T. patula* y de *T. erecta* son efectivos contra infecciones dermatomucosas causadas por hongos y las soluciones acuosas de inflorescencias secas de *T. erecta* se han empleado para atender algunos tipos de úlceras en los ojos. Sin duda, el conocimiento fundamental de especies de *Tagetes* puede develar otras propiedades medicinales ó por lo menos, validar de forma sistemática los usos medicinales conocidos de antaño (Serrato-Cruz, 2004).

La presencia de carotenoides en plantas de *Tagetes* spp ha sido el principal factor al que se le ha atribuido diversas funciones biológicas importantes. Al respecto, en algunos estudios se reporta a los carotenoides como capaces de inhibir el crecimiento de células cancerosas de colon una vez que fueron tratadas con cantaxantina, en las cuales este compuesto indujo apoptosis (Bertram, 1999). También se ha observado menor incidencia de cáncer de colon en pacientes que



**Industrial: producción de carotenoides (luteína y zeaxantina).**

La producción de carotenoides, compuestos que origina el color amarillo o anaranjado de las flores, ha sido el objeto de investigación de las empresas Bioquimex (<http://www.bioquimexnutrition.com/>) y PIVEG (<http://www.piveg.com>) con el fin de optimizar la producción de estos pigmentos dentro de la especie *T. erecta* para su uso tanto en colorantes vegetales de alimentos para humanos (huevos con yema amarilla, coloración de sopas de pasta, piel y grasa amarilla de aves y reses), como en la elaboración de suplementos y medicamentos humanos (cápsulas de luteína). Actualmente en el Centro de Investigación Científica de Yucatán y en el CINVESTAV-Irapuato (equipo del Dr. Herrera-Estrella), se han iniciado trabajos de investigación para dilucidar los mecanismos de regulación de la expresión o síntesis de carotenoides. De esta forma, lograr el control de su síntesis a escala industrial sin requerir de la materia prima obtenida en el campo, ni de la fase de su procesamiento industrial convencional, para la obtención de la harina de la flor (Serrato-Cruz, 2004). En este sentido, es importante remarcar que la síntesis química de carotenoides es compleja, produce una mezcla racémica de estero isómeros (*cis* y *trans*), algunos de los cuales, al no presentarse en la naturaleza, no tienen la actividad biológica adecuada y por lo tanto no son aceptados para consumo humano porque pueden provocar efectos adversos. Esta desventaja no se presentan en la producción de carotenoides en sistemas biológicos como microorganismos, células vegetales y plantas completas, en los cuales se producen sólo los estero isómeros naturales (Ausich, 1997). En esta línea de investigación, aún están pendientes aspectos moleculares que permitan establecer los genes implicados en la ruta biosintética de los carotenoides y en su regulación genética.

Finalmente un equipo de investigadores del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI) del Instituto Politécnico Nacional, ubicado en Yautepec Morelos, trabaja en la producción de astaxantina, carotenoide con gran capacidad antioxidante el cual aporta el color rojo característico al salmón, trucha y camarón. Este compuesto es producido también por un gen aislado a partir del alga *Agrobacterium auriantiacum*. La Dra. Villar-Martínez trabaja en la inserción de este gen en el genoma del cempoalxóchitl, mediante ingeniería genética, con el fin de producir la primera planta transgénica de cempoalxóchitl con fines de producción industrial de astaxantina, la cual frente a la luteína posee mayor valor

agregado, debido a que presenta mayor capacidad pigmentante (Villar-Martínez, 2005). El motivo de utilizar al cempoalxóchitl como una fábrica de astaxantina es debido a que la planta acumula en forma natural gran cantidad de luteína en sus flores (Villar-Martínez, 2005).

### Horticultura Ornamental

Desde el año 2001, en México no se produce cempoalxóchitl (*T. erecta*) con propósito agroindustrial (Figura 5A). Las empresas mexicanas que tradicionalmente impulsaban la producción, ahora han trasladado sus inversiones a Perú y Asia, aunque siguen trabajando la fase industrial en territorio mexicano (Serrato-Cruz, 2004). Por lo cual en Figura 5B es evidente que el valor de la producción inicia una rápida disminución a partir del año 2003. Esto implica un reto de diversificar los productos del cultivo del cempoalxóchitl con fines de horticultura ornamental.

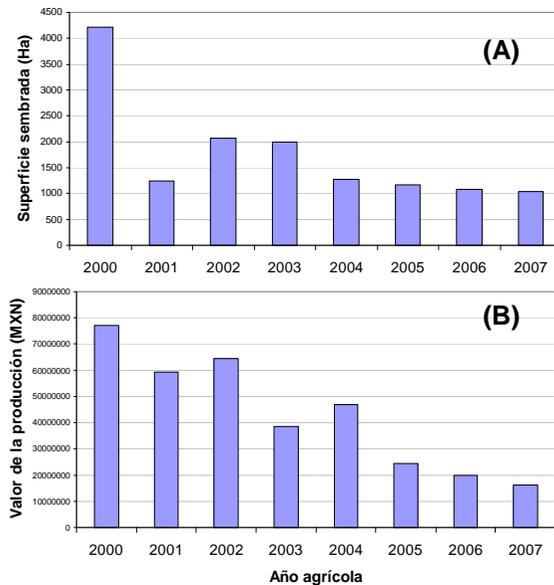


Figura 5. Importancia económica de la producción de cempoalxóchitl (*T. erecta*) en la republica mexicana. (A) Superficie sembrada de cempoalxóchitl; (B) Valor de la producción de cempoalxóchitl.

La diversidad observada en variedades locales regionales es grande, tanto en color de las flores como en el porte de la planta. Por ejemplo, con respecto a la diversidad de formas y colores de inflorescencias en *T. patula* existen especímenes diversos en comunidades del altiplano central, de Oaxaca y de la Sierra Madre Oriental. De *T. erecta* destacan las inflorescencias de gran tamaño que se producen en los valles de México y de Oaxaca, Valles de Cuautla-Cuernavaca, Valle de Huejotzingo, Valle de Teotihuacán y la Región del Bajío. Plantas con múltiples inflorescencias, hasta 120, pero de tamaño pequeño se localizan en la región de la Huasteca y en la región de Chatina, Oaxaca. En las Huastecas se pueden observar coloraciones de inflorescencias amarillo pálido, casi blanco; mientras que las flores con colores anaranjados intensos pueden encontrarse en el Bajío, en Xochimilco estado de México y en Pátzcuaro, Michoacán; entre otros lugares (Serrato-Cruz, 2004).

En cuanto a la intensidad del color de la flor, los tonos más intensos del color anaranjado de las inflorescencias de *T. erecta* están relacionados con un mayor contenido de carotenoides, su gran diversidad de tonalidades potencializa el aprovechamiento que se puede hacer de este pigmento. El germoplasma nativo de México, utilizado principalmente en la fiesta de “Día de Muertos” cuenta con una amplia gama de tonos anaranjados, enriqueciendo las opciones para adornar las ofrendas. También se tiene clasificado el germoplasma por el número de inflorescencias por planta, el gran tamaño de los acomodos de las flores, porte intermedio, así como la presencia de plantas de inflorescencias dobles e intermedias que pueden utilizarse para producir plantas similares. Tales características hacen de la *T. erecta* un elemento muy útil porque de éste se puede obtener un elevado rendimiento de pigmentos. Debido a que las plantas más sencillas, con pocas flores liguladas, brindan una baja cantidad de pigmento, éstas son poco cotizadas y por esa razón actualmente se realizan estudios para identificar plantas “tipo doble” que predispongan la generación exclusiva de descendencias con inflorescencias dobles; aunque todavía no se han obtenido publicaciones es conocido que en el extranjero sí se han producido híbridos dobles (Serrato-Cruz, 2004). La diversidad biológica de estas especies es muy conveniente para su aprovechamiento ornamental; hoy en día es posible tener plantas cuyo tamaño va de 40 hasta 180 cm; con formas de crecimiento globular o ramificada; con distintos periodos de floración (precoz, intermedia o tardía); el número de inflorescencias

por planta puede ir de 20 a 120 y el tamaño de inflorescencia de 4 a 16 cm; así como diversos aspectos y coloraciones de la inflorescencia que resultan de las muy variadas formas de las flores individuales, de sus tonos y combinaciones de color (Serrato-Cruz, 2004). La rica diversidad de características florales se encuentra en plantas de porte alto (de 1 a 1.5 m) pero este último es un inconveniente para llevarlo a maceta o jardín; de ahí la necesidad de aprovechar las plantas con porte bajo mediante estrategias de hibridación y selección para fijar ese carácter. En experimentos conducidos en la UACh se ha logrado reducir el porte de *T. erecta* hasta 50 cm, así como generar novedades de *T. patula* súper enanas de 30 cm, a partir de germoplasma nativo. En la actualidad, se maneja material autóctono de lígulas en forma de trompeta, con el propósito de obtener inflorescencias tipo pompón, como el crisantemo. La forma de “lígulas de trompeta” es un carácter interesante, ya que puede comportarse como dominante o como recesivo, según los progenitores que se utilicen (Serrato-Cruz, 2004).

El uso de plantas de cempoalxóchitl (*Tagetes erecta* L.) para jardinería y maceta es cada vez más aceptado en México. La venta de esta planta en maceta durante la festividad de “Día de Muertos” se ha incrementado desde el 2000 con un consumo de 10 000 plantas, aumentando a 500 000 en el 2004, y se estimó un volumen de venta de 700 000 para 2005. En 15 años el consumo nacional de esta especie para maceta alcanzará los 4 millones de plantas y su empleo fuera de esta festividad cada vez será mayor (Empresa Plántulas de Tetela, Cuernavaca, Morelos; comunicación personal con el Dr. Serrato-Cruz, 2005). Empresas semilleras como Sakata, Seedes, Ball Seedes, Goldschmith Seedes entre otras, cubren actualmente el abasto de semillas para este fin, mediante importaciones que solicitan viveristas y floricultores (Serrato-Cruz, 2005).

Por los puntos expuestos, la venta de cempoalxóchitl en maceta ó de semilla tanto de *T. erecta* como *T. patula*, será cada vez más frecuente en los mercados populares y en centros comerciales, lo cual es un excelente indicador del uso potencial de este recurso genético más allá suntuario tradicional, en la festividad del “Día de Muertos”. Por ahora, paradójicamente, el origen de estos productos es extranjero (Serrato-Cruz, 2004).

En Europa durante la primavera en lugares públicos como jardines, avenidas y edificios, es común observar flores del género *Tagetes* spp. La diversidad observada en estos lugares, respecto de colores y formas de la

inflorescencia, es baja. Por lo cual, la introducción de nuevas variedades de este género en color, porte y forma, abren un importante nicho en el mercado europeo. En este sentido, el equipo de Serrato-Cruz de la UACH trabaja material de origen mexicano que posee lígulas en forma de trompeta, con el propósito de obtener inflorescencias tipo pompón como el crisantemo, las que podrían ser exitosas en el mercado europeo. A pesar de esto, aún queda pendiente una evaluación más completa de la diversidad genética en las especies mexicanas del género *Tagetes*, para buscar genotipos apropiados a las demandas específicas del mercado de la jardinería, con énfasis en la arquitectura de paisaje.

Las especies de *Tagetes* presentan una gran variabilidad que no se ha estudiado de forma cabal, se distribuyen en los lugares más diversos de la geografía de México, aspecto que tampoco se ha estudiado suficientemente. Las perspectivas que ofrecen las plantas de cempoalxóchitl para México son amplias y exigen el estudio de la diversidad de este recurso mediante colecta de materiales y caracterización de germoplasma, herencia de características determinadas, mejoramiento genético y evaluaciones agronómicas, tareas que ya se están realizando para el corto y mediano plazo y que reeditarán no sólo en un mayor conocimiento de la biodiversidad mexicana de este recurso fitogenético, sino también en el mejor aprovechamiento (Serrato-Cruz, 2004).

A manera de conclusión se puede afirmar que el cempoalxóchitl (*Tagetes* spp.) es un recurso fitogenético con un enorme potencial para desarrollar nuevos productos en las áreas de medicina, floricultura, ecología e industria. Respecto de los conocimientos actuales,- comentados anteriormente-, sobre los diferentes usos potenciales de *Tagetes* spp sería interesante amplificar y desarrollar los siguientes conocimientos y productos, respectivamente.

***Agricultura orgánica: bioinsecticida, biofertilizante, fitorremediador.***

En agricultura orgánica, las plantas de cempoalxóchitl pueden utilizarse en las más variadas formas (Serrato, 1999). A partir de *T. erecta* y *T. patula* se extrae abono orgánico para la tierra de cultivo, no sólo para mejorar la calidad del suelo, sino también para controlar nemátodos en cultivos de piña, fresa, papa, gladiola; en general, en áreas hortícolas y florícolas afectadas por ese tipo de plaga. También se pueden aplicar extractos acuosos y polvos de diferentes partes de la planta (raíces, tallos y hojas, inflorescencias o toda la planta) para repeler o matar insectos y como nematocida o nematostático, según el caso, para cultivos en pie o para granos

almacenados. La planta presenta piretrinas (como se mencionó anteriormente) y tiofenos (Jacobs *et al.*, 1995) que son las sustancias vegetales responsables de los efectos contra insectos y gusanos, respectivamente (Serrato-Cruz, 2004). La rotación de maíz con cempoalxóchitl (*T. erecta*) en tierras templadas con antecedentes de plagas en el suelo, como la gallina ciega, abate drásticamente las poblaciones de este insecto, lo cual es una alternativa importante para las áreas maiceras con similares condiciones ambientales. En otros casos, la rotación de cultivos con *Tagetes* spp. ó tan sólo su intercalación, constituyen estrategias efectivas para controlar nemátodos. En asociación con otros cultivos, como el melón, funciona como barrera para atraer insectos por el colorido de las flores. *T. lunulata* y *T. patula* han tenido efectos fungicidas y bactericidas, mediante la aplicación directa de extractos acuosos a cultivos agrícolas (Chi *et al.*, 2002). En el caso de asociación de cultivos, Gómez-Rodríguez *et al.* (2007) mostraron que el cultivo de jitomate asociado con *T. erecta* fue más benéfico en características agronómicas (tasa fotosintética, cantidad de flores y frutos, etc.) que el monocultivo ó la asociación con amaranto (*Amaranthus hypochondracus*). Finalmente, diferentes especies de *Tagetes* han sido utilizadas con éxito como plantas fitorremediadoras de lugares contaminados con arsénico (Chintakovid *et al.*, 2008) ó cadmio (Lal *et al.*, 2008).

**Biocida: insecticidas, nematocida, larvicida, antimicrobial.**

Por el alto contenido de vitaminas que contiene *T. lunulata* se puede emplear como saborizante (Serrato y Quijano, 1993). En México existen varios tipos morfológicos según el hábitat. El aroma se relaciona con características climáticas y altitudinales, se ha encontrado que en esta especie puede ser limonado, anisado o francamente repulsivo al olfato. Hay aromas asociados, en conjunto, a características distintivas de la inflorescencia, presencia de pubescencia, forma y tamaño de la hoja (Serrato-Cruz, 2004). En el campo experimental de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) el equipo de Serrato-Cruz está reproduciendo estos morfoecotipos y se ha iniciado su caracterización química y agronómica. *Tagetes tenuifolia* por su aroma dulce anisado distinto al de *T. lunulata*, pueden resultar de interés no sólo como saborizante, sino como repelente (o atrayente) de insectos. En otras especies del género *Tagetes* como *T. filifolia*, cuyos aceites esenciales (Serrato y Quijano, 1993) presentan aroma anisado, se han mostrado indicios de repelencia a la mosquita blanca, insecto vector de virus que

puede causar daños severos a los cultivos y enormes pérdidas económicas. El equipo del Dr. Serrato-Cruz, en colaboración con otros investigadores, trabajan sobre extracción y caracterización de aceites esenciales de *T. lunulata*, *T. tenuifolia*, *T. lucida*, *T. foetidissima* y *T. filifolia*, así como en bioensayos para la repelencia a mosquita blanca (Serrato-Cruz, 2004). En otro estudio, Dharmagadda *et al.* (2005) mostraron que aceites esenciales de *T. patula* afectaron negativamente el desarrollo de tres especies de larvas de mosquitos (*Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* y *Culex quinquefasciatus*). Extractos de esta misma especie en etanol fueron probados sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos (*Botrytis cinerea*, *Fusarium moniliforme* y *Pythium ultimum*) los resultados mostraron una inhibición de su crecimiento bajo condiciones de alta luminosidad (Mares *et al.*, 2004). Respecto al control de insectos Sarin (2004) mostró que los callos *in vitro* de *T. erecta* presentan el insecticida piretrina, el cual fue aislado y probado sobre insectos (*Tribolium spp*). Los resultados mostraron que la piretrina después de estar en contacto con los insectos por una hora, tuvo una eficiencia de 100% sobre el control de éstos. En cuanto al control de bacterias patógenas humanas Tereschuk *et al.* (2003) estudiaron la inhibición del crecimiento de colonias de bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*) y Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) provocadas por extractos de *T. terniflora*. Los resultados de esta investigación mostraron una inhibición del crecimiento de estas bacterias comparables a las provocadas por el antibiótico testigo (cloranfenicol).

A pesar de las investigaciones realizadas, aún falta determinar los mecanismos mediante los cuales las sustancias liberadas por la planta inhiben el desarrollo de insectos plagas, microorganismos patógenos humanos, fitopatógenos; así como los detalles respecto de su papel como plantas remediadoras de metales pesados. También será interesante desarrollar variedades de distintas especies de *Tagetes* para utilizarlas como agentes de control biológico, las cuales deberán tener el requisito de optimizar al máximo la superficie de cultivo y asegurar con un mínimo de plantas la protección efectiva contra nematodos o larvas de insectos plaga del suelo.

### 1.3. Elaboración de bioplagicidas a base de extractos de *Tagetes*

La Ley de Producción Orgánica define a ésta como un sistema de producción y procesamiento de alimentos, productos y subproductos animales, vegetales u otros satisfactores, con un uso regulado de insumos externos, restringiendo y en su caso prohibiendo la utilización de productos de síntesis química (DOF, 2006).

A pesar de que en México los productos agrícolas provenientes de un proceso de producción orgánica, en su mayor parte (85%) dependientes de insumos procedentes del mercado exterior y de que tan sólo un 15% son consumidos en el ámbito nacional, la tendencia en su demanda es a la alza en el mediano plazo, tanto en el los ámbitos nacional como en el internacional. Dicha producción es realizada por pequeños productores constituidos en cooperativas rurales o agro empresas medianas. El proceso de producción agrícola orgánica requiere insumos con características particulares, una de las esenciales es no provenir de síntesis química, lo que permite su inocuidad al incorporarse al ciclo biológico de los agroecosistemas, además de implicar un bajo costo energético durante su producción.

La condicionante de exención de síntesis química, impone la necesidad de desarrollar insumos especiales para el aporte adicional de nutrientes a los cultivos, el control de malezas, de plagas y enfermedades. La producción agrícola orgánica también demanda costo energéticos bajos durante el procesamiento poscosecha y la puesta en mercado de los productos con este atributo. Es así como recientemente han surgido empresas productoras de insumos para la agricultura orgánica, cuyo propósito es satisfacer puntualmente estas necesidades, produciendo biofertilizantes, bioinsecticidas, biofungicidas; en una palabra bioinsumos. Además de los bioinsumos, las prácticas culturales son otra condicionante para la agricultura orgánica.

A pesar de esto, la diversidad de bioinsumos es limitada. Respecto de las enfermedades, la constante adaptación en resistencia de los organismos fitopatógenos hacia la acción de estos bioinsumos, hace necesario el permanente desarrollo de nuevos insumos con cualidades diferentes que les confieran efectividad.

Ante la importancia económica que en mercados internacionales tienen los productos orgánicos y sobre la base de que en México la disponibilidad de bioinsumos son bajas en el presente, se vislumbra la oportunidad de desarrollar insumos orientados a satisfacer esta específica y creciente demanda. El desarrollo de bioinsumos, además de cubrir una demanda existente, será un catalizador para el crecimiento de la agricultura orgánica, impactando positivamente al mismo tiempo, la derrama económica en el sector. En este marco se insertan los objetivos del presente estudio, uno de cuyos productos (extractos de especies de *Tagetes*) contribuirá, además, a la disminución de los impactos ambientales negativos ocasionados por las prácticas agrícolas convencionales, generadoras de niveles importantes de contaminación en recurso naturales tan valiosos como el agua y el suelo.

#### 1.4. Problemas fitosanitarios provocados por bacterias en plantas

Pocas son las plantas cultivadas que no son atacadas por enfermedades bacterianas; hay muchos cultivos como tomate y frijol, que sufren de cuatro, cinco o más bacteriosis. La mayoría de las especies de bacterias fitopatógenas tienen varios hospedantes, a veces en familias muy distantes taxonómicamente unas de otras; *Pseudomonas solanacearum* ataca a tomate, la papa, el tabaco, el maní, el jengibre y otros; *Erwinia carotovora* ataca a la cebolla, la zanahoria, la papa, el repollo y muchos más. Entre las enfermedades bacterianas se pueden encontrar tipos tan variados en sintomatología como entre las enfermedades fungosas. Hay cosos de podredumbres suaves debidas a la disolución de la lámina media de las paredes celulares (*Erwinia carotovora* en órganos carnosos); lesiones localizadas en hojas y frutos en que no se encuentran bacterias en el tejido normal alrededor de la lesión (*Xanthomonas malvacearum* en algodón); necrosis extensivas del follaje y el tallo en que las bacterias se encuentran dispersas en el tejido circunvecino a la lesión (*Xanthomonas oryzae* en arroz); marchitez debida a acumulación de sustancias, tanto de origen bacteriano como del tejido del hospedante en los conductos del xilema (*Pseudomonas solanacearum*); agallas debidas a estímulos celulares que resultan en hiperplasias e hipertrofias (*Agrobacterium tumefaciens*) (González, 1981).

En particular la producción de fríjol enfrenta varias enfermedades que no siempre tienen una sola causa, los síntomas que se observan en el campo son producidos por la interacción de condiciones climáticas, el manejo de cultivos, variedad utilizada, presencia de residuos de siembras anteriores, las cuales son reservorios de hongos fitopatógenos, entre los que sobresalen: *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium* y *Sclerotium*, enfermedades del follaje como son la antracnosis que es causada por el hongo *Colletotrichum lindemuthianum*, la mancha angular que es ocasionada por *Phaeoisariopsis griseola*, mustia hilachosa también conocida como telaraña provocada por el hongo *Thanatephorus cucumeris*, la falsa mancha angular cuyo agente causal es el nemátodo *Aphelenchoides besseyi*; la mancha de entyloma producida por el hongo *Entyloma petuniae*, la roya o herrumbre causada por el hongo *Uromyces phaseoli*, el tizón bacteriano común ocasionada por la bacteria *Xanthomonas campestris* y a su vez, enfermedades ocasionadas por virus como la del mosaico y amarillamiento, además de la enfermedad conocida como “Tizón del Halo” causada por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

#### 1.5. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* y *Dikeya dadantii* ( $\equiv$ *Erwinia chrysanthemi*).

*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* es el agente causal de la enfermedad conocida como “tizón del halo” en fríjol, la cual se caracteriza por el desarrollo de lesiones acuosas en el sitio de infección, rodeadas por un halo clorótico. El crecimiento de las lesiones es favorecido por temperaturas moderadamente frías, ambiente húmedo y presencia de heridas en la planta (Smith y Rubery, 1982). La toxina se produce entre los 18 y 20°C y es conocida como faseolotoxina (Peet y Panopoulos, 1987; Caballero-Mellado *et al.*, 2006). Franco *et al.* (2002) mencionan que la faseolotoxina es una toxina no selectiva capaz de inducir al menos una parte de los síntomas que causa el patógeno que la produce en la planta hospedante; por lo tanto, esta toxina está definida como un determinante secundario de la enfermedad o factor de virulencia (grado de patogenicidad); además de inducir clorosis, causando un halo amarillento y brillante que rodea el sitio de infección. La faseolotoxina tiene dos vías de acción para desarrollar el síntoma de tizón del halo: la primera, mediante la inducción de clorosis sistémica

(ausencia de clorofila) en hojas jóvenes en crecimiento, debido y la segunda, por la contribución al amarillamiento de hojas maduras debido a su estado fisiológico. En el Valle de México, se ha observado que esta enfermedad ataca principalmente a las variedades de frijoles azufrados y peruanos, siendo la primera enfermedad observada en los cultivos de temporal (Sains *et al.*, 2008).

El género *Erwinia* abarca un grupo heterogéneo de bacterias. Por conveniencia, este género se divide comúnmente en dos grupos: pudridores blandos y pudridores no blandos, *Erwinia* sp (*Dikeya* sp) causante de pudrición blanda, genera importantes enfermedades de plantas en macetas; los pudridores no blandos no provocan este problema. Son bacterias oportunistas de crecimiento rápido capaces de causar graves pérdidas en pocos días, no hay una fuerte evidencia de la especificidad del huésped (Daughtrey, 2000).

Este género produce principalmente celulasas, proteasas, nucleasas y lipasas reportadas por Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.* (1996) lo que le dan un carácter más virulento. *Erwinia chrysanthemi* (*Dikeya dadanti*) es un bacilomóvil, Gram-negativo, no productor de esporas, con extremos redondeados y que se reproduce solo o en parejas, varía de 0.8 a 3.2x0.5-0.8 micras (media de 1.8x0.6 µm). Tiene de 3-14 flagelos periticos, pero por lo general de 8-11. En medio Agar Dextrosa Papa (PDA), las colonias jóvenes son circulares, convexas y lisas o presentan bordes irregulares, en función del contenido de humedad del medio de cultivo. Después de 4-5 días, las colonias se asemejan aun huevo frito, con color rosado, redondas, centro elevado y periferia lobulada. Tiene una distribución mundial (EPPO, 2008).

Por ahora, paradójicamente, el origen de productos derivados de plantas del genero *Tagetes* es extranjero. Actualmente en la Universidad Autónoma Chapingo el equipo del Dr. Serrato-Cruz ha iniciado un programa de mejoramiento genético con el objetivo de obtener variedades enanas para ser utilizadas en macetas. Así el objetivo general de este proyecto fue evaluar los extractos de plantas de *Tagetes* spp contra bacterias *in vitro*, como una primera etapa para desarrollar productos para el control biológico de enfermedades en cultivos agrícolas.

## 2. OBJETIVO

Determinar la efectividad biológica *in vitro* de extracto acuoso y de aceite esencial de distintas especies de *Tagetes* en bacterias fitopatógenas.

## 4. MATERIALES Y METODOS

### 3.1. Material biológico

Cepas bacterianas y medio de cultivo: La cepas 1448A de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* y *P. syringae* pv. *glysine* se cultivaron en medio KB (Medio B de King's). La cepa de 3937 de *Dikeya dadantii* fue cultivada en medio LB (Luria Bertani) líquido y sólido. Ambas cepas se incubaron a una temperatura de 28°C en agitación cuando fue requerido a 200 rpm. Se utilizó como antibiótico para un control positivo a la inhibición bacteriana el cloranfenicol (50 µg mL<sup>-1</sup>) o ampicilina (100 µg mL<sup>-1</sup>). Los medios, materiales de vidrio y plástico fueron esterilizados en autoclave a 121°C por 15 minutos. Los medios KB se prepararon por L con los productos siguientes: peptona de carne (20 g), glicerol (10 mL), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anhidro) (1.5 g), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1.5 g) y se ajusto el pH a 7.2. Para el caso del LB: extracto de levadura (5 g), NaCl (10 g), triptona (10 g) y se ajusto el pH a 7.0. Para medio sólido se agrego agar (15 g L<sup>-1</sup>). Las pruebas de efectividad biológica de los extractos de *Tagetes* fueron realizados en la fase exponencial del crecimiento bacteriano.

Especies vegetales de *Tagetes*: La colecta del material vegetal de *Tagetes* spp se realizo en la etapa fenológica de floración en el mes de noviembre en San Marcos Jalisco y Chapingo México, evitando ser expuestos a los rayos del ultravioleta del sol y perdieran el aceite esencial que se extrae. Las distintas especies de *Tagetes* utilizadas en el estudio fueron: *T. heterocarpha*, *T. coronopifolia*, *T. terniflora*, *T. lemmonii*, *T. remotiflora*, *T. foetidissima*, *T. micranta*, *T. terniflora*, *T. stenophyla*. Las plantas de *Tagetes* spp fueron lavadas con jabón neutro y se enjuagaron con agua destilada. Las muestras se secaron a temperatura ambiente en un lugar seco y fresco, después se molieron y tamizaron con una malla de 3 mm, el material obteniendo se utilizó para la extracción de aceite y fase acuosa mediante la técnica de hidrodestilación.

Método de extracción de fase acuosa y de aceite de *Tagetes*: Se colocó cada una de las muestras de *Tagetes* spp en un equipo de destilación de 22 L. Se agregó agua destilada y material vegetal en una proporción de 4:1, una vez alcanzado el punto de ebullición, se sometió a recirculación continua por un tiempo de tres horas con el fin de extraer la mayor cantidad de aceite esencial (Figura 6). Cada extracto vegetal de aceite esencial se diluyó en Tween 20 a 2% a concentraciones de 75, 50, 25 y 1% con un volumen final de 1 mL y se homogenizaron las muestras en Vortex durante 30 segundos.

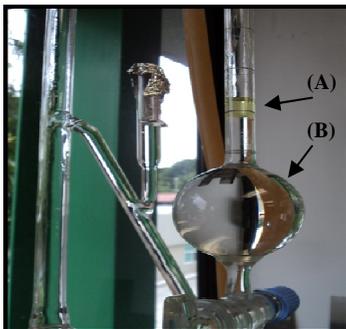


Figura 6. Obtención de aceite esencial mediante el método de hidrodestilación. (A) Aceite esencial y (B) fase acuosa.

### 3.2. Diseño experimental y variable de respuesta

Experimentos preliminares fueron realizados para seleccionar las especies de *Tagetes* que presentaron actividad antibacteriana, para este experimento sólo se cuantificó una variable de respuesta cualitativa dicotómica (positiva o negativa a la inhibición bacteriana). Posteriormente se realizó un experimento factorial, los factores y niveles de estudio fueron: especie bacteriana (dos niveles: *Pseudomonas* y *Dikeya*), especies de *Tagetes* (cuatro niveles: *T. heterocarpha*; *T. lemoni*; *T. terniflora*; *T. coronopifolia*) y concentración de aceite (cinco niveles: 1, 25, 50, 75 y 100%). Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Se realizaron 4 repeticiones de cada tratamiento. En este experimento se contó con un testigo negativo (Tween 20 al 2%) y uno positivo (antibiótico) a la inhibición bacteriana. La variable de respuesta evaluada fue el diámetro de inhibición de crecimiento

bacteriano. Dicha medida se realizó directamente sobre la caja petri mediante un vernier (Figura 7).



Figura 7. Esquema para cuantificar el diámetro de la inhibición del crecimiento bacteriano por efecto de los extractos de diferentes especies de *Tagetes* en medio sólido *in vitro*.

### 3.3. Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de varianza factorial de acuerdo al modelo matemático siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + AB_{ij} + AC_{ik} + BC_{jk} + ABC_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde:

$Y_{ijkl}$  = Valor de la ij-esima variable respuesta en la k-esima repetición

$\mu$  = Media general

$A_i$  = Efecto del i-esimo especie bacteriana

$B_j$  = Efecto de la j-esima especies de *Tagetes*

$C_k$ . = Efecto de la k-esima concentración de aceite

$AB_{ij}$  = Efecto que produce la interacción del i-esimo especie bacteriana con la j-esima especie de *Tagetes*.

- AC<sub>ik</sub> = Efecto que produce la interacción del i-esimo especie bacteriana con la k-esima concentración de aceite
- BC<sub>jk</sub> = Efecto que produce la interacción del j-esimo especie de *Tagetes* con la k-esima concentración de aceite
- ABC<sub>ijk</sub> = Efecto que produce la interacción del i-esimo especie bacteriana con la j-esima especie de *Tagetes* y la k-esima concentración de aceite
- E<sub>ijkl</sub> =Error experimental

Cuando la hipótesis nula del análisis de varianza fue rechazada a un  $p \leq 0.05$  se realizó un análisis de de comparación múltiple de median mediante el método Diferencia Minima Honesta de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Estos análisis estadísticos fueron realizados con el software estadístico Statgraphics.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1. Extractos de *Tagetes*: aceite esencial y fase acuosa

La cantidad de extractos obtenidos por especie de *Tagetes* son mostrados en el Cuadro1. En dicho cuadro es claro que el número de especies analizadas inicial fue de nueve, además se indica que tipo de extracto se obtuvo de cada especie.

Cuadro 1. Obtención de extractos de distintas especies de *Tagetes*.

Especie de <i>Tagetes</i>	Tipo de extracto	
	Acuoso	Aceite
<i>T. remotiflora</i>	✓	✓
<i>T. foetidissima</i>	✓	✓
<i>T. micranta</i>	✓	✓
<i>T. terniflora</i>	✓	X
<i>T. stenophyla</i>	✓	X
<i>T. heterocarpha</i>	✓	✓
<i>T. lemoni</i>	✓	✓
<i>T. terniflora</i>	✓	✓
<i>T. coronopifolia</i>	✓	✓

✓ = Extracto disponible      X= Extracto no disponible

Las pruebas de efectividad biológica de diferentes extractos fueron realizadas sobre *Dikeya dadantii* (Dd) y *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Psph) en medio rico (LB y KB). Los resultados del primer experimento para relacionar las especies de *Tagetes* con actividad antibacteriana son mostrados en el Cuadro 2. Este cuadro resulta evidente dos aspectos el primero es el poco efecto de los extractos acuosos en comparación con los extractos de aceite esencial, por otro lado la sensibilidad de una misma especie de bacteria que ataca a distintos cultivos. Así por ejemplo mientras Psph es sensible al extracto acuoso de *T. terniflora* (Figura 8). Mientras en los extractos de aceite *T. remotiflora* resulto tener una inhibición en las dos especies de bacterias probadas (Figura 9).

Cuadro 2. Pruebas de efectividad biológica *in vitro* de diferentes extractos acuosos y aceites de distintas especies de *Tagetes* sobre dos especies de bacterias fitopatógenas.

Especie de <i>Tagetes</i>	Tipo de extracto			
	Acuoso		Aceite	
	Dd	Psph	Dd	Psph
<i>T. remotiflora</i>	-	-	+	+
<i>T. foetidissima</i>	-	-	+	+
<i>T. micranta</i>	-	-	+	-
<i>T. terniflora</i>	-	+	S/E	S/E
<i>T. stenophylla</i>	-	-	S/E	S/E
<i>T. heterocarpha</i>	S/E	S/E	+	+
<i>T. lemoni</i>	S/E	S/E	+	+
<i>T. terniflora</i>	S/E	S/E	+	+
<i>T. coronopifolia</i>	S/E	S/E	+	+

+ = Inhibición del crecimiento bacteriano; - = No inhibición del crecimiento bacteriano; S/E = Extracto no disponible, Dd= *Dikeya dadantii*, Psph= *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

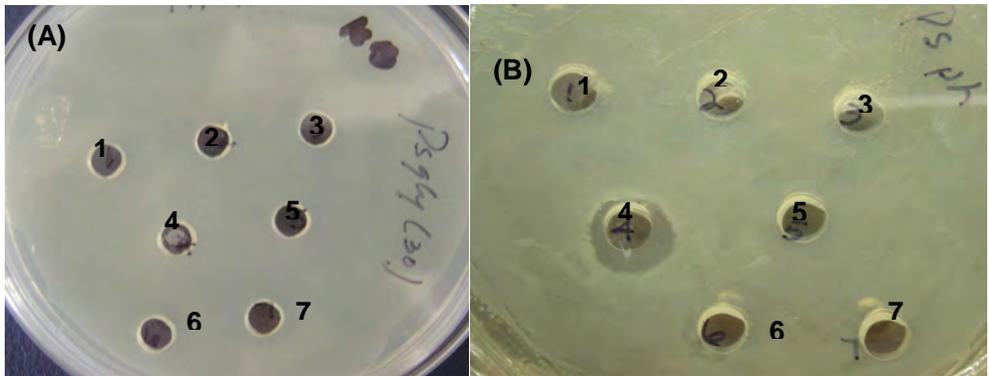


Figura 8. Prueba de efectividad biológica de extractos acuosos de *T. terniflora* sobre dos especies de *Pseudomonas*. (A) *P. syringae* pv. *phaseolicola*. (B) *P. syringae* pv. *glycine*. (1) *T. remotiflora*; (2) *T. foetidissima*; (3) *T. micranta*; (4) *T. terniflora*; (5) *T. stenophyla*; (6) Testigo positivo (agua) y (7) Testigo negativo (ampicilina).

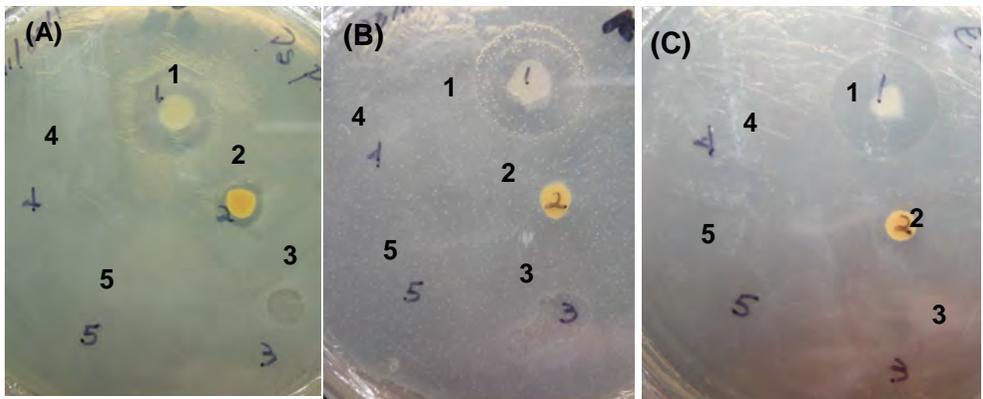


Figura 9. Prueba de efectividad biológica de extractos aceitosos de *T. remotiflora* (1) sobre distintas especies bacterianas. (A): *P. syringae* pv. *phaseolicola*. (B): *P. syringae* pv. *glycine*. (C): *D. dadanti*. (1) *T. remotiflora*; (2) *T. foetidissima*; (3) *T. micranta*; (4) Testigo positivo (agua); (5) Testigo negativo (ampicilina).

#### 4.2. Efecto *in vitro* de aceite de extractos de *Tagetes* en el crecimiento de *D. dadantii* y *P. syringae* pv. *phaseolicola*

En la hidrodestilación se obtuvo un rendimiento promedio de 1625  $\mu\text{L}$  de aceite esencial por kg de materia de planta. Con el fin de determinar las especies con mayor actividad biológica sobre las bacterias fitopatógenas se evaluaron las especies siguientes de *Tagetes*: *T. heterocarpha*, *T. lemoni*, *T. terniflora* y *T. coronopifolia*. El análisis del experimento factorial mostró los resultados siguientes: Respecto a la susceptibilidad en la Figura 10 se observa que Dd mostro mayores diámetros de inhibición del crecimiento bacteriano en comparación con Psph, lo cual indica que Dd tiene mayor sensibilidad a los extractos de *Tagetes*. En este sentido Tereschuk *et al.* (2003) reportaron también inhibición del crecimiento bacteriano en Gram positivas y negativas. Esto sugiere que existe de manera natural una diversidad a la sensibilidad de los microorganismos.

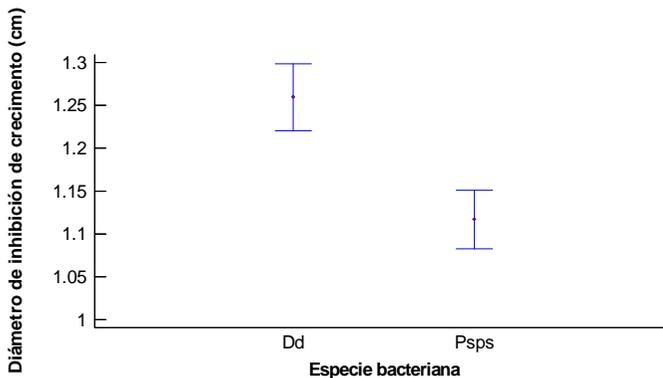


Figura 10. Sensibilidad de diferentes especies bacterianas fitopatógenas al extracto de *Tagetes*. Dd = *Dickeya dadantii*; Psph= *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Las barras representan  $\pm$  el valor de la diferencia mínima honesta de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

En la Figura 11 se presenta se presenta el efecto de las distinta concentraciones de aceite esencial de *Tagetes*. Al comparar las concentraciones

con el efecto de cloranfenicol se observa un gradiente decreciente del aceite puro (100%) a la más baja concentración. Sin embargo estadísticamente las concentraciones de 25, 50 y 75 fueron estadísticamente iguales por lo cual con una concentración de 25% se tiene un efecto inhibitorio bueno.

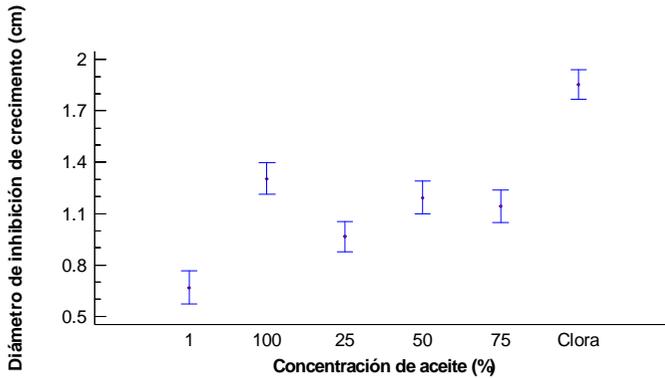


Figura 11. Efectividad de la concentración de aceite esencial de *Tagetes* sobre la inhibición bacteriana. Las barras representan  $\pm$  el valor de la diferencia mínima honesta de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Clora = Cloranfenicol.

En las Figuras 12 y 13 se observa los resultados de inhibición del crecimiento bacteriano provocados por los aceites esenciales de las diferentes especies de *Tagetes* contra *D. dadanti* y *P. syringae* pv. *phaseolicola* después de 24 horas en medio rico. Resulta evidente que *T. herocarpha* fue la especie con mayor efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano. Esto se debe a que la composición química varía entre las especies de *Tagetes*, Marotti *et al.* (2004) mencionan que la diversidad química está determinada genéticamente y estrictamente relacionada a las especies.

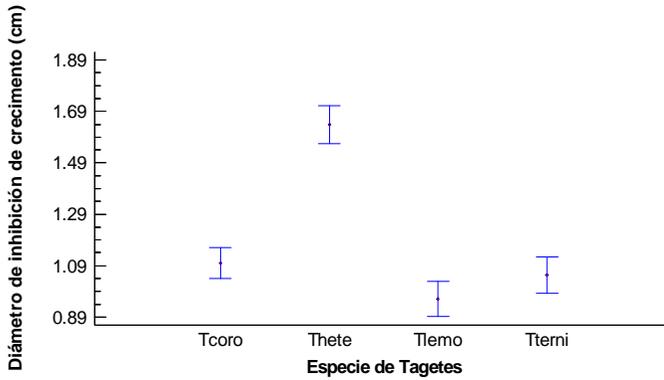


Figura 12. Efecto de extractos de cuatro especies de *Tagetes* sobre la inhibición bacteriana. Thete= *T. heterocarpha*; Tlemo= *T. lemni*; Tterni= *T. terniflora*; Tcoro= *T. coronopifolia*. Las barras representan  $\pm$  el valor de la diferencia mínima honesta de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

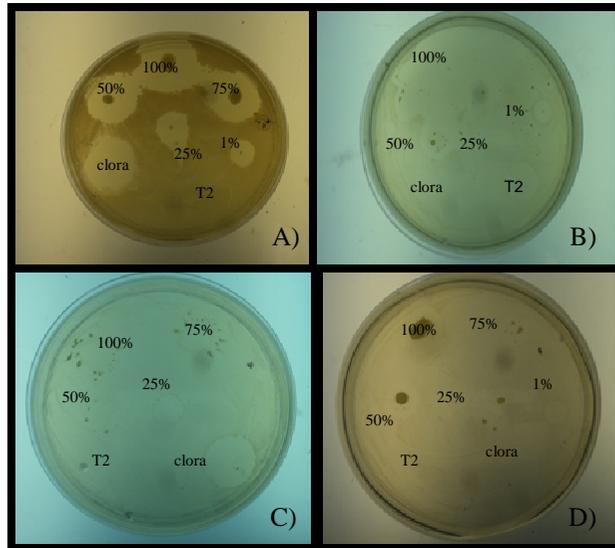


Figura 13. Efectividad biológica de distintas especies de *Tagetes* sobre bacterias fitopatógenas. A) Inhibición de *T. heterocarpha* contra *P. syringae* pv. *phaseolicola*. B) Inhibición de *T. Terniflora* contra *Dikeya dadantii*. C) Inhibición de *T. lemmonii* contra *P. syringae* pv. *phaseolicola*. D) Inhibición de *T. coronopifolia* contra *Dikeya dadantii*. clora= Cloranfenicol; T2= Tween20 al 2%.

La Figura 14 muestra la interacción de las concentraciones de aceites esenciales, el testigo negativo (cloranfenicol) en las dos especies bacterianas. El testigo con antibiótico mostro el mayor diámetro de inhibición contra las dos bacterias fitopatógenas, dado que cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro antimicrobiano (Morales *et al.*, 2007). Para el caso de *D. dadantii* se observa un gradiente del efecto inhibitorio de la mayor concentración (100%) a la menor (1%), al contrario en *P. syringae* pv. *phaseolicola* esta tendencia se rompe por el punto 50%, pues la inhibición fue mayor que a la concentración de 75%. Posiblemente esta interacción pudiera deberse a el modo de acción de los aceites esenciales, sin embargo este mecanismo no ha sido establecido por completo, se postula que pueden causar rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofilicos.

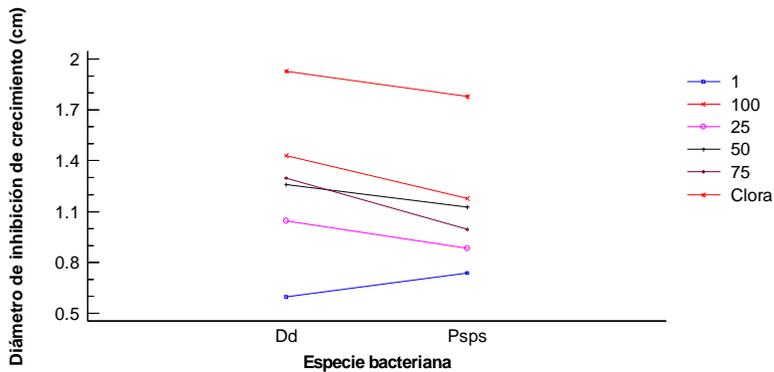


Figura 14. Interacción entre la respuesta de los niveles del factor especie bacteriana y los niveles del factor concentración de extractos de *Tagetes*. Dd = *Dikeya dadantii*; Psph= *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Las concentraciones están expresadas en %.

La interacción de los aceites esenciales de las especies de *Tagetes* con las especies bacterianas muestra claramente que *T. heterocarpha* tuvo mayor inhibición en ambas especies bacterianas (Figura 15) de forma significativa a los

otros *Tagetes*, además es evidente que *D. dadantii* fue más sensible que *P. syringae* pv. *phaseolicola*. La diferencia entre los efectos biológicos de los aceites esenciales pudiera ser debida por un lado a su genotipo y por otro a la expresión de su fenotipo y la interacción con las condiciones ambientales de crecimiento y desarrollo de la planta, ya que pudieran afectar la estructura y composición de principios activos de la planta (Serrato *et al.*, 2008).

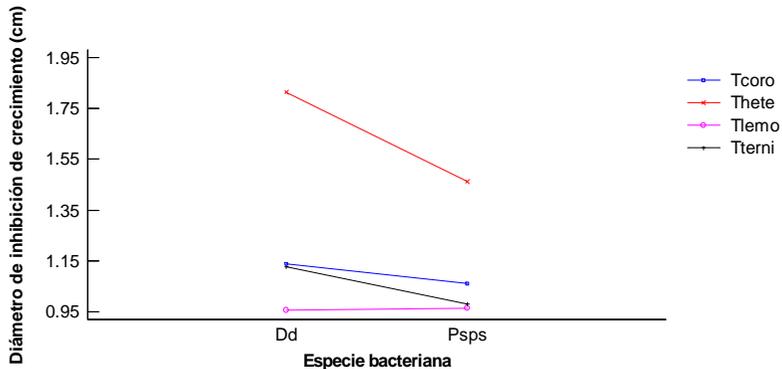


Figura 15. Interacción entre la respuesta de los niveles del factor especie bacteriana y los niveles del factor especie de *Tagetes*. Dd = *Dickeya dadantii*; Psp= *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Thete= *T. heterocarpha*; Tlemo= *T. lemoni*; Tterni= *T. terniflora*; Tcoro= *T. coronopifolia*.

Finalmente la Figura 16 muestra la interacción de las concentraciones de aceites esenciales con las especies de *Tagetes*. Las concentraciones de 25, 50, 75 y 100% de *T. heterocarpha* tuvieron mayor efecto inhibitorio que las demás especies. Se observó que cada especie de *Tagetes* evaluada tienen un comportamiento distinto, lo que sugeriría que el contenido de compuestos activos como antibacteriales es afectado por factores como el hábitat de la planta (Karousou *et al.*, 2005), la etapa fenológica, las diferentes partes de la que se extrae, la composición del suelo y la fertilización mineral (Macías y Galindo, 2001), lo que explicaría las diferencias en la inhibición del crecimiento de bacterias fitopatógenas

de las distintas especies de *Tagetes*, dado que estas especies fueron colectadas en diferentes regiones geográficas de México.

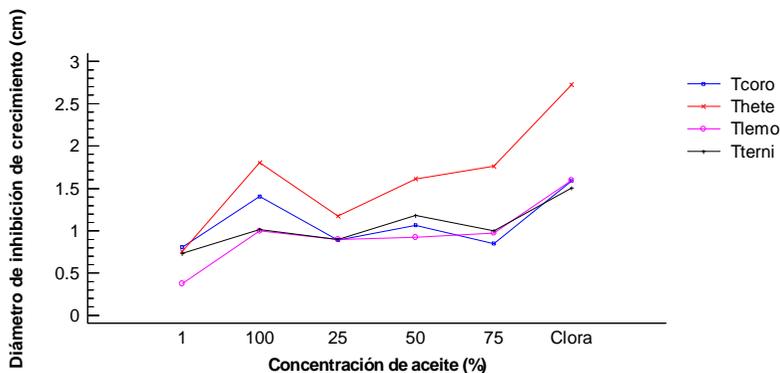


Figura 16. Interacción entre la respuesta de los niveles del factor concentración de extractos de *Tagetes* y los niveles del factor especie de *Tagetes*. Thete= *T. heterocarpa*; Tlemo= *T. lemoni*; Tterni= *T. tenuiflora*; Tcoro= *T. coronopifolia*.

## 5. CONCLUSIONES

Los aceites esenciales obtenidos por el método de hidrodestilación de *Tagetes* spp son un recurso importante con un gran potencial en la agricultura orgánica debido al efecto que presentan de inhibir *in vitro* a *Dikeya dadantii* y *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, lo cual podría utilizarse en el biocontrol de bacterias fitopatógenas en la agricultura. En este sentido el aceite esencial de *Tagetes heterocarpha* mostró el mayor efecto de inhibición del crecimiento bacteriano de ambas bacterias. Respecto a las especies bacterianas, *D. dadantii* fue más sensible que *P. syringae* pv. *phaseolicola*. En relación a las concentraciones evaluadas, 25% fue la más adecuada para continuar con los bioensayos a nivel de invernadero.

## 6. AGRADECIMIENTOS

La presente investigación fue realizada gracias al financiamiento de la Red Cempoaxochilt del SINAREFI mediante el proyecto “Evaluación de efectividad biológica de extractos” clave ORN-CEM-10-7.

## 7. PERSPECTIVAS

Para concluir la biotecnología basada en la aplicación de los extractos de *Tagetes* es necesario realizar bioensayos a nivel de campo o invernadero, por lo cual un trabajo aun pendiente será la validación de estos resultados a esos niveles. Además la exploración de otras especies de *Tagetes* debe ampliarse con el fin de caracterizar la mayor parte de material vegetal de *Tagetes* presente en México. Finalmente también deberán realizarse estudios respecto a evaluar una mayor cantidad de microorganismos fitopatógenos (bacterias, hongos) con la meta de tener información acerca de que microorganismos fitopatógenos son susceptibles a los extractos de origen vegetal (*Tagetes*).

## 8. BIBLIOGRAFIA

Aquino, R., A. Cáceres, S. Morelli and L. Rastrelli. **2002**. An extract of *Tagetes lucida* and its phenolic constituents as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 65: 1773-1776.

- Ausich, R.L. **1997**. Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. *Pure Appl. Chem.* 69: 2169-2173.
- Bertram, J.S. **1999**. Carotenoids and gene regulation. *Nutr. Rev.* 6: 182-191.
- Burke, J.D., J. Curran-Celentano and A.J. Wenzel. **2005**. Diet and serum carotenoid concentrations affect macular pigment optical density in adults 45 years and older. *J. Nutr.* 135: 1208-1214.
- Caballero-Mellado, J. **2006**. Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 48: 154-155.
- Chi, M.B., P.P. Flores y M.R. Rivera. **2002**. Cempasúchil fuente importante de carotenoides. *Ciencia y Desarrollo* 165: 20-25.
- Chintakovid, W., Visoottiviseth P., Khokiattiwong S. and Lauengsuchonkul S. **2008**. Potential of the hybrid marigolds for arsenic phytoremediation and income generation of remediators in Ron Phibun District, Thailand. *Chemosphere* 70: 1532-1537.
- Dharmagadda, V.S.S., S.N. Naik, P.K. Mittal and P. Vasudevan. **2005**. Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. *Bioresource Technology* 96: 1235-1240.
- Daughtrey, M. **1999**. Plagas y enfermedades de las plantas en macetas con flores. The American Phytopathological Society. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- DOF, **2006**. Ley de productos orgánicos. Nueva Ley DOF 07-02-2006.
- EPPO, **2008**. Data Sheets on Quarantine Pests *Erwinia chrysanthemi*. Internet: [http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Erwinia\\_chrysanthemi/ERWICH\\_ds.pdf](http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Erwinia_chrysanthemi/ERWICH_ds.pdf).
- Franco, N.F. y E. Zavaleta M. **2002**. Estado actual acerca del modo de acción de las toxinas no selectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19: 237-240.
- Gómez-Rodríguez, O., Zavaleta-Mejía E., González-Hernández V.A., Livera-Muñoz M. y Cárdenas-Soriano E. **2007**. Physiological and morphological adaptations in tomato intercropped with *Tagetes erecta* and *Amaranthus hypochondriacus*. *Rev. Fitotec. Mex.* 30: 421-428.
- González, L.C. **1981**. Introducción a la Fitopatología. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. IICA-LME, San José Costa Rica.
- Gupta, Y.C., S.P.S. Raghava and R.L. Misra. **1999**. Inherence of male sterile apetalous inflorescence in African marigold. *J. Ornam. Hort. New Series* 2: 65-66.
- Hernández-Xolocotzi, E. **1993**. Aspects of plant domestication in Mexico: a personal view. *In*: Ramamoorthy, T.P., R. Bye, A. Lot and J. Fa (Eds). *Biological diversity of Mexico. Origins and distribution*. Oxford University Press. Nueva York.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., S. Reverchon, W. Nasser, G. Condemine and J. Robert-Baudouy. **1996**. Regulation of pectinase biosynthesis of *Erwinia chrysanthemi*. *In*: Visser, J. and Voragen A.G.J. *Pectins y pectinases (eds.) Progress in Biotechnology (Vol 4)*. Elsevier Science B.V. The Netherlands. p. 311-330.
- Jacobs, J.J., Arroo R.R., De Koning E.A., Klunder A.J., Croes A.F. and Wullems G.J. **1995**. Isolation and Characterization of mutants of thiophene synthesis in *Tagetes erecta*. *Plant Physiol.* 107: 807-814.

- Karousou, R., D. N. Koureas and S. Kokkini. **2005**. Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in natura 2000 sites of Crete. *Phytochemistry* 66: 2668-2673.
- Kritchevsky, S.B. **1999**.  $\beta$ -carotene, carotenoids and the prevention of coronary heart diseases. *J. Nutr.* 129: 5-8.
- Lal, K., Minhas P.S., Chaturvedi R.K. and Yadav R.K. **2008**. Extraction of cadmium and tolerance of three annual cut flowers on Cd-contaminated soils. *Bioresour Technol.* 99: 1006-1011.
- Macias, A.F. y C.G.J. Galindo. **2001**. Terpenoides alelopáticos: estructura, actividad y aplicaciones. *In: Anaya A. L., F. J. Espinosa-García, R. Cruz-Ortega.* (Coordinadores). Relaciones químicas entre organismos. Aspectos básicos y perspectivas. Instituto de Ecología. Plaza y Valdés S. A. de C. V. México D. F. 137-161.
- Mares, D.B. Tosia, F. Polib, E. Andreottia and C. Romagnolic. **2004**. Antifungal activity of *Tagetes patula* extracts on some phytopathogenic fungi: ultrastructural evidence on *Pythium ultimum*. *Microbiological Research* 159: 295-304.
- Mares-Perlman, J., A.E. Millen, T. Fieck and S.E. Hankinson. **2002**. The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. *J. Nutr.* 132: 518S-524S.
- Marotti, M., R. Piccaglia, B. Biavati and I. Marotti. **2004**. Characterization and yield evaluation of essential oils from different *Tagetes* species. *J. Essential Oil Res.* 16: 440-444.
- Mittermeier, R. y C. Goettsch. **1992**. La importancia de la diversidad biológica de México. *En: Sarukhán, J. y R. Dirzo* (comps.). México ante los retos de la biodiversidad. Conabio. México.
- Molldrem, K.L., J. Li, P.W. Simon and S.A. Tanumihardjo. **2004**. Lutein and  $\alpha$ -carotene from lutein-containing yellow carrots are bioavailable in humans. *Amer. J. Clin. Nutr.* 80: 131-136.
- Morales, E.Y., M<sup>a</sup>. Carmen-Herrera y R. Jesús-Muñoz. **2007**. Cloranfenicol, un antibiótico clásico como alternativa en el presente. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 28:44-57.
- Neyra, G.L. y L. Durand S. **1998**. Biodiversidad. *In: Conabio. La diversidad biológica de México: Estudio de País, 1998.* Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. p. 61-102.
- Nishino, H. **1997**. Cancer prevention by natural carotenoids. *J. Cell. Bioche. Suppl.* 27: 86-91.
- Peet, C.R. and N.J. Panopoulos. **1987**. Ornithine carbamoyltransferase genes and phaseolotoxin immunity in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *The Embo Journal* 6: 3585-3586.
- Ribaya-Mercado, J.D. and J.B. Blumberg. **2004**. Lutein and zeaxanthin and their potential roles in disease prevention. *J. Am. Coll. Nutr.* 23 (6 Suppl): 567S-587S.
- Sarin, R. **2004**. Insecticidal activity of callus culture of *Tagetes erecta*. *Fitoterapia* 75: 62-64.
- Sains, J.M.P., Maya N.R., Maya J.R. y Gallegos A.A.J. **2008**. Dinámica de los tizones común y de halo del frijol en el valle de México. *Agricultura Técnica en México* 31: 201-202
- Smith, G.A. and P. Rubery H. **1982**. Investigation of the *Erwinia chrysanthemi* of action of a chlorosis-inducing toxin produced by *Pseudomonas phaseolicola*. *Plant Physiol.* 70: 932.

- Serrato-Cruz, M.A. **2004**. Cempoalxóchilt: diversidad biológica y usos. Ciencia Y Desarrollo En Internet, Julio-Agosto.
- Serrato-Cruz, M.A. **2006**. Manual grafico para la descripción varietal de cempasúchil (*Tagetes*). SNICS-SAGARPA y UACH, México. 100 pp.
- Serrato Cruz, M.A. **2010**. Información documental sobre el taxa *Tagetes* para dimensionar su centro de origen y diversidad genética en México. Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. México.
- Serrato, C.M.A. **1999**. Variabilidad genética de plantas cempoalxóchilt (*Tagetes* spp). Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, México.
- Serrato, C.M.A. y M. de L. Quijano. **1993**. Usos de algunas especies de *Tagetes*: revisión bibliográfica (1984-1992)". Proceedings of the I International Symposium and II National Meeting on Sustainable Agriculture, Mexico. p. 228-238.
- Serrato-Cruz, M.A., F. Díaz-Cedillo y Barajas-Pérez J.S. **2008**. Composición en el aceite esencial en germoplasma de *Tagetes filifolia* Lag. de la región centro-sur de México. Agrociencia 42: 277-285.
- Slattery, M.L., Benson J., Curtin K., Ma K.N., Schaeffer D. and Potter J.D. **2000**. Carotenoids and colon cancer. Am. J. Clin. Nutr. 71: 575-582.
- Tereschuk, M.L., M.D. Baigori and L.R. Abdala. **2003**. Antibacterial activity of *Tagetes tenuiflora*. Fitoterapia 74: 404-406.
- Turner, B.L. and G.L. Nesom. **1993**. Biogeography, diversity, and endangered or threatened status of Mexican Asteraceae. In: Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution. Ramamoorthy, T. P., R. Bye, A. Lot, and J. Fa (eds.). Oxford University Press. New York, USA. pp: 290-299.
- Villar-Martínez, A.A. **2005**. Producirán pigmento antioxidante con cempaxúchil. Publicación en Internet: <http://148.207.1.2/Comunicacion/Agencia/notas/Salud/pigmento-antiox-ipn.htm>.
- Young, A.J. and Lowe G.M. **2001**. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. Arch Biochem Biophys. 385: 20-27.



Las bacterias responsables de enfermedades en cultivos agrícolas causan pérdidas económicas y productivas significativas, por ejemplo el tizón de halo en frijol provocado por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* y la pudrición blanda inducida por *Dikeya dadantii* que afecta a cultivos como nardo, agaves, lechuga, etc. La resistencia que han adquirido estas bacterias hacia los agroquímicos sintéticos de constante uso ha provocado la necesidad de la búsqueda de otras opciones de convivir con estos microorganismos. Una opción de estas nuevas medidas es el control biológico mediante el uso de extractos vegetales. Específicamente el género *Tagetes* tiene propiedades que han sido mostradas con un gran potencial para tratar problemas contra insectos, nematodos, bacterias, etc. México es centro de origen y distribución de *Tagetes* por lo cual resulta imprescindible el estudio básico y aplicado de este recurso fitogenético que podría traer beneficios a agricultores y consumidores.