

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



EFFECTIVIDAD BIOLÓGICA DE POLIFENOLES DE DIFERENTES FUENTES
VEGETALES PARA EL CONTROL DE HONGOS ASOCIADOS A LA
MARCHITEZ Y PUDRICIÓN DE RAÍZ DEL GARBANZO

Tesis

Que presenta IVON ALEJANDRA ROSAS JAUREGUI

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Saltillo, Coahuila

Diciembre 2020

EFFECTIVIDAD BIOLÓGICA DE POLIFENOLES DE DIFERENTES FUENTES
VEGETALES PARA EL CONTROL DE HONGOS ASOCIADOS A LA
MARCHITEZ Y PUDRICIÓN DE RAÍZ DEL GARBANZO

Tesis

Elaborada por IVON ALEJANDRA ROSAS JAUREGUI como requisito parcial
para obtener el grado de Maestro En Ciencias en Parasitología Agrícola con la
supervisión y aprobación del Comité de Asesoría.



Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo
Asesor principal



Dra. Diana Jasso Cantú
Asesor



Dr. Raúl Rodríguez Herrera
Asesor



M.C. Saira Rocio Martínez Alemán
Asesor



Dr. Marcelino Cabrera De la Fuente
Subdirector de Posgrado
UAAAN

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por haberme dado las fuerzas y la sabiduría para concluir exitosamente una etapa más en mi vida.

Al **Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo** por su apoyo, su paciencia, disposición y sus aportaciones en la realización de esta investigación.

Al **Dr. Raúl Rodríguez Herrera** por el tiempo y aportaciones para realizar este trabajo

A la **Dra. Diana Jasso Cantú** por su apoyo y tiempo en la realización de este trabajo.

A la **M.C. Saira Martínez Alemán** por su tiempo y dedicación para realizar este trabajo.

Al **Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias** por el apoyo brindado para la realización de este trabajo

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo económico otorgado para la realización de este trabajo.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por ser parte de mi formación profesional.

A mis compañeros de INIFAP **M.C. Alma, Dr. Guillermo, Dr. Juan Manuel y M.C. José Luis** por todo el apoyo que me brindaron durante el desarrollo de este trabajo.

DEDICATORIA

A mi hija **Ivanna** por ser quien me inspira a ser mejor cada día y enseñarme a ser madre, tal vez no soy la mejor, pero te amo infinitamente. Mereces el mejor de los mundos, y yo intento construirlo lo mejor que puedo cada día.

A mi madre **Alejandra** por siempre creer en mí, por ser el mejor ejemplo que tengo en la vida y brindarme tu apoyo incondicional, sabes que sin ti nada de esto hubiera sido posible, te amo y sé que no me alcanzara la vida para devolvarte un poco de lo mucho que me has dado.

A mis hermanos **Lupita** y **Jesús**, que siempre me han apoyado y han sido más que unos tíos para mi hija, los amo.

A mi novio **Carlos** por la paciencia, confianza, cariño y apoyo incondicional que siempre me has brindado, te amo.

A cada uno de los integrantes de las familias **Jáuregui** y **Ayón Ibarra** por siempre estar apoyándome.

A **Diana**, que recorrió conmigo esta etapa en donde compartimos conocimientos, experiencias y sobre todo tiempo de calidad.

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera han contribuido para el logro de mis objetivos.

Gracias.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE CUADROS DE APÉNDICES.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVO GENERAL.....	3
Objetivos específicos.....	3
HIPÓTESIS.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Garbanzo (<i>Cicer arietinum</i> L.).....	4
Importancia del Garbanzo en México.....	4
Tipos de Garbanzo.....	4
Clasificación Taxonómica del Garbanzo.....	6
Limitantes de Producción del Garbanzo.....	6
<i>Fusarium oxysporum</i>	7
Clasificación de <i>F. oxysporum</i>	8
Generalidades de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	8
Fusariosis Vascular.....	8
Sintomatología de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	8
<i>Fusarium solani</i>	8
Clasificación de <i>F. solani</i>	9
Generalidades de <i>Fusarium solani</i>	10
Podredumbre de Raíz.....	10
Sintomatología de <i>Fusarium solani</i>	10

<i>Macrophomina phaseolina</i>	10
Clasificación de <i>M. phaseolina</i>	11
Generalidades de <i>M. phaseolina</i>	11
Podredumbre Carbonosa de Raíz.....	11
Sintomatología de <i>M. phaseolina</i>	12
Medidas de Control de Enfermedades en el Cultivo de Garbanzo.....	12
Control de la Enfermedad.....	12
Extractos Vegetales Como Fungicidas.....	13
<i>Ligustrum lucidum</i>	13
Clasificación Taxonómica.....	14
Composición Fitoquímica.....	14
<i>Moringa oleífera</i>	14
Clasificación Taxonómica.....	15
Composición Fitoquímica.....	15
<i>Sorghum bicolor</i>	16
Clasificación Taxonómica.....	16
Composición Fitoquímica.....	17
Métodos Convencionales de Extracción.....	17
Métodos Alternativos de Extracción.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Obtención de Material Vegetal.....	19
Extracción Asistida Mediante Ultrasonido–Microondas.....	19
Cromatografía en Columna con Amberita.....	20
Recuperación de Extracto Seco.....	20

Caracterización de Fitoquímicos Presentes en los Polifenoles Vegetales Mediante Cromatografía Líquida RP-HPLC-ESI-MS.....	20
Obtención e Identificación de las Cepas de <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> y <i>M. phaseolina</i>	21
Identificación Molecular Mediante PCR y Amplificación Aleatoria de Polimorfismo del ADN (RAPD).....	22
Actividad Antifúngica de los Polifenoles Vegetales Contra <i>M. phaseolina</i> por el Método de Medio Envenenado.....	23
Actividad Antifúngica de los Polifenoles Vegetales Contra <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> y <i>F. solani</i> por el Método de Microdilución en Placa.....	23
Análisis Estadístico.....	24
Efectividad Biológica de Polifenoles Vegetales Bajo Condiciones de Invernadero.....	25
Establecimiento de Ensayo.....	25
Material Vegetativo.....	25
Sustrato.....	25
Diseño Experimental.....	25
Inoculación y Trasplante.....	26
Aplicación de los Tratamientos.....	26
Variables Evaluadas.....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
Polifenoles Obtenidos Mediante la Técnica Asistida de Ultrasonido–Microondas.....	28
Fitoquímicos Presentes en los Extractos Vegetales, Caracterizados Mediante Cromatografía Líquida RP-HPLC-ESI-MS.....	28
Identificación Morfológica.....	28
Identificación y Caracterización Molecular de los Aislados de Hongos...	30
Actividad Antifúngica de Polifenoles Vegetales Contra <i>M. phaseolina</i> por el Método de Medio Envenenado.....	32

Actividad Antifúngica de Polifenoles Vegetales Contra <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> por el Método de Microdilución en Placa.....	35
Actividad Antifúngica de Extractos Vegetales Contra <i>Fusarium solani</i> por el Método de Microdilución en Placa.....	36
Efectividad Biológica de los Polifenoles Vegetales Sobre la Marchitez y Pudrición de Raíz de Garbanzo (MPR) Bajo Condiciones de Invernadero.....	38
Incidencia y Severidad de la Enfermedad.....	38
CONCLUSIONES.....	41
LITERATURA CITADA.....	42
APÉNDICES.....	56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Producción de garbanzo grano a nivel nacional ciclo (P-V, O-I).....	5
Cuadro 2. Descripción de las relaciones entre soluto-solvente de la extracción asistida mediante Ultrasonido – Microondas.....	20
Cuadro 3. Tratamientos utilizados para estudiar el efecto antifúngico de polifenoles de diferentes fuentes vegetales contra el complejo de marchitez y pudrición de raíz.....	26
Cuadro 4. Escala utilizada para determinar la incidencia y severidad causada por el complejo de hongos que ocasionan la marchitez y pudrición de raíz en plantas de garbanzo.....	27
Cuadro 5. Escala para evaluación de severidad en raíz causada por el complejo de hongos que ocasionan la marchitez y pudrición de raíz en garbanzo.....	27
Cuadro 6. Polifenoles obtenidos y empleados para determinar su actividad antifúngica contra la marchitez y pudrición de raíz de garbanzo mediante el método de microdilución en placa y medio envenenado.....	28
Cuadro 7. Grupos de polifenoles detectados en los extractos de tres fuentes vegetales mediante la tecnología de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas (HPLC-MS)...	29
Cuadro 8. Caracterización de cada especie aislada de plantas de garbanzo e identificada de acuerdo a Leslie y Summerell (2006) y Santos <i>et al.</i> (2015).....	31
Cuadro 9. Concentración inhibitoria al 50 % (CI ₅₀) de polifenoles etanólicos para la inhibición de <i>Macrophomina phaseolina</i>	34
Cuadro 10. Concentración inhibitoria al 50 % (CI ₅₀) de polifenoles obtenidos de diferentes fuentes vegetales para la inhibición de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i>	36
Cuadro 11. Concentración inhibitoria al 50 % (CI ₅₀) de polifenoles obtenidos de diferentes fuentes vegetales para la inhibición de <i>Fusarium solani</i>	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Identificación de los patógenos: a) <i>M. phaseolina</i> (350 pb), <i>F. solani</i> (658 pb) y c) <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> (900 pb). Productos de amplificación separados en un gel de agarosa 1% y teñido con Nucleic acid gel stain (Invitrogen).....	32
Figura 2. Porcentaje de inhibición de <i>Macrophomina phaseolina</i> por polifenoles obtenidos por extractos etanólicos de fuentes vegetales.....	33
Figura 3. Polifenoles de diferentes fuentes vegetales y concentraciones utilizadas en el ensayo de medio envenenado contra <i>Macrophomina phaseolina</i>	34
Figura 4. Porcentaje de inhibición de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> por polifenoles de diferentes fuentes vegetales.....	35
Figura 5. Porcentaje de inhibición de <i>Fusarium solani</i> por polifenoles de diferentes fuentes vegetales.....	37
Figura 6. Incidencia de las plantas de garbanzo inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> , <i>F. solani</i> y <i>M. phaseolina</i> y tratadas con polifenoles vegetales bajo condiciones de invernadero	39
Figura 7. Severidad de la enfermedad en plantas de garbanzo inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> , <i>F. solani</i> y <i>M. phaseolina</i> y tratadas con polifenoles vegetales.....	39
Figura 8. Severidad de la enfermedad en raíces de garbanzo inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> , <i>F. solani</i> y <i>M. phaseolina</i> y tratadas con polifenoles vegetales bajo condiciones de invernadero.	40

ÍNDICE DE CUADROS DE APÉNDICE

Cuadro 1. Incidencia en porcentaje de la enfermedad en plantas de garbanzo.....	57
Cuadro 2. Análisis de varianza para incidencia de la enfermedad evaluada en plantas de garbanzo.....	57
Cuadro 3. Severidad de la enfermedad en plantas de garbanzo.....	58
Cuadro 4. Análisis de varianza para la severidad de la enfermedad evaluada en plantas de garbanzo.....	58
Cuadro 5. Severidad de la enfermedad en raíces de plantas de garbanzo.....	59
Cuadro 6. Análisis de varianza para severidad de la enfermedad en raíces de plantas de garbanzo.....	59

RESUMEN

EFFECTIVIDAD BIOLÓGICA DE POLIFENOLES DE DIFERENTES FUENTES VEGETALES PARA EL CONTROL DE HONGOS ASOCIADOS A LA MARCHITEZ Y PUDRICIÓN DE RAÍZ DEL GARBANZO

Por

IVÓN ALEJANDRA ROSAS JAUREGUI

MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

CALZADA ANTONIO NARRO No. 1923, BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA

DICIEMBRE 2020

DR. FRANCISCO DANIEL HERNÁNDEZ CASTILLO -ASESOR-

Palabras clave. *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina*, polifenoles.

La producción del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) constantemente está comprometida por un complejo de patógenos que ocasionan la marchitez y pudrición de raíz (MPR). Por lo que, en los últimos años, el control biológico y los productos orgánicos ha cobrado mayor importancia. En el presente trabajo se obtuvieron polifenoles de extractos etanólicos mediante la técnica asistida de ultrasonido–microondas de las especies vegetales: hoja de trueno (*L. lucidum*), granos de sorgo (*S. bicolor*) y hojas de moringa (*M. oleífera*). Se les realizó el análisis cualitativo mediante RP-HPLC-ESI-MS y se determinó el efecto

antifúngico de cada grupo de polifenoles sobre tres hongos fitopatógenos que conforman el complejo de la marchitez y pudrición de raíz, por medio de la técnica de dilución en placa y medio envenenado. Se determinó el porcentaje de inhibición y la concentración inhibitoria (CI_{50}). Los resultados indican que los polifenoles tienen elevada efectividad biológica sobre el hongo *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium solani*, la actividad para *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* dependió de los polifenoles de cada especie vegetal. Adicionalmente se comprobó que todos los grupos de polifenoles tenían en su composición química, algunos compuestos de reconocida actividad microbiana como: Flavonas, Antocianinas, Catequinas y Alquifenoles, entre otros. Los resultados bajo condiciones de invernadero muestran que las plantas con la incidencia y severidad más baja fueron las que recibieron el tratamiento con los polifenoles de *L. lucidum* con 66 % en incidencia, siendo estadísticamente diferente al resto de los tratamientos.

ABSTRACT

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) production is constantly compromised by a complex of pathogens that cause root rot and wilt (MPR) therefore, in recent years, biological control and organic products have become more important. In the present work, polyphenols were obtained from ethanolic extracts by means of the ultrasound-microwave assisted technique of the plant species: thunder leaf (*L. lucidum*), sorghum grains (*S. bicolor*) and moringa leaves (*M. oleifera*). The corresponding qualitative analysis was carried out by RP-HPLC-ESI-MS and the antifungal effect of polyphenols on three phytopathogenic fungi; that make up the wilt and root rot complex was determined, by means of the technique of plate dilution and poisoned medium. Percent inhibition and inhibitory concentration (CI₅₀) were determined. The results indicated that the polyphenols have high biological effectiveness on the fungus *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium solani*, the activity for *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* depended on the polyphenols of each plant species. Additionally, it was found that all polyphenols groups had in their chemical composition some compounds of recognized microbial activity such as: Flavones, Anthocyanins, Catechins and Alkyphenols, among others. The results under greenhouse conditions show that the plants with the lowest incidence and severity were those that received treatment with *L. lucidum* polyphenols with 66 % in incidence, being statistically different from the rest of the treatments.

Keywords. *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina*, Polyphenols.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de garbanzo (*Cicer arietinum* L.), ocupa el segundo lugar entre las leguminosas de grano seco, solo después del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Morales y Durón, 2004). En México, en el año agrícola 2016, la superficie dedicada a la producción de este cultivo fue de 66 096 ha sembradas, con una producción de 116 076 t; Sinaloa y Sonora fueron los principales estados productores al aportar 45 y 30 % de la producción nacional, respectivamente (SIAP, 2017). Entre las enfermedades que limitan la producción de garbanzo está la fusariosis vascular, la cual es causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (FOC). En España se reportan pérdidas de la producción del 10 al 15 % y en otros países entre 10 y 90 % (Landa *et al.*,2006; Sharma y Muehlbauer,2007). Sin embargo, la marchitez por *Fusarium* puede causar pérdidas del 100 %, cuando el cultivo está expuesto a condiciones adversas como el calor o por estrés de agua durante la fase reproductiva y el desarrollo de la cápsula (Landa *et al.*, 2006). Por mucho tiempo la “rabia” causada por *Didymella rabiei* (Kovatsch.) se consideró la enfermedad más importante del garbanzo en España (Arx Navas *et al.*,1998). Sin embargo, otros estudios indican que se presenta ocasionalmente, mientras que la “seca” o “fusariosis” ha aumentado. Se sugiere que la fusariosis pudiera incluir un complejo de patógenos similar a la marchitez y pudrición de raíz (MPR), que reduce severamente la producción de semillas de garbanzo. Varios hongos se han reportado como los agentes del complejo MPR del garbanzo entre los cuales se mencionan a *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina* y *Sclerotium* (Padilla *et al.*,2008).

Algunas de las estrategias empleadas para el manejo de esta enfermedad son el uso de variedades resistentes, rotación de cultivos, solarización, el retiro de socas y uso de semillas libre de patógenos o tratadas con fungicidas, aunque los resultados han sido limitados o poco satisfactorios (Paredes *et al.*, 2009). El control con químicos sintéticos es el método más usado en el control de enfermedades que ocasionan las especies de *Fusarium*; sin embargo, en los últimos años el control biológico ha cobrado mayor importancia (Basco *et al.*,

2017). Gran variedad de investigaciones se centra en estudios sobre la formulación de productos naturales con algún tipo de actividad biológica sobre hongos fitopatógenos con una eficacia y una acción cada vez mayor y más rápida, lo que está generando que estas prácticas sean más eficaces en un amplio rango de condiciones ambientales, de especies de plagas y de sistemas de cultivos (Gakuya *et al.*, 2013). Debido a lo anterior, la EPA (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos) tiene en sus registros información donde claramente se ha demostrado que los productos naturales juegan un papel importante en el descubrimiento y desarrollo de nuevos productos y cada vez más, se reconoce la importancia de las especies vegetales y sus derivados (extractos, aceites esenciales, decocciones, metabolitos secundarios) en la protección de cultivos bajo el concepto del Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades (MIPE) (Sparks *et al.*, 2017).

OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antifúngica de los polifenoles de diferentes fuentes vegetales contra los hongos asociados a la marchitez y pudrición de raíz de garbanzo *in vitro* y en invernadero.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener los polifenoles de hojas de moringa (*M. oleífera*) y de trueno (*L. lucidum*) y granos de sorgo (*S. bicolor*) y por extracción asistida por Ultrasonido-Microondas.
- Determinar la actividad antifúngica de los polifenoles de hojas de moringa y de trueno y granos de sorgo, sobre el complejo de hongos que ocasionan la marchitez y pudrición de raíz de garbanzo *in vitro*.
- Efectuar estudios de efectividad antifúngica de los polifenoles de hojas de moringa y de trueno, en plantas de garbanzo en invernadero.

HIPÓTESIS

Los polifenoles vegetales mediante su actividad antifúngica disminuirán en un 75% la incidencia y severidad de la marchitez y pudrición de raíz del garbanzo ocasionada por el complejo de hongos.

REVISION DE LITERATURA

Garbanzo (*Cicer arietinum* L.)

El garbanzo, es un cultivo de importancia a nivel mundial, principalmente en el aspecto alimenticio y económico, debido a su alto contenido de proteína (Jukanti *et al.*,2012), bajo en grasas y sodio y es una excelente fuente de fibra soluble e insoluble, así como carbohidratos complejos, vitaminas, ácido fólico y minerales, especialmente calcio, fósforo, hierro y magnesio (Roy *et al.*,2015).

Importancia del Garbanzo en México

Rzedowski (2006) menciona que la vertiente del Pacífico mexicano, cuenta con condiciones climáticas propias para el garbanzo (*Cicer arietinum* L.), en donde se acostumbra establecer durante los meses más frescos del año, además de ser cultivado en amplias superficies del Bajío y del estado de Jalisco, y, sobre todo, en las partes bajas de Guerrero, Michoacán, Oaxaca, Sinaloa y Sonora. Datos recopilados del Anuario Estadístico de la Producción Agrícola (AEPA) del SIAP (2015); indica que el estado de Sinaloa es el productor líder con más de 48,000.00 ha (Cuadro 1). Distinguiéndose el noroeste de México (Sinaloa, Sonora y Baja California Sur), por ser el área productora de garbanzo blanco para exportación (Gómez-Garza *et al.*,2003).

Tipos de Garbanzo

Existen dos tipos distintos de garbanzos cultivados: Desi y Kabuli. El Desi tiene flores rosadas, pigmentación de antocianina en los tallos y una cubierta de semilla gruesa y coloreada. Los tipos Kabuli (macrosperma) tienen flores blancas, carecen de pigmentación antocianina en los tallos y tienen semillas de color blanco o beige con forma de cabeza de borrego y una superficie lisa (Jukanti *et al.*, 2012).

Cuadro 1. Producción de garbanzo a nivel nacional ciclo (P-V, O-I)

Posición	Estado	Sup. Sembrada (ha)	Producción (t)	Rendimiento (t ha ⁻¹)	Valor de producción (miles de pesos)
1	Sinaloa	48,270.02	78,424.98	1.62	929,448.55
2	Sonora	11,245.00	26,751.16	2.38	339,764.34
3	Michoacán	9,915.50	15,028.13	1.85	102,777.81
4	Guanajuato	6,905.50	11,216.27	1.66	49,228.84
5	Baja California Sur	3,977.20	3,826.33	0.96	46,095.84
6	Jalisco	1,109.00	1,797.50	1.62	5,916.42
7	Guerrero	576.55	473.32	0.82	4,101.18
8	Oaxaca	297.25	270.14	0.91	2,468.61
9	Hidalgo	26.00	13.00	0.50	201.50
10	Querétaro	15.00	8.10	0.54	25.11
	Total	82,337.02	137,821.93	12.86	1,479,928.20
	promedio	8,233.70	13,782.19	1.286	147,992.82

Periodo 2015, modalidad; riego + temporal.

Fuente: elaboración propia con datos del SIAP, (2015).

La distribución geográfica difiere para estos dos tipos, las semillas de garbanzo Kabuli se cultivan en regiones templadas, mientras que el tipo Desi se cultiva en los trópicos semiáridos (Maheri *et al.*, 2008). Así, el garbanzo de tipo Kabuli es considerado más importante desde el punto de vista económico, ya que recibe un precio de mercado más alto que el Desi. Sin embargo, la mayoría de los recursos genómicos se han generado por el garbanzo tipo Desi (Agarwal *et al.*, 2012). Los dos tipos representan diferentes antecedentes genéticos, que se diferencian en importantes rasgos agronómicos, como la resistencia a enfermedades, tolerancia al frío y hábito de crecimiento (Warda *et al.*, 2017).

Clasificación Taxonómica del Garbanzo

De acuerdo con CABI (2017) la clasificación taxonómica del garbanzo se encuentra ordenada de la siguiente manera:

Reino: Plantae

Phylum: Spermatophyta

Clase: Dicotyledonae

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: *Cicer*

Especie: *arietinum*

Limitantes de Producción de Garbanzo

La Seca del garbanzo incluye un complejo de enfermedades, con al menos una marchitez vascular y una podredumbre de raíz, razón por lo que lo se le ha denominado marchitez y podredumbre de raíz (MPR). Este complejo de enfermedades, son reconocidas por una sintomatología severa presente en la mayoría de los países cultivadores del garbanzo en los cinco continentes, ocasionando importantes pérdidas de cosecha (Icrisat, 1975).

Entre los hongos fitopatógenos implicados en la MPR del garbanzo se pueden distinguir dos grandes grupos: 1) los causantes de marchitez vascular, y 2) los causantes de podredumbre de raíz o tallo. En el primer grupo se incluyen las marchiteces debidas a *Fusarium oxysporum*, *F. lateritium*, *Verticillium albo-atrum* y *Acrophialophora fusicarpa*, aunque en este último caso no se especifica la naturaleza vascular de las infecciones. En el segundo grupo se incluye marchitez en sentido amplio y podredumbres radicales debidas a *F. solani*, *F. avenaceum*, *F. arthrosporioides*, *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. moniliforme*, *Neocosmopora vasinfecta* y *Macrophomina phaseolina*. Así como otros causantes de podredumbres radicales como *Rhizoctonia solani*, *R. violácea*, podredumbre de cuello *Sclerotium rolfsii*, podredumbre de cuello y raíz *Ozonium texanum* var.

parasitium, podredumbre de pie *Operculella padwickii*, *Trichoderma harzianum*, podredumbre de tallo *Sclerotinia sclerotiorum*, podredumbre de raíz y muerte de plántulas *Pythium* spp., *Phytophthora* spp. (Nene *et al.*, 1978)

Entre los agentes abióticos que han sido considerados capaces de inducir síntomas normales incluidos en el complejo MPR, cabe citar a heladas, deficiencia de nutrientes, salinidad, altas temperaturas y condiciones desfavorables del suelo (principalmente temperaturas altas y bajo contenido de agua disponible) (Nene *et al.*, 1978).

Aunque cualquiera de los agentes citados anteriormente puede tener individualmente gran importancia, con frecuencia, las referencias sobre este complejo de enfermedades hacen alusión a la asociación de varios organismos en la misma planta (Chandra *et al.*, 1974).

Fusarium oxysporum

Fusarium oxysporum (FO) es la especie más dispersa de las especies del género *Fusarium* y se puede encontrar en la mayoría de los suelos; desde el ártico, trópico o desierto, y en suelos con o sin cultivo, lo que representa su relevancia de distribución ocasionando la marchitez o fusariosis vascular (Sing *et al.*, 2014). Tanto su dispersión como su importancia económica ha hecho a FO la especie con más investigaciones científicas, con alrededor de 6,000 artículos (Leslie y Sumerell, 2006).

Clasificación de *F. oxysporum*

El género fue descrito por primera vez por Link en 1809 (Leslie *et al.*, 2001).

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Nectriaceae

Género: *Fusarium*

Especie: *oxysporum*

Las formas especiales de *Fusarium* son cepas morfológicamente indistinguibles que se caracterizan por su adaptación a diferentes hospedantes (Deighton *et al.*, 1962).

Generalidades de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*

Fusariosis Vascular

La fusariosis vascular del cultivo de garbanzo se produce en 32 países de 6 continentes (Sing *et al.*, 2014). Fue reportado por primera vez en la India por Butler en la 1918, pero su etiología no se determinó correctamente hasta 1940 por Padwick (Cunington *et al.*, 2007). Según Haware y Nene (1982) las epidemias de marchitamiento por *Fusarium* o fusariosis vascular puede ser devastadoras para los cultivos y causa pérdidas de hasta el 100 % en condiciones favorables.

Sintomatología de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

Fusarium oxysporum f.sp. *ciceris* (razas 1A, 2,3,4,5 y 6). Se caracteriza por un desarrollo rápido de la enfermedad presentando flacidez de las hojas, seguida por desecación de hojas y tallos, que adquieren un color grisáceo produciéndose finalmente la muerte de la planta. Los tejidos vasculares (xilema) y de la médula muestran decoloración, generalmente evidente en las secciones transversales del tallo cerca de la base. Un examen cuidadoso de las raíces infectadas puede diferenciar el marchitamiento por *Fusarium* de otras enfermedades de las plántulas y raíces del garbanzo. La marchitez se puede observar dentro de los 25 días de la siembra en el suelo infectado (Nene *et al.*, 1978).

Fusarium solani

Fusarium solani (Mart.) Appel & Wollenw. es un hongo de suelo que ha sido descrito como patógeno en una amplia variedad de vegetales, así como en

humanos y animales (Aoki *et al.*, 2014). Al igual que para *F. oxysporum*, en *F. solani* se han descrito distintas formas especiales basándose en su rango de huéspedes. Tanto su plasticidad genética como su diversidad metabólica son las responsables de su alta capacidad para adaptarse a una amplia variedad de escenarios medioambientales, siendo capaces de degradar hidrocarburos, compuestos orgánicos de flúor, lignina, cianuros de metales e incluso plaguicidas en el suelo (Mitra *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2002).

Clasificación de *F. solani*

La especie *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. fue descrita por primera vez por Von Martius en 1842 como *Fusisporium solani* de tubérculos podridos de papa, *Solanum tuberosum*. La especie fue transferida al género *Fusarium* por el micólogo italiano Piers Andrea Saccardo en 1881. *F. solani* fue reubicado por Snyder y Hansen en 1941 para incluir un grupo complejo de especies que están ampliamente distribuidas en los suelos y causan pudrición de tubérculos, raíces y tallos de plantas en todo el mundo. Hay al menos 50 linajes de subespecies (Desjardins, 2006).

El rango taxonómico de *Fusarium solani* es el siguiente:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Nectriaceae

Género: *Fusarium*

Especie: *solani*

Generalidades de *Fusarium solani*

Podredumbre de Raíz

Esta enfermedad se conoce con el nombre de podredumbre negra de raíz o podredumbre de pie. Aunque posiblemente haya sido conocida desde los primeros trabajos sobre la MPR del garbanzo, en los que se citaban diferentes especies de *Fusarium* (Prasad y Padwick, 1939), su diagnóstico no se concretó hasta que Kraft en 1969 identificó la patogenicidad de *F. solani* sobre garbanzo.

Sintomatología de *Fusarium solani*

Los síntomas de la pudrición de la base del tallo por *Fusarium* son similares a aquellos de la pudrición de la raíz “Buckeye”, y aparecen primero en plantas maduras con clorosis intravenosa y necrosis de las plantas. En casos severos, las hojas se tornan café y colapsan, y toda la planta puede morir. En la raíz primaria y en las raíces laterales más importantes hasta 30 cm por debajo del nivel del suelo se forman lesiones rojizas o café oscuro (Brayford y Bridge, 1989). La decoloración vascular interna puede extenderse entre 2 y 10 cm más allá de las lesiones.

Macrophomina phaseolina

M. phaseolina es un hongo de suelo, termófilo, mundialmente distribuido y polífago. En general, la temperatura óptima de crecimiento es de 30-37°C, aunque depende del aislamiento utilizado (Dhingra y Sinclair, 1978). Su gama de huéspedes es extremadamente amplia, comprendiendo desde plantas leñosas a herbáceas anuales (Reichert y Hellinger, 1947).

Este hongo causante de la podredumbre carbonosa se presenta principalmente bajo dos estados: uno picnódico (*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich) y otro esclerocial, mucho más frecuente (*Sclerotium bataticola* Taub.).

Clasificación de *M. phaseolina*

La taxonomía de *M. phaseolina* ha sido revisada frecuentemente en los últimos 100 años (Kaur *et al.*, 2012). Existe un reporte no confirmado de un teleomorfo llamado *Orbilia obscura* (Ghosh *et al.*, 1964), sin embargo, desde entonces no hay ninguna evidencia que confirme la presencia de fase sexual en *M. phaseolina* (Mihail, 1992). Estudios moleculares indican que existe una baja variabilidad genética entre aislados (Su *et al.*, 2001; Jana *et al.*, 2005).

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Botryosphaerales

Familia: Botryosphaeriaceae

Género: *Macrophomina*

Especie: *phaseolina*

Generalidades de *M. phaseolina*

Podredumbre Carbonosa de Raíz

La enfermedad se conoce también como podredumbre seca de raíz (Nene *et al.*, 1978) y ha sido citada en Australia, EE.UU., Etiopía, India, Irán, Líbano, México, Siria y Turquía (Nene, 1980).

Fue citada por primera vez en la India (Dastur, 1935) donde ha sido tradicionalmente conocida como “*Rhizoctonia-wilt*” (Van Der Maesen, 1972). Debido a que también ha sido generalmente confundida con otras enfermedades del complejo MPR, no existen datos específicos sobre pérdidas que origina, aunque se suele destacar como una de las enfermedades más importantes del garbanzo en las regiones semiáridas de los trópicos (Icrisat, 1981).

Sintomatología de *M. phaseolina*

Los síntomas causados por *M. phaseolina* en el cultivo de garbanzo son poco específicos y similares a los de cualquier otro patógeno que afecte al sistema vascular; marchitez general, necrosis y muerte de las hojas viejas, parada del crecimiento, colapso de los haces vasculares y muerte de las plantas (Koike, 2008). En un corte transversal a la corona de las plantas afectadas se puede observar una necrosis de color marrón oscuro en la zona vascular de la misma (Mertely *et al.*, 2005).

A pesar de que es un patógeno cosmopolita es capaz de infectar a más de 500 especies botánicas de plantas (Dhingra y Sinclair, 1975).

Medidas de Control de Enfermedades en el Cultivo de Garbanzo.

Control de la Enfermedad

Las medidas de control preventivas pueden contrarrestar en gran medida los problemas fitopatológicos (García-Medina, 2002), dentro de estas se puede mencionar; rotación de cultivo, uso de semilla tratada con fungicida, evitar encharcamiento por mal drenaje, mala sistematización o exceso de agua de riego, evitar que el agua de riego toque el cuello de la planta.

El uso apropiado de semillas tratadas con fungicidas puede proveer una protección efectiva mejorando el establecimiento del cultivo con una buena relación beneficio-costo.

Fungicidas tales como Captan y Metalaxyl son etiquetados para la prevención de muchos hongos que atacan a plántulas. Captan tiene actividad contra *Pythium* spp., *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*, mientras que Metalaxyl tiene actividad específica contra *Pythium* spp., que atacan tanto a plántulas como a plantas maduras (Muehlbauer and Tull, 1997).

El método más práctico y económicamente eficiente para el control de la Fusariosis Vascular del garbanzo es la utilización de cultivares resistentes (Landa

et al.,2006). Sin embargo, la efectividad y la utilización de este método de control puede ser limitada por la gran variabilidad patogénica de las poblaciones de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, así como por las características agronómicas indeseables de algunos de los cultivares desarrollados (Haware y Nene, 1982).

Extractos Vegetales Como Fungicidas

El empleo de extractos vegetales para el control de plagas y enfermedades en el marco de una agricultura sostenible constituye una alternativa promisoría, debido a su elevada efectividad, bajo costo y no ser contaminantes del ambiente.

Estos bioproductos se caracterizan por la presencia de determinados compuestos de origen natural, los cuales forman parte de las estrategias defensivas de las plantas (Villalobos,1996) y son agrupados en compuestos nitrogenados, fenólicos y terpenoides (Harborne, 1993). Dichos compuestos le proporcionan importantes características a los extractos, como son antiapetitivos (Dominí, 1995), antivirales, antimicrobianos o repelentes, que permiten su utilización para proteger los cultivos e incrementar la calidad y su producción alimentaria, ya que tienen la propiedad de ser menos tóxicos y más fácilmente degradables (Funes, 1997).

El uso de plantas consideradas malezas, tales como el aroma amarillo (*Acacia farnesiana*) y la escoba amarga (*Parthenium hysterophorus*), las cuales compiten con los cultivos por el espacio, los nutrientes y la luz solar, resulta una fuente económica e interesante para la obtención de extractos vegetales con actividad antimicrobiana (Leara *et al.*, 1995). Esta alternativa contribuye además a la explotación y disminución de estas especies que, de lo contrario, deben ser eliminadas de los campos sin ningún provecho para la economía.

Ligustrum lucidum

El *ligustro* es un árbol originario de China, Japón y Corea que se ha distribuido ampliamente en Uruguay (Aldabe *et al.*, 2008). Es una especie leñosa, perenne, perteneciente a la familia *Oleaceae*, *ornitócora*, de alto poder germinativo, que

crece rápidamente y alcanza grandes alturas, y puede prosperar bajo condiciones de sol y sombra (Aragón y Groom, 2003). Esta especie está presente en México desde el siglo XIX, fue muy utilizado para cercos vivos y como ornamental (Nebel y Porcile, 2006).

Clasificación Taxonómica

El género *Ligustrum* es uno de los 25 géneros que forman parte de la familia *Oleaceae*. Esta familia ha variado su posición taxonómica, aunque actualmente está en el orden *Lamiales*.

Reino: Plantae

Phylum: Traqueophyta

Clase: Spermatophyta

Orden: Lamiales

Familia: Oleaceae

Género: *Ligustrum*

Especie: *lucidum*

Composición Fitoquímica

Muchas plantas contienen una variedad de metabolitos secundarios, presumiblemente como sustancias químicas de defensa que a veces son tóxicas o desventajosas para los herbívoros (Konno *et al.*, 2001). Las hojas del *ligustro* contienen un 3% de oleuropeína, un glucósido secoiridoide fenólico (Konno *et al.*, 1998). Las investigaciones fitoquímicas han demostrado que el género contiene principalmente glucósidos iridoideos, triterpenoides pentacíclicos y feniletanoides.

Moringa oleífera

M. oleífera es un árbol perenne (CABI, 2019), de rápido crecimiento y resistente a la sequía que es considerado como una especie invasora en algunos países (Oviedo *et al.*, 2012), pero que es nativa de las regiones tropicales y subtropicales

del sur de Asia (CABI, 2019). Tiene ramas colgantes quebradizas, con hojas color verde claro, compuestas, tripinnadas, de 30 a 60 cm de largo. Produce vainas colgantes divididas en 3 partes que contienen aproximadamente veinte semillas cada una. Una vez secas, las semillas son de color marrón oscuro con tres alas.

Clasificación Taxonómica

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Capparales

Familia: Moringaceae

Género: *Moringa*

Especie: *oleífera lam*

Composición Fitoquímica

Recientemente se ha demostrado la presencia, en *M. oleífera* de importantes fitoquímicos responsables de sus propiedades curativas. En uno de los primeros estudios exhaustivos sobre la composición química de esta especie se reveló que es rica en varias sustancias muy peculiares, como glucosinolatos, isotiocianatos, flavonoides, antocianinas, proantocianidinas y cinamatos (Benett *et al.*, 2003) también se incluyó la distribución de fitoquímicos en las distintas partes del árbol. Varios de los compuestos identificados pueden considerarse nutracéuticos, ya que son útiles tanto en la nutrición como en la salud humana. Por ejemplo, el 4-(4'-O-acetil- α -L-ramnopiranosiloxi)-isotiocianato de bencilo, el 4-(α -L-ramnopiranosiloxi)-isotiocianato de bencilo, el isotiocianato de bencilo y el 4-(α -L-ramnopiranosiloxi)-glucosinolato de bencilo presentan actividad anticancerígena, hipotensiva y antibacteriana. El alto contenido de vitaminas, minerales y otros fitoquímicos como vainillina, ácidos grasos omega, carotenoides, ascorbatos, tocoferoles, β -sitosterol, ácido octacosanoico, moringina, moringinina y fitoestrógenos también es un factor importante en los efectos terapéuticos de *M. oleífera* (Fahey, 2005).

Sorghum bicolor

El sorgo es uno de los granos más importantes hoy en día debido a su utilidad para la elaboración de alimento ya sea ganadero, avícola y en algunos países humano. Sin embargo, las variedades de sorgo con alto contenido de taninos afectan los sabores y el valor nutricional de los alimentos en animales de un solo estomago (monogástricos); dándoles un mercado muy pequeño, puesto que esto hace que el consumidor evite este tipo de productos por sus sabores desagradables (Cruz Valdez, 2012). Por otro lado, estos compuestos están en diferentes formas hidrolizable / condensada, están presentes en la formación del grano. También como es comentado por Reyes-Sánchez (2000), las concentraciones de proteínas dentro de los granos del sorgo son mayores que el maíz, pero dentro de la cáscara o cubierta es donde se encuentran las concentraciones altas de taninos.

Clasificación Taxonómica

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Poales

Familia: Poaceae

Género: *Sorghum*

Especie: *bicolor*

Composición Fitoquímica

Los distintos tipos de polifenoles incluyen: flavonoides, anthocyanidina, leucoanthocyanidina y taninos-condensados (Rooney *et al.*, 1980). Los compuestos fenólicos pueden ser divididos en tres grupos básicos: ácidos fenólicos, flavonoides y taninos.

Métodos Convencionales de Extracción

Los métodos convencionales de extracción incluyen la maceración, infusión y reflujo (Wong *et al.*, 2015) así como el uso de Soxhlet, arrastre por vapor, entre otros. En resumen, se puede decir que los métodos convencionales son laboriosos, consumen mucho tiempo, así como una gran cantidad de solventes orgánicos poco amigables al medio ambiente y generan una extracción de bajos rendimientos (Patil y Akamanchi, 2017) e involucran la degradación de constituyentes termo-lábiles (Wong *et al.*, 2015).

De esto deriva la importancia de obtener fitoquímicos de manera eficaz, sustentable y con el menor uso de recursos posible, recurriendo así al uso de tecnologías alternativas para su extracción.

Métodos Alternativos de Extracción

El término de tecnología alternativa hace referencia a técnicas diferentes a las convencionales, cuyas características son la reducción en el consumo de energía y el uso de solventes alternativos que aseguren la calidad de los extractos (Saini *et al.*, 2014), con lo cual se ubican estas técnicas dentro del área de la química verde, la cual busca reducir riesgos químicos, disminuir los efectos adversos, así como disminuir en lo posible, el consumo de recursos no renovables (Manahan, 2007).

De esta manera se han venido desarrollando técnicas de extracción asistidas por ultrasonido, microondas y presión (Patil y Akamanchi, 2017), que además van acordes a los principios verdes de la ecoextracción (Périno *et al.*, 2016).

La técnica de ultrasonido ofrece múltiples ventajas como su fácil y rápida manipulación, consumo de poca energía y gran eficiencia (Patil y Akamanchi, 2017), así como buenos rendimientos en cortos periodos y a bajas temperaturas (Toma *et al.*, 2001), selectividad y mejoramiento en la calidad de los extractos (Wong *et al.*, 2015). Es recomendable para compuestos de tipo orgánicos volátiles y semi-volátiles.

No obstante, hay que mencionar que una desventaja del ultrasonido es el necesario empleo de solvente (Périno *et al.*, 2016).

Por su parte, la extracción asistida por microondas es una técnica eficiente e innovadora para la hidrodestilación de aceites esenciales y facilita la obtención de compuestos sin quitar calidad al sustrato. Posee un rápido sistema de calentamiento que permite tener control de la temperatura para evitar gradientes y degradaciones térmicas. Además, es una técnica enfocada a llevar a cabo protocolos ecológicos, ya que ahorra el consumo de tiempo y energía (Périno *et al.*, 2016).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de Material Vegetal

Hojas frescas de Trueno (*Ligustrum lucidum*) fueron colectadas en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), localizada en 25° 37'N, 101°03'32" W, a una altitud de 1,786 m.s.n.m. y trasladadas a los laboratorios del Departamento de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas UAdeC, donde se seleccionaron, para ser sometidas a deshidratación por un periodo de dos semanas a temperatura ambiente, posteriormente se pulverizaron y tamizaron (RO-TAP; TYLER), utilizando un tamiz de 150 micras. Las hojas de Moringa (*Moringa oleífera*) fueron obtenidas en Ciudad Obregón, Sonora, localizado en 27°29' N, 109° 59' W, a una altitud de 37 m.s.n.m. y trasladadas al laboratorio, realizándose el proceso ya mencionado, de la misma manera se realizó usando granos de Sorgo (*Sorghum bicolor*) con alto contenido de taninos, que se obtuvieron de una siembra comercial con la variedad BRS-72 de Monsanto en la Ciudad de Tecomán, Colima ubicado en 18° 54' 51" N y 103° 52' 30" W, a una altitud de 33 m.s.n.m.

Extracción Asistida Mediante Ultrasonido–Microondas

El material pulverizado de cada especie de la investigación se colocó en el reactor con las cantidades obtenidas de las relaciones que se muestran en el Cuadro 2 y se introdujo en el equipo de ultrasonido y microondas (Nanjing ATPIO Instrumens Manufacture Co., Ltd Company, China) bajo las siguientes condiciones: Ultrasonic (VS): Power Radio 20, Ultrasonic on Relay 10, Ultrasonic off Relay 3, Amplitud off Relay 25 y Set Time 20. Microwave (MV): Power Radio 800, Display power 0, Set Temp 70°C y Holding Time 5. Después del proceso de ultrasonido y microondas las muestras, a continuación, las muestras fueron filtradas a través de tela de organza, recuperándose aproximadamente 700 ml de la extracción de cada especie. En seguida los extractos fueron almacenados en un ultracongelador a una temperatura de -70°C.

Cuadro 2. Descripción de las relaciones soluto-solvente de la extracción asistida mediante Ultrasonido – Microondas.

No.	Etanol (%)	mL:1 g de muestra	Muestra* (g)	Relación
1. <i>L. lucidum</i>	70% (Alto)	16 (Alto)	62.50	Alto x alto
2. <i>S. bicolor</i>	70% (Alto)	8 (Bajo)	125.00	Alto x bajo
3. <i>M. oleífera</i>	70% (Alto)	16 (Alto)	62.50	Alto x alto

* muestra en un litro de agua destilada

Cromatografía en Columna con Amberlita

La cromatografía en columna se llevó a cabo utilizando como fase estacionaria amberlita XAD- 16N previamente activada con metanol durante 10 minutos y colocada en la columna. A continuación, se colocaron 300 ml del extracto en la parte superior de la columna y se agregó agua destilada como fase móvil para eliminar compuestos hidrosolubles y en seguida se agregó etanol para la recuperación del contenido polifenólico de acuerdo con De Asmundis *et al.* (2011).

Recuperación de Extracto Seco

Una vez obtenida la fracción etanólica, ésta se repartió en recipientes de vidrio y se secaron en estufa a 60°C, sin exponer a la luz por 24 a 48 horas. Finalmente se colectó el extracto seco en forma de polvo en un frasco ámbar a temperatura ambiente para su posterior análisis.

Caracterización de Fitoquímicos Presentes en los Extractos Vegetales Mediante Cromatografía de Líquida RP-HPLC-ESI-MS

El análisis por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa se realizó siguiendo la metodología de Ascacio *et al.*, 2016, que consiste en utilizar un sistema de HPLC Varian que incluye un inyector automático (Varian ProStar 410, EE.UU.), una bomba ternaria (Varian ProStar 2310, EE.UU.) y un decantor PDA (Varian ProStar 330, EE.UU.). También se utilizó un Espectrómetro de Masas

con trampa de iones de cromatógrafo de líquidos (Varian 500 – MS IT Mass Spectrometer, EE.UU.) equipado con una fuente de iones por electropulverización. Se inyectaron muestras (5 μ L) en una columna Denali C18 (150 mm x 2.1 mm, 3 μ m, Grace, EE.UU.). La temperatura del horno se mantuvo a 30 °C. Los eluyentes fueron ácido fórmico (0.2 %, V/V; disolvente A) y acetotrilo (disolvente B). Se aplicó el siguiente gradiente: inicial, 3 % B; 0 – 5 min, 9 % B lineal; 5 – 15 min, 16 % B lineal; 15 – 45 min, 50 % B lineal. Después la columna se lavó y se reacondicionó, el caudal se mantuvo a 0.2 ml/min y la elución se controló a 245, 280, 320 y 550 nm. Se inyectó todo el efluente (0.2 ml/min) en la fuente del espectrómetro de masas, sin dividir.

Todos los experimentos de EM se llevaron a cabo en modo negativo $[M-H]^{-1}$. Se utilizó nitrógeno como gas nebulizador y helio como gas amortiguador. Los parámetros de la fuente de iones fueron: voltaje de pulverización 5.0 kV y voltaje capilar y temperatura fueron 90.0 V y 350 °C, respectivamente. Los datos se recopilaron y procesaron utilizando el Software MS Workstation (V 6.9). Las muestras se analizaron en primer lugar en modo de barrido completo adquiridas en el rango m/z 50 – 2000.

Obtención e Identificación de las Cepas de *F. oxysporum*, *F. solani* y *M. phaseolina*

Las cepas empleadas en los bioensayos fueron aisladas de plantas de garbanzo con síntomas de marchitamiento y amarillamiento, localizadas en el Valle del Yaqui, Latitud 27°29'185' N Longitud 109°56'45' O. Pequeños trozos de raíces de plantas con síntomas de la enfermedad, se desinfectaron con una solución de cloro al 3 % durante 3 min, posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces y se dejó secar sobre papel sanita estéril en una cámara de transferencia. Una vez secos se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) y se incubaron por tres días a 28°C. Finalmente el aislamiento se realizó mediante punta de hifa para la cepa de *M. phaseolina* y para las cepas de *Fusarium* por medio de cultivo monosporico. La identificación morfológica se realizó mediante la observación al microscopio de las estructuras,

utilizando las claves taxonómicas de Leslie y Summerell (2006) para el género de *Fusarium*; para la caracterización de *M. phaseolina* se siguió la descripción realizada por Mier *et al.*,2015.

Identificación Molecular Mediante PCR y Amplificación Aleatoria de Polimorfismo del ADN (RAPD)

Para la extracción del ADN de cada uno de los aislados de los hongos, se utilizaron cultivos de micelio puro crecidos en 50 mL de caldo papa dextrosa, incubados a 25°C durante ocho días. Al término de este tiempo, los cultivos se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y la pastilla celular se lavó con PBS. La lisis de la muestra se realizó con 3 ciclos de congelamiento-calentamiento (-80°C, 75°C) durante 15 min, maceración e incubación por 15 min en buffer TES (Tris-HCl 50 Mm pH 7.5, EDTA 20 Mm, SDS 1%). El ADN total del micelio se obtuvo por purificación con el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se precipitó con etanol. La determinación de la concentración y calidad del material genético se realizó por espectrofotometría (EPOCH; BioTek).

Para la identificación de *M. phaseolina* y *F. solani* se utilizaron oligonucleótidos específicos que amplifican para una región conservada adyacente al gen 5.8 S y el gen TEF-1 α , respectivamente (Babu,2007) y Arif, 2012). La amplificación se realizó por PCR con la enzima Taq ADN polimerasa (qARTA Bio) y 100 ng/ μ L de material genético, utilizando las condiciones de amplificación descritas por estos autores: 25 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento a 56°C por 1 min, extensión a 72°C por 2 min, y un paso de extensión final a 72°C por 10 min para *M. phaseolina* y 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 58°C por 1 min, extensión a 72°C por 2 min para *F. solani*. Aparte, la identificación de las razas patogénicas de *Fusarium oxysporum* f. *sp. ciceris* se realizó mediante la técnica de amplificación aleatoria de polimorfismo del ADN (RAPD) utilizando los marcadores OPF y OPI, en donde se distinguen las razas mediante la ausencia o presencia de patrones electroforéticos con la misma movilidad; las condiciones de amplificación fueron las siguientes,

desnaturalización a 94° C por 4 min, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 min, alineamiento a 40°C por 1 min, extensión a 72°C por 3 min y extensión final a 72°C por 7 min (Jiménez-Gasco, 2001). Los productos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa (Ultra Pure Agarose Invitrogen) al 1%, en amortiguador TAE. Los geles fueron teñidos con nucleic acid gel stain (Invitrogen). Las bandas correspondientes de los productos amplificados fueron observadas con luz UV. Se capturaron las imágenes con cámara digital (UVP; GDS - 8000).

Actividad Antifúngica de los Polifenoles Vegetales Contra *M. phaseolina* por el Método de Medio Envenenado.

Se determinó la actividad antifúngica por el método de medio envenenado propuesto por Jasso de Rodríguez *et al.*, (2011); los tratamientos de los polifenoles obtenidos de: *Ligustrum lucidum*, *Moringa oleifera* y *Sorghum bicolor* fueron en concentraciones de 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L, 500 mg/L y 600 mg/L: con cuatro repeticiones por tratamiento. Primero se determinó la concentración y el volumen para cada uno de los polifenoles y se añadió a un matraz con la cantidad requerida de PDA estéril. Posteriormente, se colocaron discos de 0.4 cm de diámetro con micelio activo del hongo de siete días de crecimiento; finalmente se incubaron a 28 ± 2 °C hasta que el testigo absoluto lleno la caja por completo. Se determinó el porcentaje de inhibición mediante la siguiente formula:

$$\text{Porcentaje de Inhibición} = (\text{DC} - \text{DT} / \text{DC}) * 100$$

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

Actividad Antifúngica de los Polifenoles Vegetales Contra *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* y *F. solani* por el Método de Microdilución en Placa

Se utilizó el método de microdilución en placa adaptada de las técnicas propuestas por Masoko *et al.* (2005) y Gabrielson *et al.* (2002). Para esto se usaron placas de poliestireno de 96 pozos. El procedimiento inició colocando 100 µL de medio líquido sabouraud en todos los pozos de la placa; posteriormente

cada grupo de polifenoles se preparó a una concentración de 2000 mg/L utilizando etanol como solvente; posteriormente se colocaron 100 µL de los polifenoles preparados a 2000 mg/L en la columna cuatro, se mezclaron y se volvió a tomar 100 µL, y se transfirieron a la siguiente columna y así sucesivamente realizando diluciones seriadas al 50 % hasta la columna 12, teniendo como resultado concentraciones de 1000 mg/L, 500 mg/L, 250 mg/L, 125 mg/L, 62.5 mg/L, 31.2 mg/L, 15.6 mg/L, 7.8 mg/L y 3.9 mg/L; el siguiente paso fue agregar 40 µL de 2,3,5- cloruro de trifeniltetrazolio como revelador de crecimiento a todos los pozos; finalmente a partir de la columna dos se colocó una solución de esporas de *F. oxysporum* y *F. solani* a una concentración de 1×10^8 . Cada placa se consideró una repetición, y se realizaron tres repeticiones por tratamiento; se incubaron a 28 °C por 48 h y finalmente se realizó una lectura de absorbancia a 490 nm en espectrofotómetro. Se consideró crecimiento positivo del hongo a los tratamientos donde el pozo presentó un color rosado y negativo a los que no presentaron ningún color, además de sus respectivos valores de absorbancia. El porcentaje de inhibición se calculó adaptando la fórmula propuesta por Moreno-Limón *et al.* (2011), considerando que el porcentaje de inhibición es el inverso del porcentaje de crecimiento.

Porcentaje de crecimiento = $(A - B) / C (100)$

Donde A = Absorbancia de tratamiento, B = Absorbancia del testigo negativo, C = Absorbancia del testigo positivo

Porcentaje de inhibición = $100 - \text{Porcentaje de crecimiento}$

Análisis Estadístico

Se realizó un análisis Probit para determinar la concentración inhibitoria al 50 % de cada extracto; posteriormente con los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza con las concentraciones inhibitorias utilizando pruebas de Tukey ($p < 0.05$).

Efectividad Biológica de Polifenoles Vegetales Bajo Condiciones de Invernadero

Establecimiento de Ensayo

El ensayo se realizó durante el ciclo otoño-invierno del 2020, bajo condiciones de invernadero en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Saltillo Coahuila.

Material Vegetativo

Se utilizaron plantas de garbanzo blanco variedad Blanoro, las cuales fueron utilizadas 25 días después de la siembra y contaban con una altura de 10 cm al momento del trasplante.

Sustrato

Se utilizaron bolsas negras de plástico N° 4, las cuales contenían 4 kg del sustrato; considerando una relación de 60 % tierra y 40 % fibra de coco. El sustrato fue previamente pasteurizado 80 °C – 10 min con tres repeticiones.

Diseño Experimental

Se estableció un diseño de bloques completos al azar con cinco tratamientos (Cuadro 3), tres bloques y nueve repeticiones por tratamiento. Los tratamientos utilizados fueron los que mejor porcentaje de inhibición mostraron durante los ensayos *in vitro*. Todos los datos de las variables evaluadas se sometieron a análisis de varianza y prueba de comparación de medias.

Inoculación y Trasplante

Las plantas de los tratamientos T1 al T4 fueron inoculadas antes del trasplante, realizando un corte de 2 cm en las raíces, colocándolas por 3 minutos en una solución de esporas de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* y *F. solani* a una concentración de 1×10^8 . Para la inoculación de *M. phaseolina* se utilizaron 6 granos de sorgo

previamente infectados en el laboratorio (Pineda *et al.*, 2005) por cada planta, los cuales se colocaron cerca de la raíz de las plantas colocadas en las macetas.

Cuadro 3. Tratamientos utilizados para estudiar el efecto antifúngico de polifenoles obtenidos de diferentes fuentes vegetales contra el complejo de marchitez y pudrición de raíz en garbanzo

	Tratamientos	Concentración
T1	<i>Ligustrum lucidum</i>	340 mg/L
T2	<i>Moringa oleífera</i>	430 mg/L
T3	Testigo químico (Benomil)	1 g/L
T4	Testigo inoculado	-
T5	Testigo absoluto	-

Aplicación de los Tratamientos

Los tratamientos fueron aplicados mediante bombas aspersoras de 2 L marca Lion Tools®. Las aplicaciones fueron realizadas durante el trasplante la primera antes de colocar la planta se aplicó el tratamiento mediante tres aspersiones directamente en el orificio donde sería colocada la planta; las segunda y tercera aplicación se realizó a los 15 y 30 días después del trasplante, directamente a la base del tallo también mediante tres aspersiones.

Variables Evaluadas

Se evaluó la incidencia y severidad de la enfermedad utilizando la escala propuesta por Carrillo, 2004 (Cuadro 4). Para la evaluación de severidad en raíz se utilizó la escala propuesta por Camargo, 1999 (Cuadro 5).

Cuadro 4. Escala utilizada para determinar la incidencia y severidad causada por el complejo de hongos que ocasionan la marchitez y pudrición de raíz en plantas de garbanzo (Carrillo, 2004)

Evaluación	
Incidencia	Porcentaje de plantas afectadas.
Severidad	0: Planta sana 0% 1: Planta clorótica 25% 2: Planta marchita 50% 3: Planta con 75% de infección y síntomas en el follaje. 4: Planta muerta 100%

Cuadro 5. Escala para evaluación de severidad en raíz causada por el complejo de hongos que ocasionan la marchitez y pudrición de raíz en garbanzo (Camargo,1999)

Evaluación de raíz	
Severidad	0: Raíz sana 0% 1: Daño del 1 al 10% 2: Daño del 11 al 15% 3: Daño del 16 al 30% 4: Daño de 31 al 50% 5: Daño del 51 al 75% sistema radicular completamente obscuro.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Polifenoles Obtenidos Mediante la Técnica Asistida de Ultrasonido-Microondas

Se obtuvieron 5 extractos en polvo de polifenoles para determinar la actividad antifúngica contra la marchitez y pudrición de raíz de garbanzo, los cinco extractos fueron de origen etanólico (Cuadro 6) de los cuales se realizó una evaluación preliminar, para seleccionar los tres mejores extractos y su respectiva relación.

Cuadro 6. Polifenoles obtenidos y empleados para determinar su actividad antifúngica contra la marchitez y pudrición de raíz de garbanzo mediante el método de microdilución en placa y medio envenenado

Muestra	Relación (ml:1 g)	Polifenoles (mg)
Hojas de moringa	1:16	2400
Hojas de trueno	1:8	2150
	1:12	1890
	1:16	2065
Granos de sorgo	1:8	530

Fitoquímicos Presentes en los Extractos Vegetales, Caracterizados Mediante Cromatografía Líquida RP-HPLC-ESI-MS

Los polifenoles presentes en cada uno de los extractos y sus respectivas relaciones se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Grupos de polifenoles detectados en los extractos de tres fuentes vegetales mediante RP-HPLC-ESI-MS.

Extracto etanólico	Relación soluto – solvente	Masa	Tiempo de retención	Compuesto	Familia
<i>S. bicolor</i>	1:8	341.0	2.856	3,4-DHPEA-EA	Tirosol
		340.9	3.652	Glucosa Caffey	Ácido Hidroxicinámico
		304.7	9.431	(+)-Galocatequina	Catequina
		304.8	23.776	(-)-Epigalocatequina	Catequina
		252.9	26.878	7,4'-Dihydroxiflavona	Flavonas
		268.8	44.509	7,3',4'-Trihidroxiflavona	Flavonas
		564.1	54.302	Pelargonidin 3-O-sambubioside	Antocianinas
		540.1	55.293	Oleuropeína (posibilidad)	Tirosol
		566.1	55.731	Floretina 2'-O-xilosil-glucosido	Dihidrocalcones
			325	56.896	Glucosa p-Coumaroil
<i>M. oleífera</i>	1:16	304.2	18.67	Ácido 1-cafeoilquínico	Ácidos Hidroxicinámicos
		304.1	19.22	Ácido 3-cafeoilquínico	Ácidos Hidroxicinámicos
		341	2.28	Ácido tartárico p-coumaroil	Ácidos Hidroxicinámicos
		564.2	25.48	Quercetina 3-O-galactosida	Ácidos Hidroxicinámicos
		310	32.82	Quercetina 3-O-glucosido	Flavonol
		310	32.82	Quercetina 4'-O-glucosida	Flavonol
		755	35.29	Peonidina 3-O-(6"-acetil-galactosida)	Flavonol
		755	36.50	Peonidina 3-O-(6"-acetil-glucosida)	Antocianinas
		252.8	28.43	Delfinidina 3-O-galactosida	Antocianinas
		540.1	51.35	Bisdemetoxicurcumina	Curcuminoides
<i>L. lucidum</i>	1:8	593	31.01	Apigenina 6,8-di-C-glucósido	Flavonas
		555.1	34.73	Lariciresinol-sesquilignan	Lignanos
		347	38.63	5-Heptadecilresorcinol	Alquifenoles
		327.1	41.58	p-Cumaroil tirosina	Ácidos Hidroxicinámicos
<i>L. lucidum</i>	1:12	593	31.75	Apigenina 6,8-di-C-glucósido	Flavonas
		336.9	32.83	3-p-Ácido cumaroilquínico	Ácidos Hidroxicinámicos
		755	35.28	Quercetina 3-O-ramnosil-ramnosil-glucósido	Flavonoles
		552.9	39.19	5-Heptadecilresorcinol	Alquifenoles
<i>L. lucidum</i>	1:16	592.8	30.55	Apigenin 6,8-di-C-glucoside	Flavonas
		310.9	32.95	Ácido Cefeoil tartárico	Ácidos Hidroxicinámicos
		755	34.67	Quercetina 3-O-ramnosil-ramnosil-glucósido	Flavonas
		346.9	39.28	5-Heptadecilresorcinol	Alquifenoles

Los extractos de *Sorghum bicolor* y *Moringa oleifera* etanólicos presentaron Flavonas, Antocianinas, Ácidos Hidroxinámicos y Tirosoles; en el caso del extracto de *Ligustrum lucidum* las tres relaciones mostraron la presencia de los mismos fitoquímicos: Flavona, Alquifenoles, Ácidos Hidroxinámicos y Lignanós. Los resultados obtenidos coinciden con lo mencionado por Saravanakumar *et al.* (2015), quienes mencionan que los compuestos de tipo fenólico como las cumarinas, ligninas, flavonoides y taninos están presentes en el sistema de defensa de las plantas mediante la modificación de tejidos o pared celular proporcionando dureza o rigidez a estos.




Identificación Morfológica

Se identificaron tres especies de hongos aislados de plantas de garbanzo con síntomas de marchitez y pudrición de raíz, para la identificación de *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* y *Macrophomina phaseolina* acuerdo a sus características morfológicas (Cuadro 8).

Identificación y Caracterización Molecular de los Aislados de Hongos

La cepa de *Macrophomina* fue analizada por PCR, obteniendo amplificaciones de fragmentos de un tamaño de 350 pb esto confirma que la cepa pertenece a la especie de *M. phaseolina*, dado que los indicadores MpKF1 y MpKR1 son específicos para esta especie de hongo. De acuerdo con Babu *et al.* (2007) las secuencias de ADN obtenidas con los iniciadores específicos MpKFI y MpKRI pueden ser utilizadas para identificar de manera rápida, selectiva y específica a el hongo *M. phaseolina*. De manera similar, Zhang *et al.* (2011) y Sánchez *et al.* (2013) usaron los iniciadores específicos MpKFI y MpKRI para la identificación y detección de aislados de *M. phaseolina* en el cultivo de fresa y frijol mungo (*Vigna radiata* L.) respectivamente (Figura 1-a). Para la identificación y detección de *F. solani* se utilizó el set de primers TEFs4, con el cual se amplificó el gen TEF-1 α , mostrando un producto de 658 pb (Figura 1b), tal como lo reportó Arif *et al.*, (2012).

Cuadro 8. Caracterización morfológica de cada especie aislada de plantas de garbanzo e identificada de acuerdo a Leslie y Summerell (2006) y Santos *et al.* (2015)

Género y especie	Características de la colonia	Características microscópicas	Aislamientos
<i>Fusarium solani</i>	La colonia formada en PDA fue con color de crema y escaso micelio.	Se observaron macroconidias de 48.96 μm de longitud, robusta con los extremos redondeados con cinco septos. Las microconidias son ovaladas con un septo abundantes en el micelio aéreo.	
<i>Fusarium oxysporum</i>	La morfología de la colonia en medio PDA fue un micelio abundante de color violeta	Se observaron macroconidias de 36.12 μm de longitud con la parte apical en forma de gancho con la presencia de tres septos. Las microconidias se observaron en forma ovalada unicelular	
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Crecimiento micelial denso de aspecto veloso, al inicio de color gris oscuro y posterior mente se tornan de color negro	Muestra la presencia de microesclerocios de forma esférica de color negro, lisos, duros y de 85 – 120 μm de diámetro	

Finalmente, para la identificación de las razas patogénicas 0, 1B/C, 5, y 6 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* por la técnica de RAPD se utilizaron 7 oligonucleótidos específicos denominados OPF y OPI (Jiménez-Gasco,2001). Se examinaron todas las muestras aisladas y se evaluó el patrón de bandeo (datos no mostrados). Solamente en una muestra se observó un producto de amplificación a 900 pb con el primer OPF-10 (Figura 1c), este producto corresponde a la raza 5 de acuerdo a lo previamente reportado por Del Mar Jiménez *et al.* (2001).

Los resultados de otros estudios han demostrado que en el lugar donde se realizaron los aislamientos se han logrado identificar diferentes razas en diferentes áreas de muestreo (Arvayo – Ortiz *et al.*, 2011). Por lo tanto, los resultados obtenidos por nuestro equipo de trabajo son consistentes con estos hallazgos.

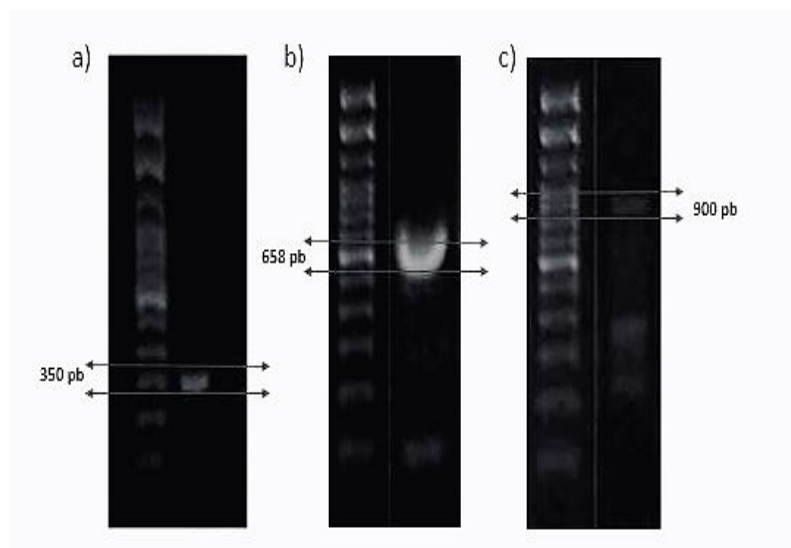


Figura 1. Identificación de los patógenos: a) *M. phaseolina* (350 pb), *F. solani* (658 pb) y c) *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (900 pb). Productos de amplificación separados en un gel de agarosa 1% y teñido con Nucleic acid gel stain (Invitrogen)

Actividad Antifúngica de Polifenoles Vegetales Contra *M. phaseolina* por el Método de Medio Envenenado.

El efecto de los polifenoles de diferentes fuentes vegetales sobre el crecimiento del hongo *M. phaseolina* se observan en la Figura 2. Como puede apreciarse los polifenoles de *L. lucidum* y *S. bicolor* mostraron total inhibición sobre el crecimiento micelial del hongo a partir de 300 ppm, mientras que los polifenoles de *M. oleífera* a la misma concentración lograron inhibir el 94.5 % del crecimiento micelial.

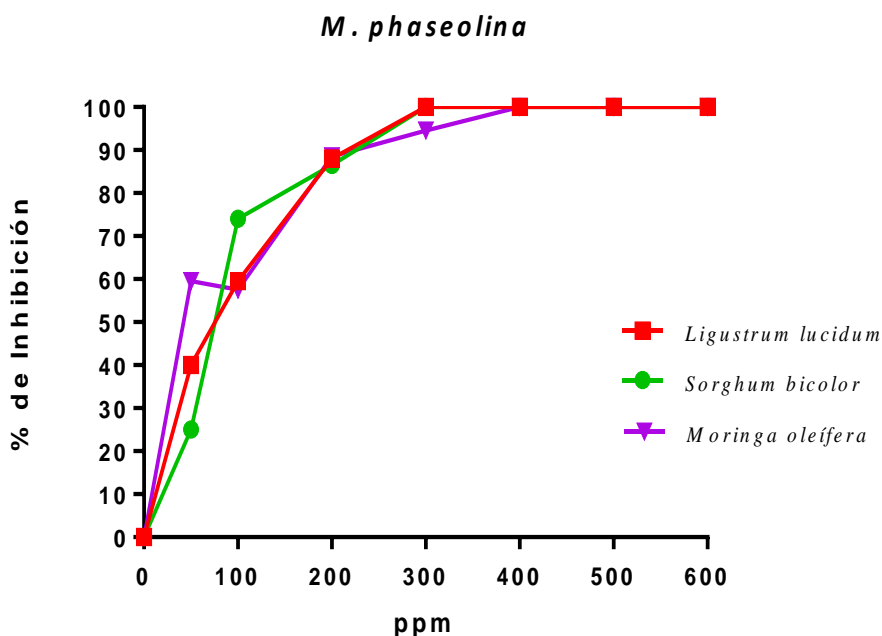


Figura 2. Porcentaje de inhibición de polifenoles obtenidos por extractos etanólicos de fuentes vegetales sobre *M. phaseolina*.

Las CI_{50} fueron desde 53.65 ppm *M. oleifera* hasta 78.09 ppm *S. bicolor* (Cuadro 9). Todos los grupos de polifenoles mostraron inhibición del crecimiento del hongo, con diferencias significativas respecto al tratamiento control (Figura 3). Los porcentajes de inhibición obtenidos en este trabajo fueron superiores a los reportados por Abreu *et al.* (2015) quienes en su investigación lograron obtener una inhibición del 60 % utilizando extractos etanólicos de paraíso (*Melia azedarach* L), moringa (*Moringa oleifera*) y nim (*Azadirachta indica* A. Juss) contra *Macrophomina phaseolina*; mientras que en el presente trabajo se obtuvo una inhibición del 100 %, utilizando polifenoles separados por cromatografía de columna.

Cuadro 9. Concentración CI_{50} de polifenoles etanólicos para inhibición de *M. phaseolina*

Extractos etanólicos	CI_{50}
<i>Sorghum bicolor</i>	79.79 a
<i>Ligustrum lucidum</i>	69.85 b
<i>Moringa oleífera</i>	53.65 c

La obtención de resultados positivos de este trabajo se asocia a la técnica de obtención de los polifenoles debido a que es una técnica en la cual se muestran buenos rendimientos en cortos periodos y a bajas temperaturas mostrando un proceso de hidratación que favorece la extracción de ciertas sustancias, ya que el ultrasonido hidrata la laminilla (presente en las membranas de células vegetales) y una vez desintegrada la laminilla, las células vegetales quedan expuestas al proceso de extracción del solvente (Toma *et al.*, 2001).

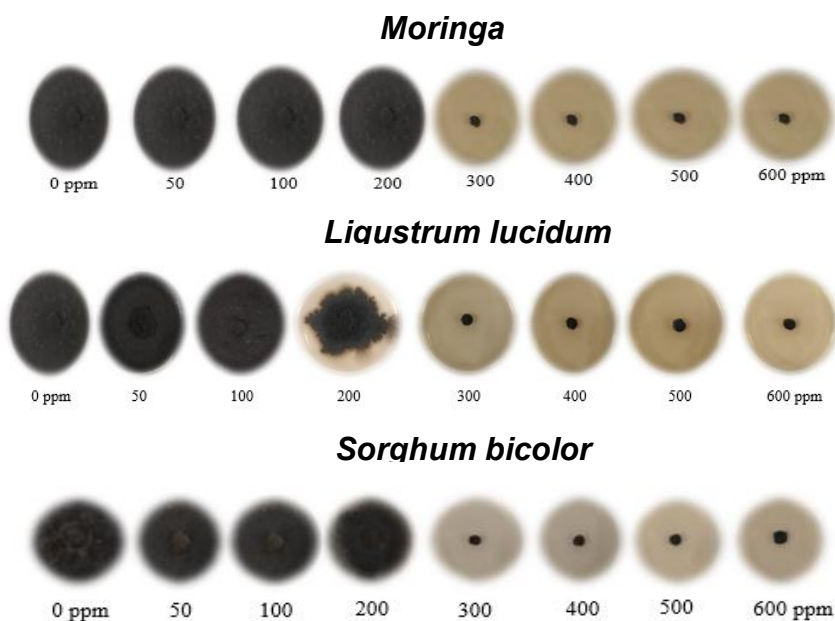


Figura 3. Polifenoles de diferentes fuentes vegetales y concentraciones utilizadas en el ensayo de medio envenenado contra *Macrophomina Phaseolina*

Actividad Antifúngica de Polifenoles Vegetales Contra *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* por el Método de Microdilución en Placa

La actividad antifúngica de los polifenoles de *Ligustrum lucidum* (hojas), *Moringa oleífera* (hojas) y *Sorghum bicolor* (granos) fueron probados contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (Figura 4). Los resultados mostraron que los polifenoles de las tres especies inhiben el crecimiento del patógeno entre 60 y 85 % a 1000 ppm. Cabe resaltar que los polifenoles de *Ligustrum lucidum* y *Moringa oleífera* fueron los que mostraron el porcentaje de inhibición más alto con 83.63 % y 82.86 % respectivamente, Mientras que *Sorghum bicolor* presentó la más baja inhibición.

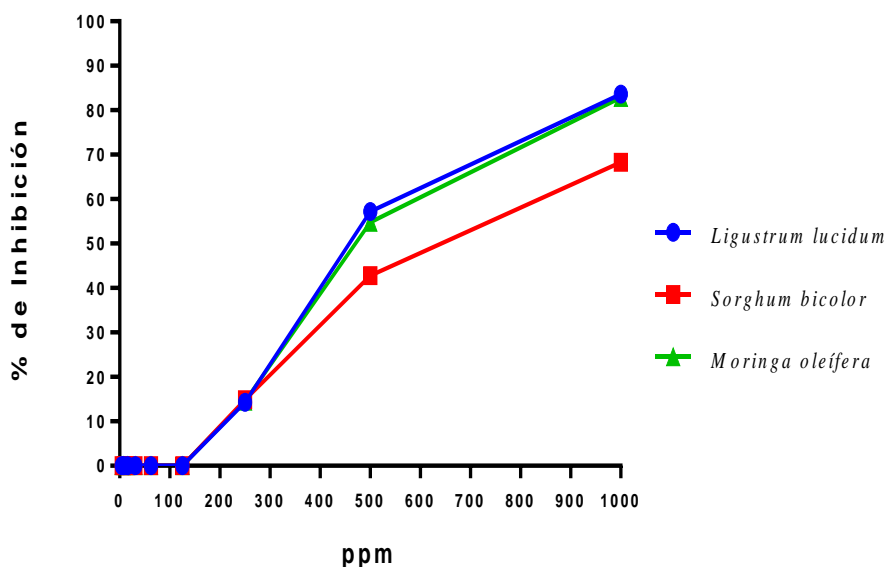


Figura 4. Porcentaje de inhibición de polifenoles de diferentes fuentes vegetales contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*

Los porcentajes de inhibición fúngica obtenidos en el presente estudio usando los extractos de polifenoles fueron superiores a los reportados por Dwivedi y Sangeeta (2015), según sus resultados el extracto de *Moringa oleífera*, *Tinospora cordifolia* y *Cymbopogon citratus* contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* una inhibición del 60.29 %; de igual forma los resultados reportados por Chandra y

Singh (2005) con diferentes extractos de plantas con los cuales solo lograron el 65 %; de inhibición de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*.

El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre las CI₅₀ de los tres extractos de polifenoles, siendo aquellos obtenidos de *Ligustrum lucidum* los que promovieron la CI₅₀ más baja y estadísticamente el mejor de los tres extractos con 491.99 ppm (Cuadro 10).

Cuadro 10. Concentración inhibitoria al 50 % (CI₅₀) de polifenoles obtenidos de diversas fuentes vegetales para la inhibición de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*

Fuente vegetal	CI ₅₀ (ppm)
<i>Sorghum bicolor</i>	628.82 a
<i>Moringa oleífera</i>	502.22 b
<i>Ligustrum lucidum</i>	491.99 c

Actividad Antifúngica de Polifenoles Vegetales Contra *Fusarium solani* por el Método de Microdilución en Placa

Se determinó el efecto de los polifenoles sobre *Fusarium solani* mediante el porcentaje de inhibición. En el análisis de varianza, la concentración inhibitoria muestra diferencias significativas entre los tratamientos, siendo el extracto de *Ligustrum lucidum* el que mostró la CI₅₀ más baja (Cuadro 11).

Los polifenoles de extractos etanólicos de *Ligustrum lucidum*, *Moringa oleífera* y *Sorghum bicolor* inhibieron al 100 % del crecimiento de *Fusarium solani* en la concentración de 1000 ppm. Lo anterior es relevante si se considera que hay productos químicos que se aplican una o más veces por semana y no logran estos resultados, incluso en condiciones de laboratorio no logran inhibir al 100 % el crecimiento del micelio, tal como lo reportan Yossen y Conles (2016) que, en su trabajo con moléculas comerciales, alcanzan una inhibición de entre el 60 y 97 %.

Cuadro 11. Concentración inhibitoria al 50 % (CI₅₀) de polifenoles de diferentes fuentes vegetales para la inhibición de *Fusarium solani*

Fuente vegetal	CI ₅₀ (ppm)
<i>Sorghum bicolor</i>	94.97 a
<i>Moringa oleífera</i>	78.03 b
<i>Ligustrum lucidum</i>	54.22 c

Resultados similares al nuestro sobre *Fusarium* spp. (Figura 5) fueron reportados por Duarte *et al.*, (2013), quienes con aceites esenciales de *Piper aduncum* subsp. *ossanum* y *Piper aurintum* inhiben totalmente el crecimiento de este hongo. Por otra parte, Zaker (2014) concluyó que el extracto etanólico de hojas de *Artemisia annua* es capaz de inhibir el crecimiento de *F. solani*.

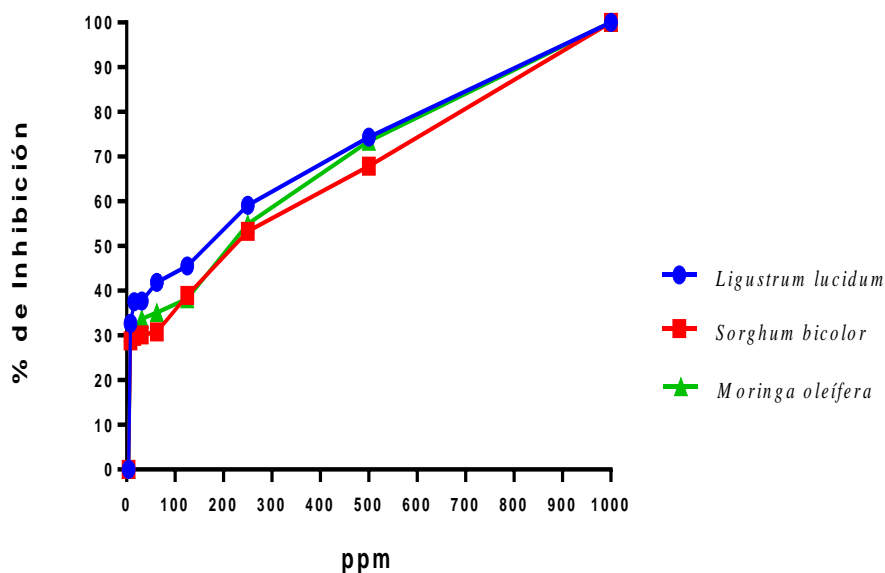


Figura 5. Porcentaje de inhibición de polifenoles de diferentes fuentes vegetales contra *F. solani*

Efectividad Biológica de los Polifenoles Vegetales Sobre MPR Bajo Condiciones de Invernadero.

Incidencia y Severidad de la Enfermedad

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6 y Figura 7, los cuales muestran que las plantas con la incidencia y severidad más baja fueron las que recibieron el tratamiento con los polifenoles de *L. lucidum* con 66 % de incidencia, el análisis de varianza muestra diferencias significativas entre los polifenoles de *L. lucidum* y el resto de los tratamientos. Los polifenoles de *M. oleífera* fueron estadísticamente iguales al testigo químico sintético e inoculado, presentando una incidencia de entre el 88 y 100 %. En cuanto a la severidad, los polifenoles de *L. lucidum* mostraron un valor de 1.42, mientras que para los polifenoles de *M. oleífera* fue de 2.3, siendo estadísticamente mayor y diferente a la severidad del testigo químico sintético e inoculado, para el caso del testigo químico sintético se puede observar que este no logra controlar la enfermedad de la marchitez y pudrición de raíz.

En la severidad de raíz (Figura 8), se pudieron observar diferencias significativas entre los tratamientos siendo los polifenoles de *Ligustrum lucidum* los que presentaron la severidad más baja con 1.42 comparada con el testigo inoculado el cual presentó una severidad de 5.0, por lo que se considera que el desarrollo de la enfermedad que se obtuvo en el experimento fue alto dado a los índices de severidad altos que mostró el testigo inoculado. En base a la identificación de los polifenoles de *L. lucidum* el cual mostró la presencia de flavonas, ácidos y alquifenoles, se considera que estos mostraron una actividad antifúngica, para los resultados obtenidos. Los polifenoles de *M. oleífera* contienen compuestos como flavonoles, ácidos hidroxicinámicos, antocianinas y curcuminas que también poseen actividad antifúngica. Por los anterior, la disminución de la enfermedad observada con los polifenoles de los diversos tratamientos aplicados, puede ser debido a la presencia de metabolitos, como los flavonoides que son un grupo de compuestos de amplio rango de actividad biológica (Lizcano,2007).

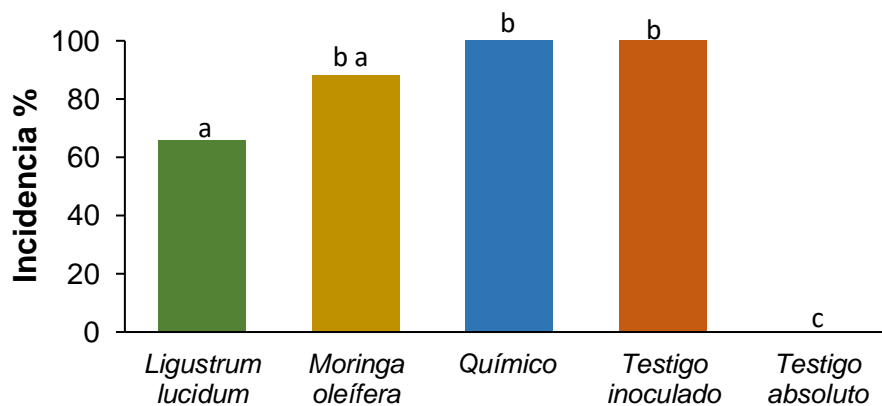


Figura 6. Incidencia de las plantas de garbanzo inoculadas con *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*, *F. solani* y *M. phaseolina* y tratadas con polifenoles vegetales bajo condiciones de invernadero



Figura 7. Severidad de la enfermedad en plantas de garbanzo inoculadas con *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*, *F. solani* y *M. phaseolina* y tratadas con polifenoles vegetales



Figura 8. Severidad de la enfermedad en raíces de garbanzo inoculadas con *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*, *F. solani* y *M. phaseolina* y tratadas con polifenoles vegetales bajo condiciones de invernadero.

Hanaa *et al.* (2011), determinaron que la aplicación de extractos vegetales de *Azadirachta indica* y *Salix babylonica*, permiten controlar la enfermedad de la marchitez causada por *F. oxysporum* en plantas de tomate, reduciendo la incidencia de la enfermedad a un 70 %, mientras que en nuestro trabajo se logro reducir la incidencia a un 66 % con la aplicación de los polifenoles de *L. lucidum*.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales en las que se desarrolló la presente investigación se puede concluir que:

1. Los polifenólicos obtenidos de *L. lucidum*, *M. oleífera* y *S. bicolor* tienen una alta actividad antifúngica ya que presentaron porcentajes de inhibición del 100% sobre *F. solani* y sobre *M. phaseolina* fueron los polifenoles de *L. lucidum* y *M. oleífera* los que presentaron una inhibición total.
2. Los polifenoles de *L. lucidum* y *M. oleífera* inhiben en un 85 % a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, mientras que *S. bicolor* solo logra inhibirlo en un 65%.
3. La sensibilidad de *Fusarium solani* a los polifenoles obtenidos, siempre fue más alta que la observada en *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*.
4. La CI_{50} obtenida más baja para *M. phaseolina* fue la de los polifenoles de *M. oleífera* con 53.65 ppm; mientras que para *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y *F. solani*, la CI_{50} más baja fue la de los polifenoles de *L. lucidum* con 491.99 y 54.22 ppm, respectivamente.
5. Los polifenoles de *L. lucidum* y *M. oleífera* disminuyen la incidencia y severidad de la enfermedad, y brindan la capacidad de tener un mejor desarrollo de las plantas.
6. Los resultados obtenidos con los polifenoles de *L. lucidum* son los primeros que se reportan para el control de enfermedades en plantas.

LITERATURA CITADA

- Agarwal, G., Jhanwar, S., Priya, P., Singh, V.K., Saxena, M.S., Parida, S.K., Garg, R. y Tyagi, A.K. and Jain, M. 2012. Comparative Analysis of Kabuli Chickpea Transcriptome with Desi and Wild Chickpea Provides a Rich Resource for Development of Functional Markers. PLoS ONE, 7, 52443.
- Águila Abreu, R., Almarales Antunez, M., y Lorenzo Nicao, M. E. 2015. Efectividad biológica in vitro de extractos naturales de plantas en el control del hongo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid; Revista Científica Agroecosistemas, 3(1):379-386. <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/article/view/24>
- Aldabe, J., Bartesaghi, L., Blanco, D., Brazeiro, A., Calvar, M., García, G., García Tagliani, L., González, E.M., Rivas, M., Scarlato, G., Soutullo, A. 2008. Biodiversidad. En: Martino, D. (ed.), GEO Uruguay: Informe del estado del ambiente, pp. 178-239. NUMA/CLAES/MVOTMA.DINAMA. Montevideo, Uruguay.
- Aoki, T., O'Donnell, K., Geiser, D. M. 2014. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. Journal of General Plant Pathology, 80(3), 189-201. Doi: 10.1007/s10327-014-0509-3
- Aragón, R., Groom, M. 2003. Invasion by *Ligustrum lucidum* (Oleaceae) in NW Argentina: early stage characteristics in different habitat types. Revista de Biología Tropical 51(1): 59-70.
- Arif, M., Chawla, S., Zaidi, M.W., Rayar, J.K., Variar, M. and Singh, EE. UU. 2012. Desarrollo de cebadores específicos para los géneros *Fusarium* y *F. solani* utilizando la subunidad de ADN_r y el gen del factor de elongación de la transcripción (TEF-1 α). Revista africana de biotecnología, 11 (2), 444-447.

- Arvayo-Ortiz, R. M.; Esqueda, M.; Acedo-Félix, E.; Sánchez, A. and Gutiérrez, A. 2011. Morphological variability and races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* associated with chickpea (*Cicer arietinum*) crops. *Am. J. Agric. Biol. Sci.*6(1):114-121.
- Ascacio-Valdés, J. A., Aguilera-Carbó, A. F., Buenrostro, J. J., Prado-Barragán, A., Rodríguez-Herrera, R., and Aguilar, C. N. 2016. The complete biodegradation pathway of ellagitannins by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. *Journal of Basic Microbiology*, 56(4), 329-336
- Basco, M.J., Bisen, K., Keswani, C., Singh, H.B. 2017. Biological management of *Fusarium* wilt of tomato using biofortified vermicompost. *Mycosphere* 8: 467-483.
- B.K. Babu, A.K. Saxena, A.K. Srivastava, D.K. Arora. 2007. Identification and detection of *Macrophomina phaseolina* by using species-specific oligonucleotide primers and probe. *Mycologia* 99: 797-803.
- Bennett R.N, F.A. Mellon, N. Foidl, J.H. Pratt, M.S DuPont, L Perkins and P.A Kroon. 2003. Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. (Horseradish tree) and *Moringa stenopetala* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3546-3553.
- Brayford, D. and P.D. Bridge. 1989. Differentiation of *Fusarium oxysporum* from *F. solani* by growth and pigmentation on media containing sugar alcohols. *LETT APPL MICROBIOL*, 9:9-12.
- CABI. 2019. Obtenido de <https://www.cabi.org/isc/datasheet/34868> (consultado el 4 de octubre del 2020)
- CABI. 2017. Invasive Species Compendium. Clasificación taxonómica del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) <https://www.cabi.org/isc/datasheet/24627>. (Consulta, noviembre 2020).

- Camargo T. 1999. Control químico de la verruga (*Synchytrium endobioticum*) y rizoctonias (*Rhizoctonia solani*) de la papa, mediante la utilización de nuevos fungicidas. Tesis Ing. Agr. Universidad Técnica de Oruro. Oruro. Bolivia.
- Carrillo, F. A. 2004. Alternativa biológica para el control de enfermedades radicales (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*) del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el Estado de Sinaloa, México. Memoria Foro Regional de Garbanzo. Guamúchil, Sinaloa, México. 87 p.
- Chandra, S., Tomer, Y. S y Malik, B. P. S. 1974: Aspects of wilt disease in gram with special refernce to Haryana state. India J. Genet. y Plant Breeding, 34: 257 – 262.
- Cobos, M. J., Rubio, J., Fernández R. M. D., Garza, R. Moreno, M.T., Millán, T. y Gil, J. 2007. Genetic análisis of seed size, yield and days to flowering in chickpea reconbinant inbredline population derived from a Kabuli and Disi cross. Ann. Appl. Biol.,151, 33 – 42.
- Cunnington, J., Lindbeck, K. y Jones, R. H. 2007. National Diagnostic Protocol for the Detection of Fusarium Wilt of Chickpea (*Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*). Plant Health Australia: Camberra, Australia.
- Dastur, J. F., 1935: Gram wilts in the Central Provinces. Agr. Live-Stk. India, 5: 615-627.
- De Asmundis, C., Romero, C. H., Acevedo, H. A., Pellerano, R. G., & Vázquez, F. A. 2011. Funcionalización de una resina de intercambio ionico para la preconcentracion de HG (II). Avances en Ciencias e Ingeniería, 2(1), 63-70.
- Deighton, F. C., Stevenson, J. A., & Cummins, G. B. 1962. Formae speciales and the code. Taxon, 11(3), 70-71.

- Desjardins, A. E. 2006. *Fusarium mycotoxins: chemistry, genetics, and biology*. American Phytopathological Society (APS Press).
- Dhingra, O. D., & Sinclair, J. B. 1978. Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina*. *Biology and pathology of Macrophomina phaseolina*.
- Dhingra, O. D. and Sinclair, J. B., 1978: Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina*. Universidade Fedérale de Vicosa, Vicosa, Minas Gerais, Brasil, 166 pp.
- Dominí, M. E. 1995. Evaluación preliminar del efecto antiapetitivo de diferentes extractos vegetales. En Bioplág'95. Resúmenes.p. 83.
- Duarte, Y., Pino, O., & Martínez, B. 2013. Efecto de cuatro aceites esenciales sobre *Fusarium* spp. *Revista de Protección Vegetal*, 28(3), 232-235.
- Fahey, J 2005. *Moringa oleifera*: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. *J. Trees for Life*. 1:5.
- FAOSTAT 2017. Production statistics of crops. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize> (Consultado, octubre 2020).
- FAOSTAT 2016. Food and Agriculture Data. Available online: <http://faostat.fao.org> (accedido el 15 de octubre 2020).
- Funes, F. 1997. Experiencias cubanas en agroecología. *Revista Agricultura Orgánica*, p. 10-18.
- Gabrielson, J., Hart, M., Jarelöv, A., Kühn, I., McKenzie, D., and Möllby, R. 2002. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *Journal of Microbiological Methods*, 50(1), 63-73.
- Gakuya, D.W.; Itoga, S.M.; Mbaria, J.M.; Muthee, J.K.; Musau, J.K. 2013. Ethnobotanical survey of biopesticides and other medicinal plants

traditionally used in Meru central district of Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*. 145(2): 547-553.

García-Medina, S. 2002. Manejo del cultivo del garbanzo. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Grupo de trabajo en legumbres y diversificación. Salta, Argentina. 5 pp.

Ghosh T., Mukherji N and Basak M. 1964. On the occurrence of a new species of *Orbilaria* Fr. *Jute Bull*, 27: 134-141.

Gómez, G.R.M., Gómez, G.L. y Salinas, P.R.A. 2003. "Blanco Sinaloa - 92", Variedad de garbanzo blanco para exportación. SAGARPA – INIFAP – CIRNO – C.E. Valle de Culiacán. Folleto Técnico No. 24.

Gordon, T. R. y Martyn R. D. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annu. Rev, Phytopathol.* 1997. 35: 111 – 128.

Grewal, J. S., Pal, M. y Kurshrestha, D. D., 1974: A new record of wilt of gram caused by *Fusarium solani*. *Curr., Sci.*, 43: 767.

Harborne, J. B. 1993. *Phytochemical Dictionary. Handbook of bioactive compound from plants.* Taylor and Francis, p. 791.

Haware, M. P. y Nene, Y. L. 1982. Symptomless carriers of the chickpea wilt *Fusarium*. *Plant Dis.* 66:250-251.

Hernández, E. y Vázquez, J. 2007. Evaluación de tres extractos vegetales para el control de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporides*) en tomate de árbol (*Cyphomandra betaceae*). Tesis Ingeniero Agrónomo, Universidad de Cundinamarca Fusagasuga.

ICRISAT (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics), 1981: *Proceedings of the International Workshop in Grain Legumes.* January 13 – 16. Hyderabad, India, 350 pp.

- ICRISAT (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics), 1981: Chickpea. Páginas 71-95 en ICRISAT Annual Report 1979/80. Patancheru, A. P., India.
- Jana, T. K., Singh, N. K., Koundal, K. R., and Sharma, T. R. 2005. Genetic differentiation of charcoal rot pathogen, *Macrophomina phaseolina*, into specific groups using URP-PCR. Canadian Journal of Microbiology 51, 159-164.
- Jasso de Rodríguez, D. J., García, R. R., Castillo, F. H., González, C. A., Galindo, A. S., Quintanilla, J. V., and Zuccolotto, L. M. 2011. *In vitro* antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. Industrial Crops and Products, 34(1), 960- 966.
- Jiménez, G. M. M., Pérez, A. E. y Jiménez, D. R. M. 2001. Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5, and 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD). Eur. J. Plant Pathol. 107:237-248.
- Jukanti, A.k., Gaur, P.M., Gowda, C.L. y Chibbar, R.N. 2012. Nutritional Quality and Health Benefits of Chickpea (*Cicer arietinum* L.): A Review. British Journal of Nutrition, 108, S11- S26.
- Kaur S., Singh G., Kaur S., Edward G., Chand R and Bahadur V. 2012. Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. Critical Reviews in Microbiology, 38(2): 136-151.
- Koike, S. T. 2008. Crown rot of strawberry caused by *Macrophomina phaseolina* in California. Plant Disease, 92(8), 1253-1253. doi: 10.1094/pdis-92-8-1253b

- Konno, K., Yasui, H., Hirayama, C., Shinbo, H. 1998. Glycine protects against strong protein-denaturing activity of oleuropein, a phenolic compound in privet leaves. *Journal of Chemical Ecology* 24, 735–751.
- Konno, K., Okada, S., Hirayama, C. 2001. Selective secretion of free glycine, a neutralizer against a plant defense chemical, in the digestive juice of the privet moth larvae. *Journal of Insect Physiology* 47:12 1451-1457
- Kraft, J. M., 1969: Chickpea, a new host of *Fusarium solani* f.sp. *pisi*. *Plant Dis. Repr.*, 53: 110 – 111.
- Kumar Bargah, R. 2015. Preliminary test of phytochemical screening of crude ethanolic and aqueous extract of *Moringa pterygosperma* Gaertn. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4, 7-9.
- Landa, B. B., Navas-Cortés, J. A., Jiménez-Gasco, M. M., Katan, J., Retig, B. y Jiménez- Díaz, R. M. 2006. Temperature response of chickpea cultivars to races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, causal agent of *Fusarium* wilt. *Plant Dis.* 90:365-374.
- Lara, M. C. 1995. Efectos de extractos de *Parthenium hysterophorus* L. contra larvas de *Spodoptera frugiperda* (J. E Smith). En *Bioplág'95. Resúmenes*, p. 67.
- Leslie, J. F., Zeller, K. A., and Summerell, B. A. 2001. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59(3), 107-117.
- Leslie, J. F. y Summerell B. A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. Ames, Iowa, USA. 388p.
- Leyva-Mir, S. G., Velázquez-Martínez, G. C., Tlapal-Bolaños, B., Tovar-Pedraza, J. M., Rosas-Saito, G. H. y Alvarado-Gómez O. G. 2015. Caracterización morfológica y molecular de aislados de *Macrophomina phaseolina*

asociados a caña de azúcar en México. La Revista Argentina de Microbiología, 47, 143 - 147.

Lizcano, M. 2007. Evaluación de la actividad fungicida del extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) contra *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Tesis Microbiología Agrícola y Veterinario, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

Maheri, N., Chamani, M., Sadeghi, A. A., Aghazadeh, A. A. y Golshani, A. A. 2008. Nutritional evaluation of Kabuli and desi type chickpeas (*Cicer arietinum* L.) for ruminants using in vitro gas production technique. Afr. J. Biotechnol, 7, 2946 – 2951.

Manahan S. E. (ed.) 2007. Introducción a la química ambiental. Editorial Reverté S.A. Primera edición. México Mingcong, H. 2016. Pest-resistant foliar fertilizer for Chinese chive and preparation method thereof. Peop. Rep. China. Patente No. CN 106083348.

Martínez, M. 1994. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. 1ª reimpresión. México 1245 p.

Masoko, P., Picard, J., and Eloff, J. N., (2005). Antifungal activities of six South African Terminalia species (Combretaceae). Journal of Ethnopharmacology, 99(2), 301-308.

Matsuura, H. N., & Fett-Neto, A. G. 2017. Plant alkaloids: main features, toxicity, and mechanisms of action. "Plant toxins" Gopalakrishnakone, P., Carlini, C.R. & igabueBraun, R. (eds), pp., 243-261.

Mertely, J., Seijo, T., Peres, N. 2005. First report of *Macrophomina phaseolina* causing a crown rot of strawberry in Florida. Plant Disease 84, 434.

Mihail JD. 1992. *Macrophomina*. Pp 134-136 En: Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi. Singleton LL, Mihail JD and Rush CM, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

- Millán, T. Winter, P., Jungling, R., Gil, J., Rubio, J., Cho, S., Cobos, M. J., Iruela, M., Rajesh, P.N. y Tekeoglu, M. 2010. A consensus genetic map of chickpea (*Cicer arietinum* L.) based on 10 mapping populations. *Euphytica*, 175 – 189.
- Mitra, J., Mukherjee, P. K., Kale, S. P, Murthy, N. B. K. 2001. Bioremediation of DDT in soil by genetically improved strains of soil fungus *Fusarium solani*. *Biodegradation* 12, 235–245.
- Morales, G.J.A., Durón, N.L.J. 2004. Aspectos generales. In: Morales, G.J.A., Durón, N.L.J., Martínez, D.G., Núñez, M.D.J.H., Fu, C.A.A. (eds.). *El Cultivo de Garbanzo Blanco en Sonora. Libro Técnico Núm. 6*. INIFAP, Campo Experimental Costa de Hermosillo, Sonora, México. pp. 11-24.
- Moreno-Limón, S., González-Solís, L. N., Salcedo-Martínez, S. M., CárdenasÁvila, M. L., & Perales-Ramírez, A. 2011. Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica*, (32), 193-205.
- M.P. Sarr, M.B. Ndiaye, J.Z. Groenewald, P.W. Crous. 2014. Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. *Phytopathol Mediterr* 53: pp. 250-268
- Muehlbauer, F.J., A. Tull. 1997. New crop factsheet: *Cicer arietinum* L. Center for new crops and plant products. Purdue University. 12 pp.
- Navas-Cortés, J. A., Hau, B. y Jiménez-Díaz, R. M. 1998. Effect of sowing date, host cultivar, and race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on development of *Fusarium* wilt of chickpea. *Phytopathology* 88:1338-1346.
- Nebel, J.P., Porcile, J.F. 2006. Contaminación del bosque nativo por especies arbóreas y arbustivas exóticas. MGAP. Montevideo, Uruguay. Disponible en: http://www.guayubira.org.uy/monte/Contaminacion_monte_nativo_exoticas.pdf. [Consultado 30/10/2018].

- Nene Y. L., Haware M. P. and Reddy M. V. 1978. Diagnosis of some wilt-like disorders of chickpea (*Cicer arietinum*). ICRISAT Information Bulletin No. 3.
- Nene, Y. L., 1980: Diseases of chickpea. Páginas 171- 187 en ICRISAT Proceedings of the International Workshop on Chickpea Improvements. Hyderabad, India.
- O'Donnell, K. 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* 92, 919–938.
- Oviedo, R., González-Oliva, L., Regalado, L., Hechavarría, L., Herrera, P., Hernández, J. A., & Brull, G. P. 2012. Protocolo para la detección y manejo de plantas invasoras o potencialmente invasoras en áreas naturales y seminaturales de Cuba. *Bissea*, 6, 97-112.
- Paredes-Escalante, J.E., Carrillo-Fasio, J. A., García-Estrada, R. S., Allende-Molar, R., Sañudo-Barajas, J. A. y Valdez-Torres, J. B. 2009. Microorganismos Antagonistas para el Control del Complejo de Hongos Causantes de la Rabia del Garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el Estado de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27(1):27-35
- Patil, D. M., Akamanchi, K. G. 2017. Ultrasound-assisted rapid extraction and kinetic modelling of influential factors: Extraction of camptothecin from *Nothapodytes nimmoniana* plant. *Ultrasonics Sonochemistry* 37:582–591.
- Périno, S., Pierson, J. T., Ruiz, K., Cravotto, G., Chemat, F. 2016. Laboratory to pilot scale: Microwave extraction for polyphenols lettuce. *Food Chemistry*. 204:108–114.
- Prasad, N. y Padwick, G. W., 1939: The genres *Fusarium* II. A species of *Fusarium* as a cause of wilt of gram (*cicer arietinum* L.) India *J. Agr. Sci.*, 9: 371 – 380.

- P.W. Crous, B. Slippers, M.J. Wingfield, J. Rheeder, W.F.O. Marasas, A.J.L. Philips, A. Alves, T. Burgess, P. Barber, J.Z. 2006. Groenewald. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Stud Mycol* 55: pp. 235-253
- Rkichrt, I. and Hellinger, E., 1947: On the occurrence, morphology and parasitism of *Sclerotium bataticola*. *Palest. J. Bot. R. Ser. 6*: 107-147.
- Romero M. C, Salvioli M. L, Cazau M. C, Arambarri A. M. 2002. Pyrene degradation by yeasts and filamentous fungi. *Environmental Pollution* 117: 159–163.
- Rooney, L.W., Khan, M.N. y Ear, C.F. 1330. The technology of *Sorghum* products chapter in recent progress in cereal chemistry: Cereals for Food and Beverages. Inglett, G. – Academic Press Inc. New York, In Press 513—554.
- Roy, F., Boye, J. I. y Simpson, B. K. 2015. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, Chickpea and lentil. *Food Res. Int.* 43: 432 – 442.
- Rzedowski, J. 2006. Vegetación de Mexico. 1ra. Edición digital. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad, Mexico. 504 p.
- Saini, R. K., Shetty, N. P., Giridhar, P. 2014. GC-FID/MS analysis of fatty acids in Indian cultivars of *Moringa oleifera*: Potential sources of PUFA. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 91:1029–1034.
- Salgado – Garciglia, R.; Malina, J.; López, J. y Loeza, P. 2008. Efecto del extracto crudo y los compuestos bioactivos de *Heliopsis longipes* sobre la incidencia de la antracnosis, moco rización y nodulación del frijol. *Agrociencia* 42 (6): 679 – 688.
- Senthilkumar, A., Karuvantevida, N., Rastrelli, L., Kurup, S. S., & Cheruth, A. J. 2018. Traditional Uses, Pharmacological Efficacy, and Phytochemistry of *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori. -A Review. *Frontiers in pharmacology* 9: 465- 485.

- Sharma, K. D. and Muehlbauer, F. J. 2007. *Fusarium* wilt of chickpea: physiological specialization, genetics of resistance and resistance gene tagging. *Euphytica*. 157:1-14. <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-007-9401-y>
- SIAP (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2017. Avance de siembras y cosechas, resumen nacional por cultivo. <https://www.gob.mx/siap/>. Consultada: 22 de noviembre de 2020.
- SIAP 2015. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp (consultado, octubre 2020).
- Singh, S. 1984. Source – sink interaction in relation to seed development *Cicer arietinum* L., Ph. D. Tesis. University of Delhi, India.
- Singh, S. Singh, I. K., Gaur K., Chaturvedi P. M., S. K. Singh, N. P. y Sandhu, J.S. 2014. In Broadening the Genetic Base of Grain Legumes; National Bureau of Plant Genetic Resources: New Delhi, India.
- S.K. Dwivedi and Sangeeta. 2015. Efficacy of some Medical Plant Extract Against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* Causing Chickpen Wilt. *Asian Journal of Crop Science*, 7: 138 – 146.
- Snyder, W. C. y Hansen, H. N. 1941. The species concept in *Fusarium*. *Am J Bot.* 27: 64 – 67.
- Sparks, T.C.; Hahn, D.R.; Garizi, N.V. 2017. Natural products, their derivatives, mimics and synthetic equivalents: role in agrochemical discovery. *Pest management science*, 73(4): 700-715. DOI: 10.1002/ps.4458.
- S. Sánchez, M. Gambardella, J.L. Henríquez, I. Díaz 2013. First report of crown rot of strawberry caused by *Macrophomina phaseolina* in Chile. *Plant Dis.*, 97, pp. 996

- Su, G., Suh, S. O., Schneider, R. W., y Russin, J. S. 2001. Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology* 91, 120-126.
- Toma, M.; Vinatoru, M.; Paniwnyk, L.; Mason, T. 2001. Investigation of the effects of ultrasound on vegetals tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*. 8:137-142.
- Valenzuela I. P., Valenzuela R. I. V., Castro C. M. A., Pérez L. M. R., Sánchez E. A. S. 2008. Comportamiento agronómico de genotipos de garbanzo en siembra tardía en el Valle del Mayo, Sonora, México. *Rev. Fitotecnia Mexicana*;31(4):43-9.
- Van Der Maesen, L. J. G., 1972: *Cicer* L., a monographed the genus, with special reference to the chickpea (*Cicer arietinum* L.), its ecology and cultivation. *Commun. Agrie. Univ. Wageningen*, 72: 342 pp.
- Villalobos, M. J. Plaguicidas de origen vegetal. Estado actual de la investigación. 1996.
- Warda, J., Mariem B., Amal B., Mohamed B. y Mahamed Kharrat. 2017. *Fusarium* Wilt Affecting Chickpea Crop. *Agriculture*, 7, 23.
- Wong, J. E., Muñiz, D. B., Martínez, G., Belmares, R. E., Aguilar, C. N. 2015. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from native plants in the Mexican desert. *Ultrasonics Sonochemistry*. 22:474–481.
- Yossen V. E., Conles M.Y. 2016. Eficacia de fungicidas in vitro para el control de *Fusarium oxysporum* y *F. proliferatum*, agentes causales de marchitamiento en el cultivo de orégano en la Argentina. *Revista industrial y agrícola de Tucumán*, 91(1), 19-25.
- Zacarés, L. 2008. Nuevas aportaciones al metabolismo secundario del tomate, identificación y estudio de moleculaas implicadas en la respuesta a la

infeccion con *Pseudomonas syringae* pv. tomato. Tesis Doctoral. Universidad Politecnica de Valencia.

Zhang, J.Q., Z.D. Zhu, Z.D., Duan, C.X., Wang, X.M. Li, H.J. 2011. First report of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on mungbean in China. Plant Dis., 95, pp. 87.

Zaker M. 2014. Antifungal evaluation of some plant extracts in controlling *Fusarium solani*, the causal agent of potato dry rot *in vitro* and *in vivo*. Inter. J. Agri. Biosci. 3:190- 195.

APÉNDICE

Cuadro 1 del apéndice. Incidencia en porcentaje de la enfermedad en plantas de garbanzo

Tratamientos	Bloques		
	I	II	III
1. <i>Ligustrum lucidum</i>	33.33	66.66	100.00
2. <i>Moringa oleífera</i>	66.66	100.00	100.00
3. Químico	100.00	100.00	100.00
4. Testigo inoculado	100.00	100.00	100.00
5. Testigo absoluto	0.00	0.00	0.00

Cuadro 2 del apéndice. Análisis de varianza para incidencia de la enfermedad evaluada en plantas de garbanzo

ANÁLISIS DE VARIANZA					
FV	GL	SC	CM	F	P > F
TRATAMIENTOS	4	2.11706667	0.52926667	17.55	<0.0001
ERROR	10	0.301533333	0.03015333		
TOTAL	14	2.41860000			
C.V.	19.15				
Nivel de significancia	0.05				

Cuadro 3 del apéndice. Severidad de la enfermedad en plantas de garbanzo

Tratamientos	Bloques		
	I	II	III
1. <i>Ligustrum lucidum</i>	1.60	0.66	2.00
2. <i>Moringa oleífera</i>	2.30	2.30	2.30
3. Químico	5.00	5.00	5.00
4. Testigo inoculado	5.00	5.00	5.00
5. Testigo absoluto	0.00	0.00	0.00

Cuadro 4 del apéndice. Análisis de varianza para severidad de la enfermedad evaluada en plantas de garbanzo

ANÁLISIS DE VARIANZA					
FV	GL	SC	CM	F	P > F
TRATAMIENTOS	4	58.97616000	14.74404000	155.79	<0.0001
ERROR	10	0.94640000	0.09464000		
TOTAL	14	59.92256000			
C.V.	11.21				
Nivel de significancia	0.05				

Cuadro 5 del apéndice. Severidad de la enfermedad en raíces de plantas de garbanzo

Tratamientos	Bloques		
	I	II	III
1. <i>Ligustrum lucidum</i>	1.00	1.00	1.30
2. <i>Moringa oleífera</i>	2.00	1.60	2.00
3. Químico	4.30	4.00	4.00
4. Testigo inoculado	4.60	5.00	4.60
5. Testigo absoluto	0.00	0.66	0.33

Cuadro 6 del apéndice. Análisis de varianza para severidad de la enfermedad en raíces evaluadas de plantas de garbanzo

ANÁLISIS DE VARIANZA					
FV	GL	SC	CM	F	P > F
TRATAMIENTOS	4	43.77122667	10.942880667	198.55	<0.0001
ERROR	10	0.55113333	0.05511333		
TOTAL	14	44.32236000			

C.V. 9.67

Nivel de significancia 0.05