



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA

“PRESIDENTE JUÁREZ”



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

RELACIÓN ENTRE POLIFENOLES Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA (CONTRA FITOPATÓGENOS) DE EXTRACTOS POLARES EN *Rubus* spp., SILVESTRES Y EN INVERNADERO

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Biológicas
presenta:

Ing. Alexander Basurto García

Director de tesis:

Doctor en Biotecnología de Plantas

PEDRO ANTONIO GARCÍA SAUCEDO

Uruapan, Michoacán, febrero de 2018

**Relación entre polifenoles y actividad
antibacteriana (contra fitopatógenos) de
extractos polares en *Rubus* spp., silvestres y
en invernadero**

Alexander Basurto García

27 de febrero de 2018

**RELACIÓN ENTRE POLIFENOLES Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
(CONTRA FITOPATÓGENOS) DE EXTRACTOS POLARES EN *Rubus*
spp., SILVESTRES Y EN INVERNADERO**

TESIS

Que somete a consideración y aprobación del H. Jurado examinador como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta:

Ing. Alexander Basurto García
alx_b16@hotmail.com

Esta tesis fue realizada bajo la dirección del Dr. Pedro Antonio García Saucedo

APROBADA:

Dr. Pedro Antonio García Saucedo
DIRECTOR/ASESOR

Dra. Rosa Elena Pérez Sánchez
SINODAL

Dra. Consuelo de Jesús Cortés Penagos
SINODAL

Dr. Víctor Olalde Portugal
SINODAL

Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores
SINODAL

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bromatología de la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", UMSNH, bajo la dirección del Dr. Pedro Antonio García Saucedo.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para desarrollar mis estudios de Maestría.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por brindarme la oportunidad de formarme, primero como Ingeniero y ahora como Maestro en Ciencias.

A mis padres Venustiano Basurto Barajas y Enedelia García Sánchez, por su invaluable apoyo y cariño.

A mis hermanos Omar, Amairany, Irisbeth, Adiel y Angel Gabriel, por su apoyo incondicional y cariño.

A mi asesor y amigo el Dr. Pedro Antonio García Saucedo, por su valioso apoyo amistad y consejos, dirigidos a fortalecer mi desarrollo personal y profesional.

A mis sinodales, por sus valiosas observaciones y consejos dirigidos a mejorar este trabajo.

Al Mc. Eulalio Venegas Gonzáles, por su apoyo en el análisis de los resultados obtenidos durante el proceso de investigación.

A Armando, Alejandro, Gerardo, Érika y Clarie, que me apoyaron en la parte experimental del proceso de investigación.

A todos mis amigos y compañeros de trabajo del Laboratorio de Bromatología, con quienes he pasado excelentes momentos y experiencias, gracias por brindarme su apoyo.

Al Mc. Atahualpa y la Mc. Teresita del Carmen, por sus valiosos consejos, permitirme pasar momentos muy agradables y brindarme su amistad.

A todas aquellas personas que me han apoyado durante las diferentes etapas de mi vida y que gracias a ellas me ha sido posible alcanzar mis metas.

Índice general

Resumen	VII
Abstract	VIII
1. Capítulo 1: Introducción	1
2. Capítulo 2: Revisión de literatura	2
2.1. Bioplaguicidas: una alternativa al uso de agroquímicos	2
2.1.1. El rol de los agroquímicos en la agricultura	2
2.1.1.1. Beneficios y riesgos de la aplicación de agroquímicos	2
2.1.2. Bioplaguicidas	3
2.1.2.1. Historia de los bioplaguicidas	3
2.1.2.2. Perspectiva actual al uso de bioplaguicidas	4
2.2. Metabolitos secundarios	4
2.2.1. Alcaloides	5
2.2.2. Terpenos	6
2.2.3. Polifenoles	8
2.2.3.1. Evolución de la ruta de polifenoles	8
2.2.3.2. Biosíntesis de polifenoles	9
2.2.3.3. Clasificación	11
2.2.3.4. Actividad antimicrobiana de compuestos fenólicos	11
2.2.3.5. Extracción	14
2.2.3.6. Cuantificación	15
2.3. Género <i>Rubus</i>	16
2.3.1. Actividad antimicrobiana de extractos de <i>Rubus</i> spp.	16
2.3.2. Uso de <i>Rubus</i> spp., en la herbolaria tradicional mexicana	17
2.4. Bacterias fitopatógenas	18
2.4.1. <i>Pseudomonas</i> sp.	18
2.4.2. <i>Pantoea stewartii</i>	18
2.4.3. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp., <i>michiganensis</i>	19
2.5. Justificación	20
2.6. Objetivos	20
2.6.1. Objetivo general	20

2.6.1.1. Objetivos específicos	20
2.7. Hipótesis	21
3. Capítulo 3: Materiales y métodos	22
3.1. Material microbiológico	22
3.2. Colecta de material vegetal	22
3.2.1. Características físicas de las muestras (foliolos)	23
3.2.1.1. Tamaño	23
3.2.1.2. Color	23
3.3. Obtención de extractos	24
3.3.1. Liofilización de material vegetal	24
3.3.2. Maceración de muestras y obtención de extractos	24
3.4. Determinación del rendimiento de extracto	24
3.5. Cuantificación de compuestos fenólicos	24
3.6. Actividad antibacteriana de extractos	25
3.6.1. Resuspensión de extractos	25
3.6.2. Acondicionamiento de la bacteria	25
3.6.2.1. Reactivación de la bacteria	25
3.6.2.2. Preparación del Preinóculo	25
3.6.2.3. Preparación del inóculo	25
3.6.3. Pruebas de sensibilidad mediante antibiogramas	25
3.6.4. Pruebas de sensibilidad mediante difusión en disco	25
3.6.5. Pruebas de sensibilidad mediante dilución seriada	26
3.7. Análisis estadístico	26
4. Capítulo 4: Resultados y discusión	28
4.1. Características físicas de las muestras	28
4.1.1. Tamaño de foliolos	28
4.1.2. Color de foliolos	30
4.2. Rendimiento de extracto	31
4.3. Contenido de polifenoles	34
4.4. Sensibilidad a antibióticos	39
4.5. Sensibilidad bacteriana a extractos mediante difusión en disco	40
4.6. Sensibilidad bacteriana mediante dilución seriada	48
5. Capítulo 5: Conclusiones	50
Bibliografía	51
6. Capítulo 6: Anexos	64

Índice de figuras

2.1. Ejemplos de alcaloides	6
2.2. Formación de terpenos	7
2.3. Visión general de los productos del metabolismo de compuestos fenólicos	10
2.4. Principales clases de compuestos fenólicos presentes en plantas	12
2.5. Estructuras químicas de polifenoles y microorganismos a los que afectan	13
3.1. Espacio de color L*a*b*	23
4.1. Tamaño de foliolos de <i>Rubus</i> spp., colecta 2	29
4.2. Tamaño de foliolos de <i>Rubus</i> spp., colecta 3	29
4.3. Tamaño de foliolos de <i>Rubus</i> spp., colecta 4	30
4.4. Tamaño de foliolos de <i>Rubus</i> spp., colecta 5	30
4.5. Coordenadas de color L*a*b* para foliolos de <i>Rubus</i> spp.	31
4.6. Efecto de la zona y el periodo de colecta sobre el rendimiento de extracto entre genotipos de <i>Rubus glaucus</i> y <i>Rubus adenotrichus</i>	33
4.7. Interacción en rendimiento de extracto entre materiales de <i>Rubus</i> spp.	34
4.8. Curva de calibración con ácido gálico	35
4.9. Efecto de la zona y el periodo de colecta sobre el rendimiento de polifenoles entre genotipos de <i>Rubus glaucus</i> y <i>Rubus adenotrichus</i>	37
4.10. Interacción en rendimiento de plifenoles entre materiales de <i>Rubus</i> spp.	38
4.11. Interacción en rendimiento de polifenoles entre extractos metanólicos y etanólicos de <i>Rubus</i> spp., por efecto del periodo de colecta y la condición de crecimiento	39
4.12. Sensibilidad bacteriana a antibióticos	40
4.13. Efecto inhibitorio de extractos metanólicos y etanólicos de <i>Rubus</i> spp., sobre <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp., <i>michiganensis</i>	41
4.14. Efecto del control negativo y control positivo sobre <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp., <i>michiganensis</i>	41
4.15. Interacción entre la actividad antibacteriana, frente a <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp., <i>michiganensis</i> , de extractos metanólicos y etanólicos de RPN.	42
4.16. Efecto de la zona y el periodo de colecta sobre la actividad antibacteriana, contra <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp., <i>michiganensis</i> , de genotipos de <i>Rubus glaucus</i> y <i>Rubus adenotrichus</i>	43

4.17. Efecto de la condición de crecimiento sobre la actividad antibacteriana, contra <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp., <i>michiganensis</i> , de <i>Rubus pringlei</i> y <i>Rubus glaucus</i>	44
4.18. Interacción en actividad antibacteriana contra <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp., <i>michiganensis</i> , entre materiales de <i>Rubus</i> spp.	45
4.19. Modelo lineal ajustado entre concentración de polifenoles y actividad antibacteriana contra <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp., <i>michiganensis</i> , de extractos de <i>Rubus orthostachys</i> y <i>Rubus glaucus</i>	46
4.20. Efecto de extractos de <i>Rubus</i> spp., sobre <i>Pseudomonas</i> sp.	48
4.21. Efecto del control positivo, control negativo y extractos, sobre el crecimiento de <i>Pantoea stewartii</i>	48
4.22. Efecto del control positivo, control negativo y extractos, sobre el crecimiento de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp., <i>michiganensis</i>	49
6.1. Crecimiento de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp., <i>michiganensis</i> sobre medio PDA mediante la técnica de dilución seriada	75

Índice de cuadros

2.1. Ejemplos de terpenos y su función en plantas superiores	8
4.1. Diferencias en rendimiento de extracto entre maceración metanólica y etanólica de hojas de <i>Rubus</i> spp.	32
4.2. Diferencias en rendimiento de polifenoles entre maceración metanólica y etanólica de hojas de <i>Rubus</i> spp.	36
4.3. Sensibilidad de bacterias a antibióticos	40
4.4. Análisis de regresión lineal simple, entre concentración de polifenoles y actividad antibacteriana contra <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp., <i>michiganensis</i> .	46
6.1. Diferencias en halos de inhibición contra <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp., <i>michiganensis</i> , entre extractos metanólicos y etanólicos de hojas de <i>Rubus</i> spp.	65
6.2. Comparación de medias para rendimiento de extracto, rendimiento de polifenoles y actividad antibacteriana, para cada genotipo de <i>Rubus</i> durante los diferentes periodos de colecta	66
6.3. Comparación de medias para rendimiento de extracto, rendimiento de polifenoles y actividad antibacteriana, para todos los genotipos de <i>Rubus</i> durante cada periodo de colecta	67
6.4. Amplitud en rendimiento de extracto, polifenoles y actividad antimicrobiana (contra <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp., <i>michiganensis</i> , mediante difusión en disco) para los diferentes genotipos de <i>Rubus</i> colectados en el estado de Michoacán, México.	68
6.5. Análisis de regresión lineal simple, entre características físicas de folíolos y rendimiento de extracto obtenido por maceración metanólica	69
6.6. Análisis de regresión lineal simple, entre características físicas de folíolos y rendimiento de extracto obtenido por maceración etanólica	70
6.7. Análisis de regresión lineal simple, entre características físicas de folíolos y rendimiento de polifenoles obtenido por maceración metanólica	71
6.8. Análisis de regresión lineal simple, entre características físicas de folíolos y rendimiento de polifenoles obtenido por maceración etanólica	72
6.9. Análisis de regresión lineal simple, entre características físicas de folíolos y actividad antibacteriana de extractos obtenidos por maceración metanólica .	73

6.10. Análisis de regresión lineal simple, entre características físicas de foliolos y actividad antibacteriana de extractos obtenidos por maceración etanólica . .	74
---	----

Resumen

La aplicación excesiva de agroquímicos para el control de plagas y enfermedades agrícolas, ha venido generando contaminación ambiental y problemas de salud pública. Para minimizar esta problemática diversas investigaciones se han enfocado en encontrar compuestos naturales que permitan el control de organismos plaga y microorganismos fitopatógenos. En este contexto se ha reportado que extractos polares de *Rubus* spp., (zarzamoras y frambuesas) inhiben el crecimiento de patógenos de humanos, efecto atribuido principalmente a polifenoles, siendo mínimos los reportes sobre fitopatógenos, aunado a esto en la mayoría de los trabajos las muestras son colectadas durante un particular periodo de tiempo y condición de crecimiento, factores que al modificarse pueden afectar la bioactividad de los extractos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la variación a través del tiempo y el espacio, en contenido de polifenoles y su relación con la actividad antibacteriana de extractos metanólicos y etanólicos de *Rubus* spp., silvestres y en invernadero. Para ello se evaluaron en diferentes periodos de colecta hojas de dos genotipos de *Rubus adenotrichus*, cuatro genotipos de *Rubus glaucus*, un genotipo de *Rubus orthostachys* y un genotipo de *Rubus pringlei*. El contenido de polifenoles se cuantificó por método colorimétrico empleando el reactivo Folin-Ciocalteu y la actividad antibacteriana, contra los fitopatógenos *Pseudomonas* sp., *Pantoea stewartii* y *Clavibacter michiganensis* subsp., *michiganensis* (Cmm), se evaluó mediante difusión en disco (600 μ g de extracto/disco) y dilución seriada (600 μ g de extracto/mL). De manera general el metanol extrajo mayor cantidad de polifenoles, respecto al etanol. Por otro lado, los resultados evidenciaron interacción ($p < 0.001$) entre condición de crecimiento (silvestre e invernadero), periodo de colecta y genotipo evaluado, lo que sugiere que a través del tiempo y el espacio, existen diferencias en síntesis de polifenoles entre especies y dentro de una misma especie (genotipos), incluso al encontrarse en invernadero, a su vez esta variación en producción de compuestos, genera interacción entre la actividad antibacteriana de extractos metanólicos y etanólicos, durante los diferentes periodos de colecta. Finalmente, no se observó relación lineal fuerte (coeficiente de correlación ≥ 0.9 y < 1) entre la concentración de polifenoles a través del tiempo y la actividad antibacteriana de los extractos.

Palabras clave: bioplaguicida, *Clavibacter michiganensis*, frambuesa, polifenoles, zarzamora.

Abstract

The excessive application of agrochemicals for the control of pests and agricultural diseases has been generating environmental pollution and public health problems. To minimize this problem, several investigations have focused on finding natural compounds that allow the control of plague organisms and phytopathogenic microorganisms. In this context it has been reported that polar extracts of *Rubus* spp., (Blackberries and raspberries) inhibit the growth of human pathogens, an effect attributed mainly to polyphenols, however there are minimal studies that report their effect on phytopathogens, coupled with this in most of the works the samples are collected during a particular period of time and condition of growth, factors that when modified can affect the bioactivity of the extracts. The objective of the present work was to evaluate the variation through time and space, in polyphenols content and its relation with the antibacterial activity of methanolic and ethanolic extracts of *Rubus* spp., wild and in a greenhouse. For this, leaves of two genotypes of *Rubus adenotrichus*, four genotypes of *Rubus glaucus*, one genotype of *Rubus orthostachys* and one genotype of *Rubus pringlei* were evaluated in different periods of collection. The polyphenol content was quantified by colorimetric method using the Folin-Ciocalteu reagent and the antibacterial activity, against the phytopathogens *Pseudomonas* sp., *Pantoea stewartii*, and *Clavibacter michiganensis* subsp., *michiganensis* (*Cmm*), was evaluated by disk diffusion (600 μg of extract/disk) and serial dilution (600 μg of extract/mL). In general, methanol extracted a greater quantity of polyphenols, with respect to ethanol. On the other hand, the results showed interaction ($p < 0.001$) between growth condition (wild and greenhouse), collection period and genotype evaluated, which suggests that across time and space, there are differences in polyphenol synthesis between species and within the same species (genotypes), even when found in the greenhouse, in turn, this variation in the production of compounds, generates interaction between the antibacterial activity of methanolic and ethanolic extracts, during the different collection periods. Finally, there was no strong linear relationship (correlation coefficient ≥ 0.9 y < 1) between the concentration of polyphenols over time and the antibacterial activity of the extracts.

Keywords: biopesticide, *Clavibacter michiganensis*, raspberry, polyphenols, blackberry.

Capítulo 1

Introducción

Durante el proceso de domesticación las plantas cultivadas perdieron o disminuyeron la capacidad de producir compuestos de defensa eficientes, siendo más susceptibles al ataque de fitopatógenos y herbívoros que sus antecesoras silvestres. Esta susceptibilidad dio origen a la generación y aplicación de compuestos químicos (plaguicidas) para el control de plagas y enfermedades agrícolas. Sin embargo, la utilización excesiva de plaguicidas ha venido generando contaminación ambiental, problemas de salud pública y el desarrollo de organismos plaga resistentes. Debido a esto, diversas investigaciones se han enfocado en identificar compuestos naturales que presenten actividad contra plagas y enfermedades agrícolas, también conocidos como bioplaguicidas, como una alternativa a la aplicación de productos químicos, sin embargo un paso previo a la identificación de estos compuestos es evaluar la actividad antibacteriana de extractos crudos. Las plantas representan la principal fuente de bioplaguicidas; ejemplo de ellas son algunas especies del género *Rubus* donde se incluyen las zarzamoras y frambuesas silvestres. En México se han descrito aproximadamente 20 especies de *Rubus*, distribuidas en varios estados de la República Mexicana, entre los que destaca Michoacán. Diversos trabajos han atribuido la actividad antimicrobiana de extractos de hojas, tallos y raíces de zarzamoras silvestres a la presencia de metabolitos secundarios o fitoquímicos, principalmente a polifenoles, que han demostrado inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos para el hombre y plantas. Sin embargo, aunque existe evidencia del potencial antimicrobiano que presentan los fitoquímicos de especies de *Rubus*, son escasos los estudios que reportan la actividad de extractos obtenidos a partir de especies silvestres mexicanas. Por otra parte, dado que los metabolitos secundarios actúan como mecanismos de defensa, su producción se puede ver afectada por factores bióticos y abióticos por lo que para poder aprovechar a plantas silvestres, entre ellas zarzamoras y frambuesas, como fuente de biopesticidas es importante evaluar como varía la actividad de los extractos al coleccionar las muestras durante diferentes periodos y si conservan la producción de compuestos bioactivos al ser establecidas bajo condiciones protegidas (invernadero). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la correlación entre la variación en contenido de polifenoles con la actividad antibacteriana de extractos polares de *Rubus* spp. (zarzamoras y frambuesa), silvestres y establecidas en invernadero.

Capítulo 2

Revisión de Literatura

2.1. Bioplaguicidas: una alternativa al uso de agroquímicos

2.1.1. El rol de los agroquímicos en la agricultura

Durante el proceso de domesticación las plantas cultivadas perdieron o disminuyeron la capacidad de producir mecanismos de defensa eficientes, normalmente metabolitos secundarios capaces de disuadir a herbívoros y controlar fitopatógenos (Hans-Walter et al., 2011). Se ha argumentado que este efecto es el resultado indirecto del incremento en la productividad, tamaño de hojas, flores y semillas (Benrey et al., 1998), a expensas de una reducción en la distribución de la energía para otras funciones, tales como síntesis de metabolitos secundarios (Lindig-Cisneros et al., 1997, 2002; Gols et al., 2009), en consecuencia las plantas domesticadas frecuentemente se tornan más vulnerables al ataque de herbívoros, patógenos y competidores que sus contrapartes silvestres. La Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO), estima que a nivel mundial malezas, plagas y enfermedades provocan alrededor del 25 % de pérdida de cosechas (Pimentel, 2009; Martinelli et al., 2015). Aunado a esto, al día de hoy el 10.5 % de la superficie agrícola del planeta, está ocupada por monocultivos de plantas genéticamente idénticas, lo que favorece la selección de variantes de plagas y microorganismos fitopatógenos que pueden superar los mecanismos de defensa del genotipo hospedero (Buchanan, 2015). Por tales motivos ha sido necesario un control externo de plagas, malezas y enfermedades agrícolas, el cual se consigue principalmente mediante la aplicación de plaguicidas o agroquímicos (Hans-Walter et al., 2011).

2.1.1.1. Beneficios y riesgos de la aplicación de agroquímicos

A nivel mundial aproximadamente 8,000 especies de malas hierbas, 9,000 especies de insectos y ácaros y 50,000 especies de fitopatógenos, ocasionan pérdidas de cultivos con un valor estimado de 2 mil millones (dos billones, en inglés) de dólares al año (Pimentel, 2009). Cai et al. (2012), mencionan que sin la aplicación de agroquímicos las pérdidas de frutas, vegetales y cereales resultaría en un 78 % 54 % y 32 %, respectivamente. Sin embargo, la ma-

yoría de los agroquímicos son altamente tóxicos, lo que ocasiona problemas ambientales y de salud pública (Zhang et al., 2011). De acuerdo con un informe de la Organización Mundial para la Salud (OMS) y el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP, por sus siglas en inglés), globalmente más de 26 millones de personas sufren intoxicaciones por plaguicidas, lo que conlleva a aproximadamente 220,000 muertes al año (Richter, 2002), se estima que los pacientes con cáncer resultado de la intoxicación con plaguicidas, representa casi el 10 % del total de pacientes con cáncer (Gu and Tian, 2005). Por otra parte, la constante aplicación de pesticidas ha dado lugar a una serie de microorganismos resistentes a productos químicos (Reichling, 2010; Sales et al., 2016), siendo ésta una de las principales causas del deficiente control de enfermedades agrícolas (Sales et al., 2016). Debido a los crecientes reportes acerca de los efectos negativos de pesticidas sintéticos, a menudo como resultado de malas aplicaciones, se ha renovado el interés por el uso de plaguicidas naturales o bioplaguicidas (Dubey et al., 2010) algunos de los cuales han mostrado un efecto sinérgico con antibióticos (Palaniappan and Holley, 2010; Abreu et al., 2012), por lo tanto, pueden ser dirigidos al control de enfermedades agrícolas aplicándose de manera alterna con agroquímicos, lo que potencialmente disminuirá el impacto ambiental y la incidencia de microorganismos resistentes.

2.1.2. Bioplaguicidas

Existe amplia disparidad en cuanto a la definición de bioplaguicida y los compuestos u organismos que pueden entrar en esta clasificación ya que mientras la FAO define a los bioplaguicidas como aquellos agentes de control biológico que son pasivos, en contraste con agentes de control biológico que buscan activamente a la plaga dentro de los que se encuentran parasitoides, depredadores y nemátodos entomopatógenos (Sporleder and Lacey, 2013), otros autores mencionan que los bioplaguicidas incluyen fuentes microbianas, animales, vegetales, organismos modificados genéticamente, así como sus metabolitos, destinadas al control de enfermedades, insectos plaga, malezas y otros organismos indeseables (Zhang and Zhang, 1998; Xu, 2008; Zhang and Pang, 2009).

2.1.2.1. Historia de los bioplaguicidas

Si bien es probable que los bioplaguicidas de origen vegetal se hayan utilizado a lo largo de nuestra historia, los registros más antiguos al uso de extractos de árboles de neem, *Azadirachta indica*, como bioplaguicidas se remontan a más de 4000 años en China, Grecia, Roma e India (Philogène et al., 2005), así mismo existen referencias que hace más de 2000 años en Egipto, Grecia, China e India se hacia uso de derivados de plantas para el control de plagas (Ware, 1983; Thacker, 2002), sin embargo es difícil determinar cuándo exactamente y dónde se usaron de manera sistemática plantas o extractos de plantas para el manejo de plagas y enfermedades agrícolas. Para el siglo XVII ya se empleaban compuestos como el sulfato de nicotina para controlar los escarabajos del ciruelo y en el siglo XIX el piretro (extraído de *Tanacetum cinerariifolium*) y la rotenona (extraída de plantas tropicales leguminosas) se utilizaban como bioplaguicidas (El-Wakeil, 2013). A partir de 1945 el desarrollo y aplicación de

plaguicidas orgánicos sintéticos, también conocidos como plaguicidas químicos, desplazaron a los compuestos naturales empleados hasta ese momento (Zhang et al., 2011), sin embargo en los últimos años se ha venido retomando el interés por bioplaguicidas de origen vegetal (Gyawali et al., 2015), en este contexto el desarrollo de bioplaguicidas vegetales ha resultado de dos métodos paralelos: 1) la observación de los usos tradicionales de plantas o sus extractos para la protección de ganado y cultivos agrícolas, seguida por la verificación de la eficiencia de estas prácticas y la identificación de las moléculas activas. La actividad de la nicotina extraída del tabaco *Nicotiana tabacum* y de la retonona obtenida de leguminosas (*Lonchocarpus nicou* y *Derris elliptica*) entran dentro de esta categoría; 2) una selección sistemática de familias de plantas seguida por ensayos biológicos para descubrir nuevos compuestos bioactivos, la rianodina alcaloide extraído de *Ryania* sp., y comercializado en USA en 1945 es el resultado de tal método (Copping, 2001).

2.1.2.2. Perspectiva actual al uso de bioplaguicidas

Dentro de las ventajas que muestran los bioplaguicidas destacan: su especificidad a organismos objetivo, son seguros para enemigos naturales y organismos benéficos, la materia prima y los compuestos activos son productos naturales que ayudan a asegurar un desarrollo sostenible, pueden ser modificados por técnicas biotecnológicas para mejorar su desempeño e incrementar su calidad y difícilmente las plagas generan resistencia (Yang J, 2001). Actualmente existen más de 100 tipos de bioplaguicidas en el mundo, de los cuales más de 30 son comercialmente manufacturados (Xu, 2008), siendo México, Estados Unidos y Canadá son los países que mayormente utilizan bioplaguicidas, empleando cerca del 44% de la producción mundial (Qin and Kong, 2006). Se ha reportado que las plantas representan la principal fuente de compuestos bioactivos (Ramawat et al., 2009), ya que estas sintetizan una amplia variedad de metabolitos secundarios o fitoquímicos, algunos de los cuales llegan a actuar como defensa contra el ataque de herbívoros e inhiben el crecimiento de microorganismos fitopatógenos (Hans-Walter et al., 2011).

2.2. Metabolitos secundarios

Adicional a los metabolitos primarios tales como, carbohidratos, amino ácido, ácidos grasos, citocromos, clorofilas e intermediarios metabólicos, las plantas también producen compuestos sin función aparente en el metabolismo primario y por lo tanto se denominan metabolitos secundarios (Hans-Walter et al., 2011), de los cuales se han identificado más de 200,000 y estructuralmente hablando, más de 25,000 son clasificados como terpenoides, 12,000 como alcaloides y 8,000 como polifenoles (Yonekura-Sakakibara and Saito, 2009; Buchanan, 2015). Ciertos metabolitos secundarios se limitan a unas pocas especies vegetales donde cumplen funciones ecológicas específicas, tales como la atracción de insectos polinizadores y dispersores de semillas o como pesticidas naturales que actúan en la defensa contra herbívoros y patógenos (Hans-Walter et al., 2011; Verpoorte and Alfermann, 2013). Muchos de estos compuestos de defensa son tóxicos para las mismas plantas por lo que son inactivados como

glicósidos o confinados en espacios intercelulares (Martínez, 2012). En algunas plantas estos plaguicidas naturales representan el 10 % de la materia seca (Hans-Walter et al., 2011).

2.2.1. Alcaloides

Desde el punto de vista biológico, son todos aquellos compuestos químicos heterocíclicos y biológicamente activos que contienen nitrógeno (Figura 2.1), pueden tener alguna actividad farmacológica y en muchos casos uso medicinal o ecológico (Aniszewski, 1994). Winterstein and Trier (1910), subrayan que los alcaloides presentan las siguientes características: 1) toxicidad que actúa primeramente sobre el sistema nervioso central, 2) carácter básico, 3) presencia de nitrógeno heterocíclico, 4) se sintetizan a partir de aminoácidos o sus derivados inmediatos y 4) presentan distribución limitada en la naturaleza. Los alcaloides se clasifican en términos de su actividad biológica, estructuras químicas y rutas biosintéticas. Desde el punto de vista estructural se dividen en: 1) alcaloides verdaderos los cuales derivan de aminoácidos como L-ornitina, L-lisina, L-fenilalanina, L-tyrosina, L-triptofano L-histidina, entre otros (Pelletier, 1983; Dewick, 2002) y comparten un anillo heterocíclico con nitrógeno, en este grupo se encuentran la cocaína, dopamina, morfina, entre otros, 2) protoalcaloides que son compuestos en los que el átomo de nitrógeno, derivado de un aminoácido, no forma parte del heterociclo (Jakubke and Jeschkeit, 1994), sus precursores son la L-tirosina y el L-triptofano, algunos ejemplos son la hordenina, la mezcalina y la yohimbina, 3) pseudoalcaloides los cuales son compuestos cuyos esqueletos de carbón no derivan de aminoácidos (Jakubke and Jeschkeit, 1994), estos derivan de precursores o derivados de aminoácidos, también pueden resultar de reacciones de aminación o transaminación de las diferentes rutas de precursores o derivados (postcursores) de aminoácidos (Dewick, 2002), ejemplos de estos compuestos son la capsaicina, efedrina, solanidina y cafeína. Las plantas con alcaloides fueron la materia médica original de la humanidad y muchas de ellas todavía se usan al día de hoy (Buchanan, 2015). Más de 20,000 alcaloides han sido aislados de varios organismos desde el descubrimiento de la morfina, sin embargo se estima que el 9 % de los géneros de plantas (aproximadamente 1800) tienen especies que acumulan alcaloides (Buchanan, 2015). El rol de los alcaloides para la defensa química en plantas, se apoya por el amplio rango de efectos fisiológicos sobre animales y microorganismos. La nicotina, encontrada en tabaco, fue uno de los primeros insecticidas utilizados por humanos y sigue siendo uno de los más eficaces (Buchanan, 2015).

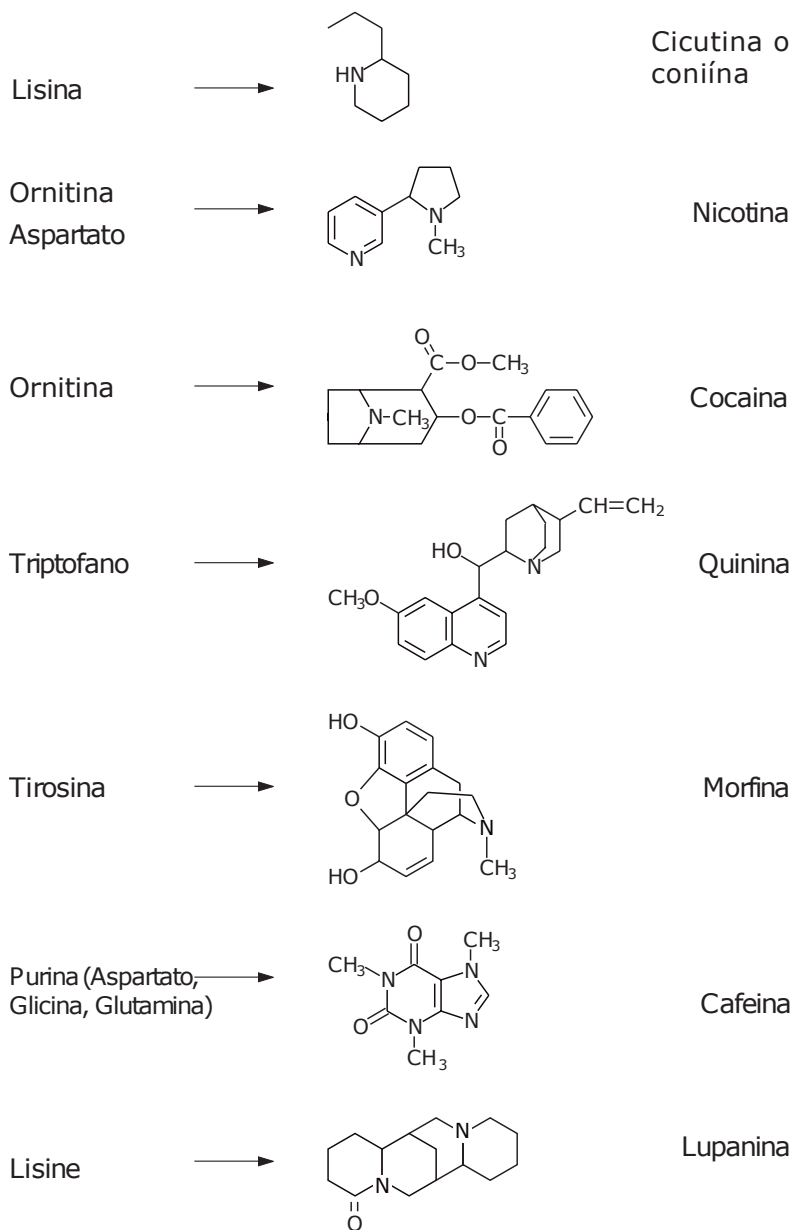


Figura 2.1: Ejemplos de alcaloides y aminoácidos a partir de los cuales se sintetizan, esquema extraído de Hans-Walter et al. (2011) con alguna modificaciones.

2.2.2. Terpenos

Los terpenos son el grupo más grande de metabolitos secundarios con más de 30,000 miembros, estos compuestos derivan de la unión de moléculas de cinco átomos de carbono (Carril and García, 2009) denominadas isopreno (Figura 2.2). Algunos presentan función en el crecimiento y desarrollo de plantas, siendo clasificados como metabolitos primarios (hormonas, carotenoides, esteroides, entre otros), sin embargo la mayoría no presentan función

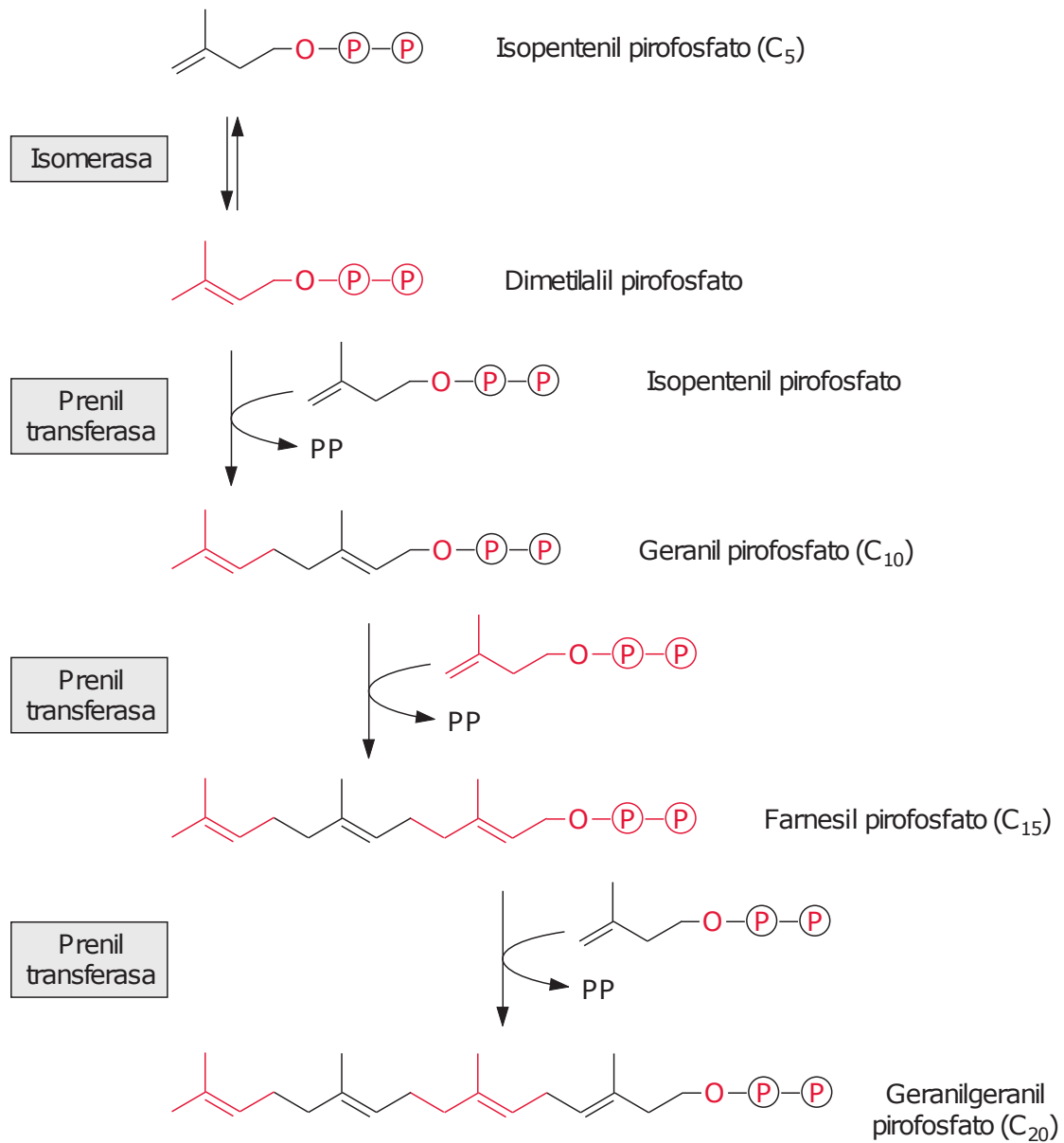


Figura 2.2: Formación de terpenos de diferente peso molecular, mediante la unión de unidades de isopreno (isopentenil pirofosfato y dimetilalil pirofosfato.) Esquema extraído de Hans-Walter et al. (2011) con algunas modificaciones.

discernible en el crecimiento y desarrollo por lo tanto son considerados metabolitos secundarios, dentro de estos últimos se encuentran aceites esenciales, resinas, latex y ceras (Carril and García, 2009; Buchanan, 2015), en el cuadro 2.1 se describe la función que desempeñan algunos terpenos presentes en plantas superiores. Los terpenos que actúan como metabolitos secundarios protegen a las plantas del ataque de herbívoros y patógenos, inhiben la germinación y crecimiento de plantas competidoras o atraen animales que dispersan semillas y polen.

Estos compuestos también juegan roles importantes en la sociedad humana ya que se han venido utilizando como sabores y fragancias de alimentos, bebidas, sopas, perfumes, entre otros productos (Buchanan, 2015).

Cuadro 2.1: Ejemplos de terpenos y su función en plantas superiores. Cuadro extraído de Hans-Walter et al. (2011), con algunas modificaciones.

Precursor	Clase	Compuestos	Función
C_5 : Dimetilalil-PP	Hemiterpeno	Isopreno	Protege al aparato fotosintético del calor
C_5 : Isopentenil-PP	Hemiterpeno	Cadena lateral de citocinina	Regulador de crecimiento
C_{10} : Geranil-PP	Monoterpeno	Pineno Linalool	Defensa
C_{15} : Farnesil-PP	Sesquiterpeno	Capsidiol	Fitoalexina
C_{20} : Geranilgeranil-PP	Diterpeno	Giberelina Forbol Casbeno	Hormona vegetal Defensa Fitoalexina
C_{30} : 2 farnesil-PP	Triterpeno	Colesterol	Constituyentes de la membrana
C_{40} : 2 Geranilgeranil-PP	Tetraterpeno	Sitosterol Carotenoides	Pigmentos
n Geranilgeranil-PP o n Farnesilfarnesil-PP	Poliprenoles	Proteínas preniladas Dolicol Caucho	Regulación del crecimiento celular Portador de glucosilo

2.2.3. Polifenoles

La transición temprana de plantas vasculares a un hábitat terrestre tuvo éxito en gran parte al desarrollo y síntesis de un diverso grupo de compuestos generalmente conocidos como compuestos fenólicos (Buchanan, 2015), los cuales se distinguen de otros grupos de metabolitos secundarios por la presencia de al menos un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático (benceno) en su estructura (Siracusa and Ruberto, 2014). Aunque la mayoría de los fenólicos son componentes estructurales de la pared celular, una amplia gama son toxinas y antiherbívoros, agentes que otorgan color a flores y frutos, complementos del aroma de órganos de la planta, antioxidantes de madera, corteza y semillas (Siracusa and Ruberto, 2014; Buchanan, 2015).

2.2.3.1. Evolución de la ruta de polifenoles

El desarrollo y evolución de la ruta biosintética de polifenoles, en la mayoría de las plantas terrestres primitivas y algas, ayudo a superar el daño por radiación UV mediante la producción de flavonoides, taninos condensados (que también actúan como disuasorios de herbívoros

y protectores de madera), isoflavonoides (llegan a formar parte en la defensa activa, constitutiva y como compuestos de señalización en plantas), flavononas y flavonoles (que presentan efectos antiinflamatorios en animales), la mayoría de estos compuestos están extendidos en el reino vegetal y por lo general absorben rayos UV dañinos (Buchanan, 2015). El segundo desafío fue un ambiente de desecación, el cual no solo fue superado por el desarrollo de la cutina y la cutícula en la epidermis (derivadas de los ácidos grasos) sino que también por el desarrollo de suberinas las cuales derivan de la ruta de los polifenoles, estos compuestos juegan un rol crítico en raíces y corteza, ya que forman una barrera hidrofóbica que impide la pérdida de agua (Buchanan, 2015). El tercer desafío fue superar las fuerzas de oposición de la gravedad y la necesidad de crecer más alto para competir por la luz solar, problema que fue superado por la síntesis de lignina, compuesto fenólico que provee rigidez a las paredes de celulosa lo que permite que las plantas soporten su peso sobre la tierra y transporten tanto agua como minerales de las raíces a las hojas (Buchanan, 2015). Otro problema que las plantas siguen enfrentando es la necesidad de detener a herbívoros y patógenos mientras mantiene un hábito de crecimiento sésil, para superar este problema las plantas han desarrollado la capacidad de sintetizar compuestos como cumarinas y furocumarinas que proveen defensa química contra herbívoros, insectos, hongos y bacterias (Buchanan, 2015).

2.2.3.2. Biosíntesis de polifenoles

La ruta más importante, relacionada con la biosíntesis de compuestos fenólicos, es la ruta del shikimato, mientras que la ruta del acetato-malonato es de menor importancia en plantas superiores (Ananga et al., 2013). La ruta del shikimato está presente en bacterias, hongos y plantas (Maeda and Dudareva, 2012) pero ausente en animales y es la responsable de la síntesis de tirosina, triptófano y fenilalanina (Vogt, 2010; Maeda and Dudareva, 2012), esta ruta comienza con la condensación de eritrosa-4-fosfato con fosfoenilpiruvato, terminando con la síntesis de corismato que dará lugar a la fenilalanina. Una vez sintetizada la fenilalanina da comienzo la ruta de los fenilpropanoides con la acción de la fenilalanina amonio liasa (PAL), que cataliza la desaminación de la fenilalanina a trans-cinamato que será utilizado como sustrato por las enzimas cinamato 4-hidroxilasa (C4H) y 4-coumaroil CoA-ligasa (4CL) que darán lugar a la síntesis de 4-coumaroil CoA (Vogt, 2010; Fraser and Chapple, 2011), precursor directo para la síntesis de flavonoides y estilbenos. Aunque la ruta de biosíntesis de polifenoles ya ha sido completamente elucidada (Figura 2.3), los factores reguladores y controladores que determinan la calidad y cantidad de polifenoles en los tejidos vegetales siguen siendo áreas de investigación activas y controvertidas (Herms and Mattson, 1992; Jones and Hartley, 1999). Gran parte de la controversia surge porque los factores reguladores en varios niveles que van desde intrínsecos, específicos de especies y genotipos, hasta factores ambientales extrínsecos, interactúan entre sí lo que da como resultado una amplia variación en producción de polifenoles entre las especies y dentro de ellas a través del tiempo y el espacio (Hättenschwiler and Vitousek, 2000).

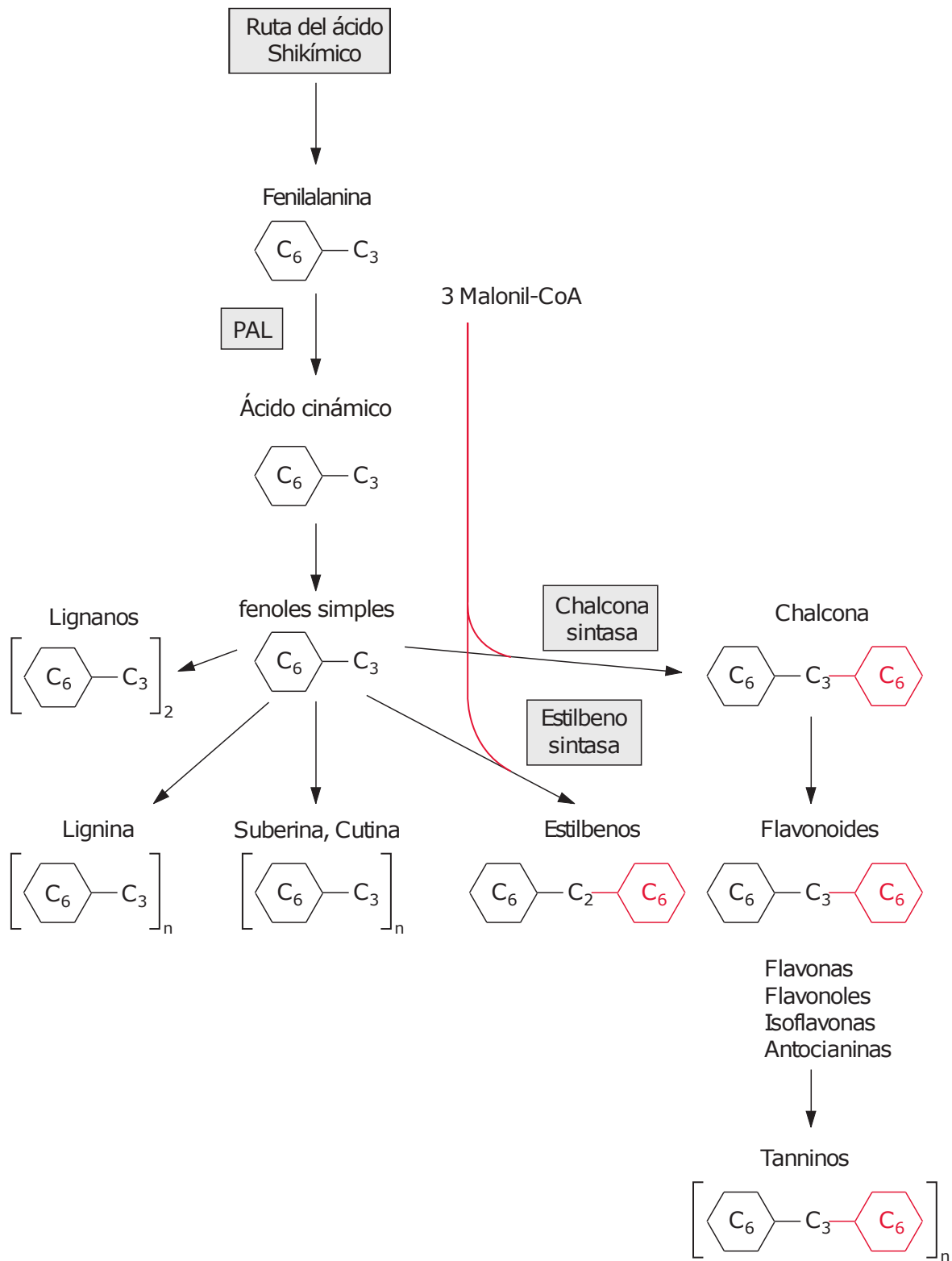


Figura 2.3: Visión general de los productos del metabolismo de compuestos fenólicos; (Hans-Walter et al., 2011).

2.2.3.3. Clasificación

Los polifenoles son generalmente divididos en flavonoides y no flavonoides (Figura 2.4). Los flavonoides comparten un esqueleto de carbon común de dos anillos de benceno (anillo A y B) unidos por una cadena lineal de tres carbonos que forman un anillo de pirano cerrado (anillo C) con el anillo A. Estos a su vez son divididos en diferentes subclases de acuerdo a modificaciones de su anillo central C: flavonoles, flavonas, flavononas, antocianidinas, flavonoles e isoflavonas (Kontogianni, 2014; Viñas and Campillo, 2014). Los flavonoides se pueden encontrar en su forma nativa (aglicón) pero con mayor frecuencia en forma de flavonoides O-glicósidos, donde uno o más de los hidroxilos del aglicón se unen a un azúcar mediante la formación de un enlace O-C, sin embargo también se pueden encontrar como C-glicósidos donde la glicosilación tiene lugar a través de un enlace C-C mediante la unión directa del azúcar al núcleo básico del flavonoide (Cuyckens et al., 2003). Los azúcares glicosídicos son generalmente glucosa, galactosa y ramnosa, algunas veces xilosa, arabinosa y ácido glucurónico (Kontogianni, 2014). El principal grupo de no flavonoides son los ácidos fenólicos, que se subdividen en derivados de ácido hidroxicinámico y derivados de ácido hidroxibenzóico. Los derivados de ácido hidroxibenzóico incluyen a los ácidos: gálico, p-hidroxicinámico, protocatecúico, vanílico y siríngico que presentan una estructura común $C_6 - C_1$. Los ácidos hidroxicinámicos son más comunes que los ácidos hidribenzóicos y consisten principalmente de ácidos: p-cumárico, caféico, ferúlico y sináptico, los cuales comparten una estructura común $C_6 - C_3$. Otro grupo de no flavonoides son los estilbenos cuyo principal representante es el resveratrol. Finalmente el último grupo de no flavonoides son los lignanos, que se producen por dimerización oxidativa de dos unidades de fenilpropano (Kontogianni, 2014).

2.2.3.4. Actividad antimicrobiana de compuestos fenólicos

Diversas investigaciones han atribuido actividades biológicas a los compuestos fenólicos, incluyendo: actividad antioxidante (Ahmad et al., 2000; Singh et al., 2011; Tachibana, 2011), interacción con poteínas relacionadas a enfermedades como Parkinson, Alzheimer y Huntington (Mandel et al., 2008; Hudson et al., 2009), modulación enzimática (Agouni et al., 2017; Russo et al., 2017), actividad anticancerígena (Hu et al., 2015; Scarpa and Ninfali, 2015), actividad antiinflamatoria (Chen et al., 2017; Venancio et al., 2017), actividad estrogénica (Vitale et al., 2013; Basu et al., 2015), actividad antiviral (Pang et al., 2014; Yang et al., 2014), actividad antimicrobiana (Daglia, 2012), entre otras. Respecto a la actividad antimicrobiana, ésta ha sido extensamente investigada contra un amplio grupo de microorganismos (Figura 2.5). Los polifenoles flavan-3-oles (catequinas), flavonoles y taninos reciben la mayor atención debido a su amplio espectro y mayor actividad antimicrobiana, en comparación a otros compuestos fenólicos, así como al hecho de que la mayoría de ellos son capaces de suprimir factores de virulencia microbianos, tales como inhibición de la formación de biofilms, reducción de la adhesión de los ligandos del hospedero y neutralización de toxinas bacterianas, adicionalmente estos compuestos muestran sinergismo con antibióticos (Daglia, 2012). Sin embargo en la mayoría de los trabajos que reportan actividad antimicrobiana de polifenoles, los microorganismos modelo son patógenos de humanos, siendo escasos los estudios que describen su efecto frente a fitopatógenos.

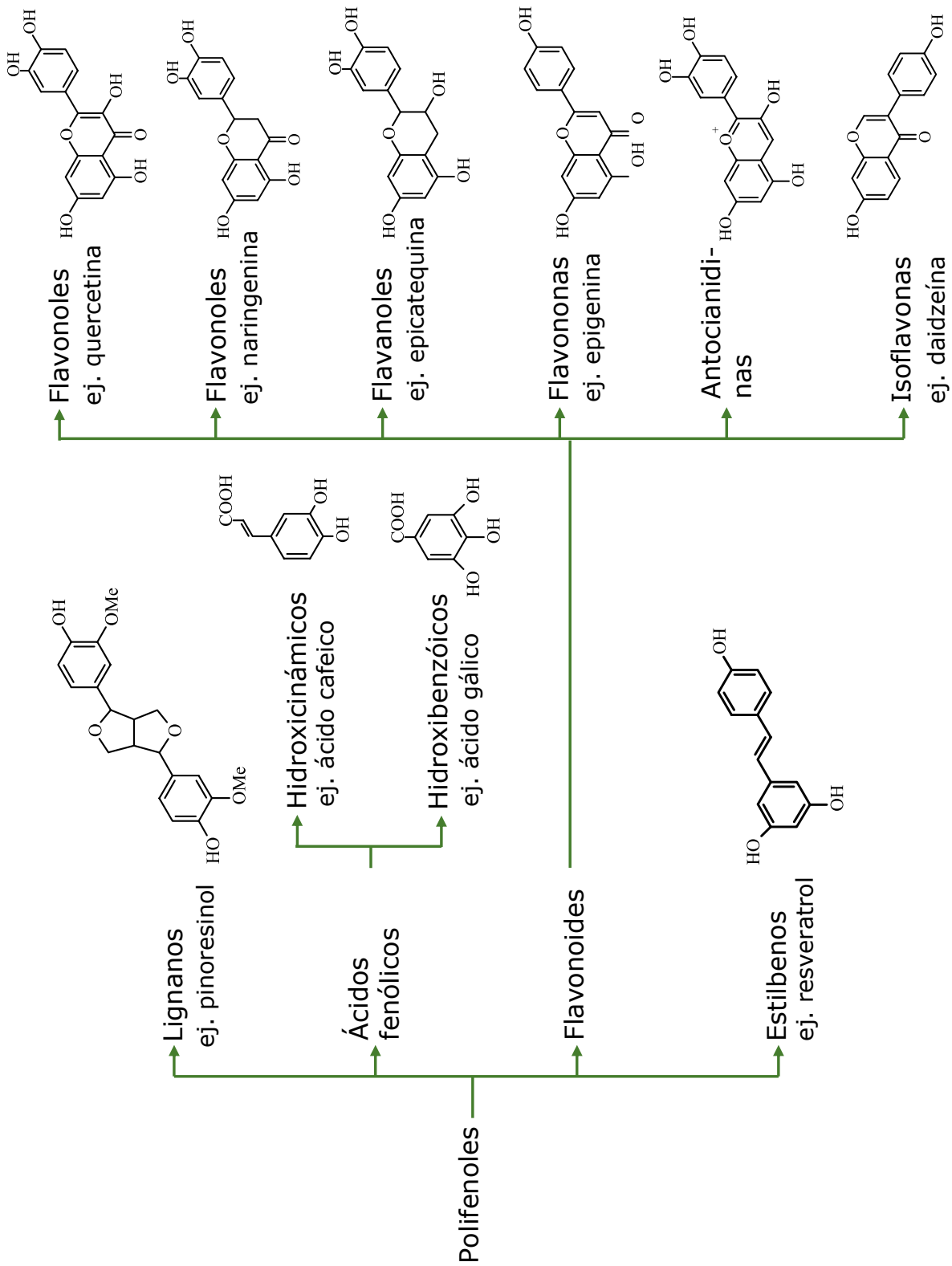


Figura 2.4: Principales clases de compuestos fenólicos presentes en plantas. Esquema extraído de Gómez-Caravaca et al. (2014) con algunas modificaciones de acuerdo a lo descrito por Kontogianni (2014).

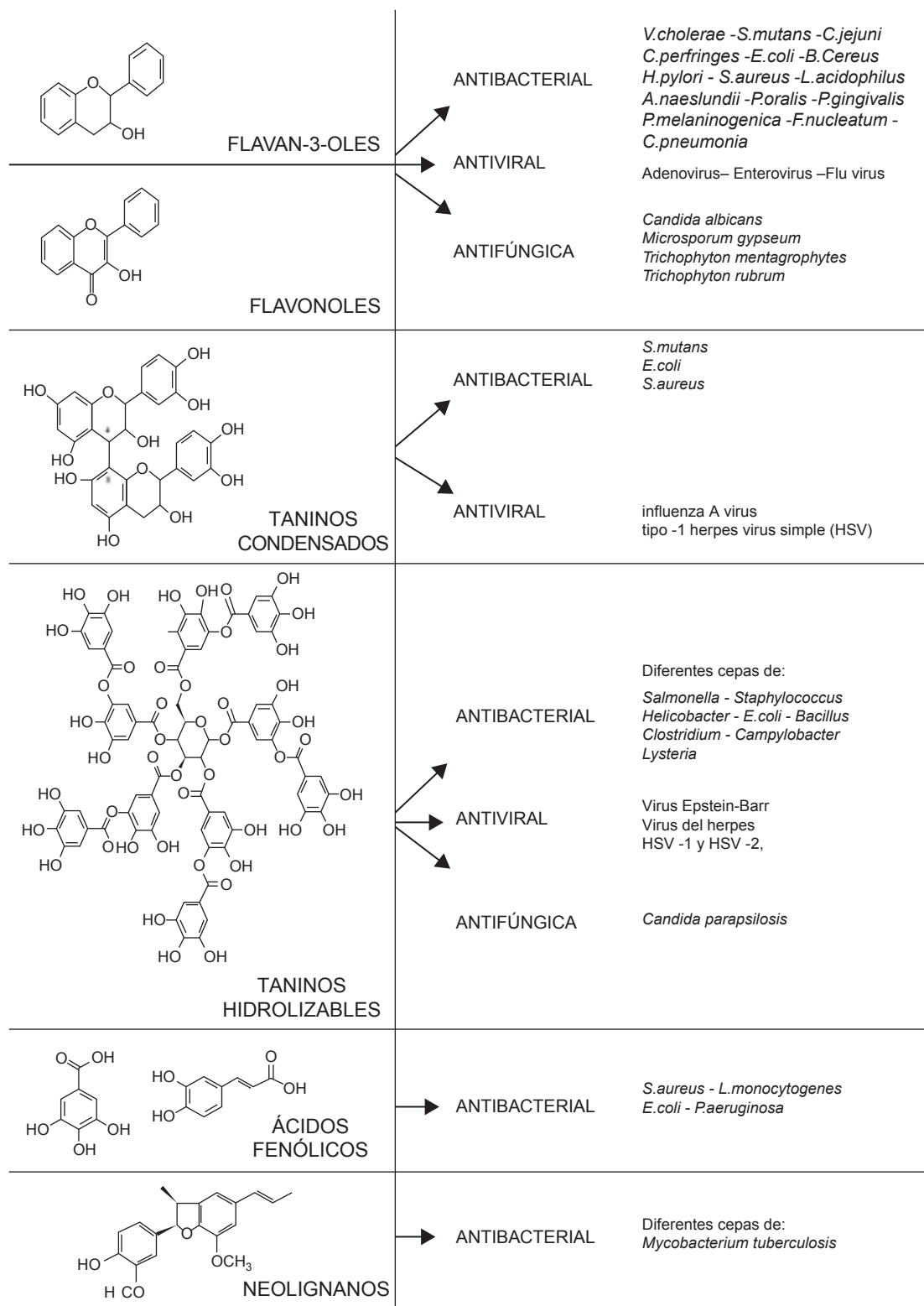


Figura 2.5: Estructuras químicas de polifenoles y microorganismos a los que afectan. Esquema extraído de Daglia (2012), con algunas modificaciones.

2.2.3.5. Extracción

El estudio de la bioactividad de fitoquímicos, como los compuestos fenólicos, comienza con procedimientos de pre-extracción (deshidratación y pulverización de la muestra) y extracción. Los procedimientos de pre-extracción son importantes para mantener la eficiencia, precisión y reproducibilidad del proceso de extracción, ya que éstos pueden ser responsables de hasta un 30 % del error durante las mediciones analíticas (Alonso-Salces et al., 2001; Robbins, 2003). Tanto muestras frescas como deshidratadas se han utilizado en el estudio de plantas medicinales, sin embargo Azwanida (2015), mencionan que considerando el tiempo necesario para el diseño experimental es preferible deshidratar las muestras ya que Sulaiman et al. (2011) limitan el intervalo entre la cosecha de las muestras y el trabajo experimental a un periodo máximo de tres horas, argumentando que las muestras frescas son frágiles y tienden a deteriorarse más rápidamente en comparación con las muestras deshidratadas, ya que la alta humedad o el contenido de agua en la muestra induce actividad enzimática, lo que potencialmente promueve la degradación de polifenoles (Stalikas, 2007). La deshidratación de las muestras se puede realizar empleando aire, calor, vacío o mediante liofilización (Stalikas, 2007), sin embargo el calor, la exposición a la luz y el oxígeno pueden afectar la composición de los polifenoles, siendo la liofilización el método óptimo de deshidratación debido a que conserva la composición de la mayoría de los polifenoles (Abascal et al., 2005; Azwanida, 2015). Otro paso importante previo a la extracción de los compuestos fenólicos es la pulverización de las muestras, ya que un tamaño pequeño de partícula incrementa la superficie de contacto con el solvente, esto se debe a que la superficie del área por unidad de masa de material vegetal incrementa cuando el tamaño de la partícula disminuye (Galili and Hovav, 2014; Azwanida, 2015). Existen discrepancias respecto al tamaño de partícula ideal para una extracción eficiente de polifenoles, ya que mientras algunos autores mencionan que el tamaño de partícula debe de ser menor a 0.5 mm (Azwanida, 2015), otros señalan que en tiempos cortos de extracción (1 hora) no se observan diferencias significativas entre la concentración de polifenoles extraída de partículas con tamaño de 1 mm o menos a partículas con tamaño de hasta 10 mm, sin embargo al prolongar el tiempo de extracción a 24 horas disminuye significativamente la concentración de polifenoles extraídos en partículas menores a 1 mm (Kossah et al., 2010), lo cual podría explicarse por la compactación de la muestra, que da como resultado una mayor cantidad de solvente retenido con relación a los tamaños de partícula más grande (Galili and Hovav, 2014), por lo tanto la eficiencia de extracción no solo esta limitada por el tamaño de partícula sino por una serie de factores como los son el método de extracción, el tiempo de extracción y el tipo de muestra evaluada (Naczka and Shahidi, 2004).

La extracción es la separación de porciones activas del material vegetal empleando solventes selectivos a través de procedimientos estandarizados (Handa et al., 2008). Se han reportado diversas técnicas para la extracción de polifenoles, las cuales se clasifican como convencionales y no convencionales (Adaramola and Onigbinde, 2017), entre las técnicas no convencionales se encuentran la extracción asistida por ultrasonido (Singh et al., 2017), extracción asistida por microondas (Dahmoune et al., 2015), extracción por fluidos supercríticos (Da Porto and Natolino, 2017) y extracción empleando elevada presión hidrostática (Zhang

and Ma, 2017), el objetivo de estas técnicas es disminuir la cantidad de solvente empleado y reducir los tiempos de extracción, sin embargo tienen como limitación que en su mayoría son técnicas altamente complejas y costosas. Dentro de las técnicas convencionales se encuentran la extracción por equipo soxhlet, la hidrodestilación y la maceración, siendo esta última la más ampliamente utilizada para la extracción de polifenoles, ya que las temperaturas elevadas pueden provocar hidrólisis y oxidación de los compuestos fenólicos, afectando la bioactividad del extracto crudo (Spigno et al., 2007; Chew et al., 2011). El proceso de maceración consiste en mezclar el material vegetal con un solvente y dejar reposar a temperatura ambiente durante un periodo mínimo de tres días en agitación constante (Handa et al., 2008), con lo que se pretende suavizar y romper la pared celular del tejido vegetal para liberar los fitoquímicos solubles (Azwanida, 2015), los solventes más comúnmente utilizados para investigaciones preliminares de actividad antimicrobiana son el metanol, etanol y agua, ya que la mayoría de los fitoquímicos antimicrobianos identificados de plantas son compuestos orgánicos aromáticos (Gurjar et al., 2012), categoría en la que entran los compuestos de tipo fenólico. Sin embargo, Chirinos et al. (2007) mencionan que el agua como solvente de extracción provee un extracto con alto contenido de impurezas (ácidos orgánicos, azúcares, proteínas solubles, entre otras) que pueden interferir con la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos. A su vez Gurjar et al. (2012) expresan que los compuestos fenólicos solubles en agua presentan mayor significancia como compuestos con actividad antioxidante que como compuestos con actividad antimicrobiana. Gurjar et al. (2012) mencionan que una proporción 1:10 muestra/solvente (masa/volumen) es la ideal para la extracción de fitoquímicos empleando el método de maceración, sin embargo Čujić et al. (2016) reportan que con las proporciones 1:20 y 1:30 se obtienen concentraciones de polifenoles totales, significativamente superiores a la obtenida empleando una proporción 1:10 muestra/solvente.

2.2.3.6. Cuantificación

El contenido de polifenoles totales puede ser cuantificado por métodos colorimétricos utilizando curvas estándares derivadas de concentraciones conocidas de moléculas fenólicas purificadas, como ácido gálico (Uchida et al., 2017), mientras que compuestos fenólicos específicos son determinados por métodos analíticos tales como HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia, por sus siglas en inglés) o GC (cromatografía de gases, por sus siglas en inglés) y cuantificados por comparación con cantidades conocidas de estándares internos (Khallouki et al., 2017; Ifeanacho et al., 2017). El contenido de polifenoles totales es comúnmente determinado empleando el reactivo Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999), este reactivo se forma a partir de una mezcla de ácido fosfotungstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), que después de la oxidación de los fenoles es reducido a óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). Esta reacción se lleva a cabo en condiciones alcalinas empleando carbonato de sodio (Na_2CO_3), bajo estas condiciones el electrón es fácilmente removido de la molécula de fenol (Singleton et al., 1999). La coloración azul resultante presenta una absorbancia máxima en la región de los 760 nm y es proporcional a la cantidad total de compuestos fenólicos presentes originalmente (Georgé et al., 2005). El valor resultante es usualmente expresado como equivalentes de ácido gálico (Uchida et al., 2017).

2.3. Género *Rubus*

Dentro de las plantas silvestres que presentan potencial para ser aprovechadas como fuente de bioplaguicidas se encuentran ejemplares del género *Rubus*, principalmente zarzamoras y frambuesas. El género *Rubus* se divide en 12 subgéneros que comprenden entre 900 a 1000 especies distribuidas en todo el mundo, con excepción de la Antártida (Wang et al., 2016) y quizás miles de microespecies apomicticas (Morden et al., 2003), volviendo el género más grande de la familia Rosaceae y uno de los más diversos del reino vegetal (Alice and Campbell, 1999; Zieliński et al., 2004). Es un género taxonómicamente complicado debido a su frecuente reproducción apomictica, polyploidia e hibridación (Thompson, 1997). Entre los subgéneros con un mayor número de especies se tiene *Ideaobatus* (con 117 especies) en el que se encuentran las frambuesas y el subgénero *Rubus* (antes subgénero *Eubatus*, con 132 especies) en el que se encuentran las especies de zarzamora (Focke, 1914). Las hojas de plantas de este género son conocidas por presentar agentes astringentes, antifúngicos y antibacterianos siendo recomendadas para tratar diarrea e inflamación del tracto digestivo. Las infusiones de hojas de *Rubus* spp., también se emplean para tratar lesiones cutáneas, úlceras y como enjuague para tratar infecciones de la cavidad bucal y la garganta (Tabarki et al., 2017).

2.3.1. Actividad antimicrobiana de extractos de *Rubus* spp.

Diversos estudios han demostrado que extractos polares obtenidos de *Rubus ulmifolius* afectan el desarrollo de cepas de *Helicobacter pylori* resistentes a antibióticos, así mismo extractos de *Rubus fruticosus*, *Rubus rosaefolius* y *Rubus apetalus* han inhibido el crecimiento de bacterias Gram positivas y negativas, entre ellas *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacteri* sp., *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus fecalis* (Panizzi et al., 2002; Hamill et al., 2003; Martini et al., 2009; Riaz et al., 2011; Quave et al., 2012; Zia-Ul-Haq et al., 2014; Thanina et al., 2015; Oliveira et al., 2016). Por otra parte Sisti et al. (2008) reportaron la actividad antifúngica de extractos metanólicos de *Rubus ulmifolius*, mostrando inhibición del desarrollo micelial de hongos como, *Alternaria* sp., *Aspergillus fumigatus*, *Beauveria* sp., *Fusarium* sp., y *Penicillium* sp. A su vez, Jiménez-Arellanes et al. (2012) evaluaron la actividad de *Rubus liebmanni* (zarzamora silvestre mexicana) y demostraron que los compuestos polares extraídos de la parte aérea de la planta inhibieron el crecimiento de los protozoarios *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*.

En la mayoría de los trabajos que reportan actividad antimicrobiana de extractos obtenidos de especies de *Rubus*, la inhibición se atribuye a la presencia de metabolitos secundarios, principalmente a compuestos de tipo fenólico (McCutcheon et al., 1994; Panizzi et al., 2002; Hamill et al., 2003; Sisti et al., 2008; Martini et al., 2009; Jiménez-Arellanes et al., 2012). En este contexto Oszmiański et al. (2015), analizaron la composición fenólica de hojas correspondientes a 26 especies de zarzamoras silvestres. El contenido total de compuestos fenólicos extraídos fue diverso, con amplitudes de 83.02 a 334.24 mg/g de materia seca, dependiendo de la especie. Los investigadores dividieron este contenido en tres grupos, el primer grupo

correspondió a taninos hidrolizables (elagitaninos), con concentraciones que variaron entre 51.59 y 251.01 mg/g de materia seca, el segundo grupo a flavonoides como quercetina, kaempferol, luteolina y apigenina, con un contenido medio de 35.17 mg/g de materia seca y el tercer grupo a ácidos fenólicos, entre los que destacaron el ácido caféico, ácido p-cumárico y ácido elágico, con un promedio de 28.74 mg/g de materia seca. Los taninos presentan importantes funciones en la fisiología de la planta, ya que proveen protección contra el ataque microbiano mediante la creación de complejos con proteínas y polisacáridos, inhibiendo el crecimiento de diversos microorganismos (Haslam, 1996). Por otra parte, diversas investigaciones han atribuido actividad antimicrobiana a flavonoides debido a su capacidad para penetrar y dañar la membrana celular de bacterias (Davidson and Naidu, 2000), provocar cambios en el pH intracelular y afectar la síntesis de adenosin trifosfato (Sánchez et al., 2010). Dentro del grupo de ácidos fenólicos el ácido elágico ha mostrado inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* a concentraciones de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para las cepas G21 y 10K respectivamente (Martini et al., 2009). Mientras que los ácidos caféico y p-cumárico a una concentración de 1.87 mg/mL inhiben en un 100 % el crecimiento *in situ* de *Staphylococcus aureus* (Stojković et al., 2013). Lo anterior evidencia la capacidad que presentan extractos y compuestos aislados obtenidos de hojas de zarzamoras silvestres para inhibir el desarrollo de bacterias y hongos, incluyendo algunos géneros de hongos fitopatógenos.

Aunque se ha demostrado la actividad antimicrobiana de extractos polares de *Rubus*, ricos en compuestos fenólicos, son escasos los trabajos que reporten la variación en producción de estos compuestos a través del tiempo y el espacio y correlacionen estas variaciones con la bioactividad de los extractos. Lo anterior es importante ya que la mayoría de los trabajos en los que se reporta actividad antimicrobiana es común observar que establecen como parámetro de referencia la concentración mínima inhibitoria (CMI) para referir el grado de inhibición de los extractos sobre el microorganismo evaluado, sin embargo dado que la producción de los fitoquímicos que proporcionan dicha actividad se ve influida por factores bióticos y abióticos, es probable que al obtener las muestras durante un periodo de colecta diferente, incluso en el mismo mes de colecta pero en un año diferente, la relación en concentración o tipo de compuestos bioactivos presentes por unidad de extracto se vea modificada, afectando la actividad antimicrobiana de los extractos y volviendo a parámetros como la CMI poco fiables a través del espacio y el tiempo. Por otra parte, al igual que en la mayoría de trabajos en los que se evalúa la actividad antimicrobiana de extractos polares y compuestos fenólicos, son mínimos los trabajos que reportan actividad antimicrobiana de extractos de *Rubus* spp., contra fitopatógenos.

2.3.2. Uso de *Rubus* spp., en la herbolaria tradicional mexicana

En México se han registrado cerca de 20 especies silvestres del género *Rubus* (Calderón and Rzedowski, 2001; Rzedowski et al., 2005; Segura Ledesma et al., 2009), de las cuales nueve se desarrollan en el estado de Michoacán (Rzedowski et al., 2005; Segura Ledesma et al., 2009) y al menos tres han sido empleadas por pobladores de la región purépecha para tratar diversos malestares, entre los que destacan molestias al momento de la dentición, diarrea y tos (Bello, 2006; González and Garciglia, 2013). Sin embargo, aunque existe amplia evidencia

del potencial antimicrobiano que presentan los extractos de zarzamoras silvestres, son escasos los estudios que reportan la actividad de los fitoquímicos de especies silvestres mexicanas. Por otra parte, para su aprovechamiento como fuentes de biopesticidas es importante evaluar si las plantas de *Rubus* spp., conservan la concentración y tipo de compuestos con actividad antimicrobiana al ser establecidas en invernadero.

2.4. Bacterias fitopatógenas

Un fitopatógeno es cualquier microorganismo que desarrolla una parte o la totalidad de su ciclo de vida en una planta, a menudo con efectos perjudiciales (Buchanan, 2015), siendo un impedimento importante para la producción y mantenimiento de la calidad de productos alimenticios (Chakraborty and Newton, 2011). Los principales agentes fitopatógenos son virus, hongos y bacterias. Las bacterias fitopatógenas se especializan en colonizar el apoplasto, para posteriormente ocasionar síntomas como pudriciones, manchas, marchitez vascular, canchales, entre otros. La mayoría de las bacterias fitopatógenas son bacilos Gram-negativos de los géneros *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Xanthomonas* y *Erwinia* (Buchanan, 2015), sin embargo, existen especies de otros géneros, entre ellas *Clavibacter michiganensis* subsp., *michiganensis* (bacilo Gram-positivo) y *Pantoea stewartii*, que llegan a ocasionar problemas fitosanitarios y pérdidas económicas en cultivos de importancia agrícola como tomate y maíz.

2.4.1. *Pseudomonas* sp.

El género *Pseudomonas* está constituido por bacilos Gram negativos y presenta algunas especies de bacterias fitopatógenas como *Pseudomonas syringae* fitopatógeno extracelular que ocasiona diversos tipos de enfermedades foliares en cultivos de importancia agronómica como lo son: tizón del fuego en tabaco ocasionada por *Pseudomonas psyringae* patovar *tabaci*, mancha foliar del pepino por *Pseudomonas syringea* patovar *lacrymans*, el tizón del halo del frijol por *Pseudomonas syringae* patovar *phaseolica*, el tizón del halo de la avena por *Pseudomonas syringae* patovar *coronafaciens*, el tizón bacteriano del chícharo por *Pseudomonas psyringae* patovar *pisi*, el tizón bacteriano de la soya por *Pseudomonas syringae* patovar *glycinea*, la mancha del fruto del manzano por *Pseudomonas syringae* patovar *populans*, el tiro de munición del peral y de los cítricos así como la mancha foliar del frijol por *pseudomonas psyringea* patovar *syringae* y la mancha bacteriana del tomate por *Pseudomonas psyringae* patovar *tomato* (Agrios, 2005). Se menciona que no existen métodos de control curativos una vez infectada la planta, siendo la semilla uno de los principales medios de diseminación de la bacteria (Agrios, 2005), por lo que un tratamiento pregerminativo con compuestos antibacterianos, podría resultar en una menor incidencia de la enfermedad.

2.4.2. *Pantoea stewartii*

La bacteria *Pantoea stewartii* es un bacilo Gram negativo, anaerobio, facultativo e inmóvil (Schaad et al., 2001), siendo el agente causal de la enfermedad conocida como marchitez

bacteriana del maíz o marchitez de Stewart. La marchitez de Stewart ha sido reportada en todo el mundo debido a la utilización de semillas infectadas, pero solo se presenta de manera natural en Norte América (Roper, 2011). Los síntomas de la enfermedad se presentan en dos fases: 1) marchitez bacteriana y 2) tizón de la hoja, la marchitez ocurre cuando las plántulas son infectadas afectando su desarrollo y en muchas ocasiones provocando su muerte, la segunda fase (tizón de la hoja) ocurre cuando plantas adultas son infectadas, las bacterias entran en el xilema y ocasionan lesiones lineares de color amarillo grisáceo las cuales se presentan paralelas a las nervaduras de las hojas, estas lesiones posteriormente se vuelven necróticas y de color oscuro (Roper, 2011). La fase de tizón de la hojas generalmente no ocasiona la muerte de la planta pero afecta su producción. La marchitez de Stewart es controlada mediante la siembra de híbridos de maíz resistente o tratando a las semillas con insecticidas como clotianidina, imidicropid o tiametoxam para matar al insecto vector antes de que la bacteria sea transmitida, sin embargo son escasos los reportes de tratamientos para el control de la bacteria en semillas infectadas.

2.4.3. *Clavibacter michiganensis* subsp., *michiganensis* (*Cmm*)

El género *Clavibacter* comprende bacilos Gram positivos que pertenecen a la familia Microbacteriaceae (Davis et al., 1984) y solo está representado por la especie *Clavibacter michiganensis*, que a su vez se divide en las subespecies *Clavibacter michiganensis* subsp., *sepedonicus*, responsable del anillado de raíz en papa (Hooker, 1981); *Clavibacter michiganensis* subsp., *nebraskensis*, que produce marchitez y roya del maíz (Schuster, 1975); *Clavibacter michiganensis* subsp., *tesselarius*, la cual induce pecas y manchas foliares en trigo (Carlson and Vidaver, 1982); *Clavibacter michiganensis* subsp., *insidiosus*, que ocasiona marchitez y retarda el crecimiento en alfalfa (McCuLLOCH et al., 1925); y *Clavibacter michiganensis* subsp., *michiganensis*, quien produce marchitez y cancro bacteriano en tomate (Davis et al., 1984). Siendo esta última la bacteria fitopatógena más importante del cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*) ocasionando pérdidas económicas substanciales a nivel mundial (Gartemann et al., 2003). Después de la infección por *Cmm* la bacteria se propaga dentro del xilema y finalmente coloniza toda la planta, conduciendo a una infección sistemática (Eichenlaub et al., 2007) que culmina con los síntomas de cancro y marchitez bacteriana (Flügel et al., 2012). Eichenlaub et al. (2007) mencionan que no se conocen cultivares de tomate resistentes a la infección por *Cmm*, a su vez Gartemann et al. (2003) sugieren que la única posibilidad de reducir pérdidas ocasionadas por la infección es removiendo y destruyendo las plantas infectadas debido a que la supervivencia de *Cmm* en el suelo requiere de material vegetal, mientras que Flügel et al. (2012), establecen que la única forma de control es mediante el uso de semilla certificada. Aunque no se tiene una metodología para el control de *Cmm*, Kasselaki et al. (2011) al sumergir semillas infectadas en una solución de nitrito acidificado durante diez minutos obtuvieron un 98 % de semillas libres del patógeno, lo anterior sugiere que un tratamiento preventivo a semillas mediante su inmersión en una solución con compuestos bioactivos podría resultar en un sistema de prevención de la enfermedad.

2.5. Justificación

A nivel mundial la producción agrícola se basa en el manejo convencional de cultivos, lo que se traduce en la síntesis y aplicación de una amplia variedad de agroquímicos que han originado problemas de contaminación ambiental y salud pública. Sin embargo, a través del tiempo, la humanidad ha generado conocimiento sobre el uso de plantas para controlar algunas patologías humanas, entre las que destacan, enfermedades ocasionadas por microorganismos (bacterias y hongos principalmente), sin embargo su utilización en el control de microorganismos fitopatógenos es limitada. Diversos estudios han demostrado que compuestos derivados del metabolismo secundario de plantas (fitoquímicos) pueden actuar como antiherbívoros y antimicrobianos, dando lugar al desarrollo de investigaciones sobre el potencial que presentan los fitoquímicos como alternativas en el control de plagas y enfermedades de cultivos. De ahí la importancia de realizar estudios científicos que den soporte a la utilización de metabolitos secundarios obtenidos de plantas silvestres como la zarzamora, en el control de fitopatógenos, así también para determinar si la producción de los compuestos con actividad antimicrobiana se mantiene a través del tiempo y el espacio.

2.6. Objetivos

2.6.1. Objetivo general

Evaluar la variación a través del tiempo y el espacio, en contenido de polifenoles y su relación con la actividad antibacteriana frente a bacterias fitopatógenas, de extractos metanólicos y etanólicos de *Rubus* spp., silvestres y en invernadero.

2.6.1.1. Objetivos específicos

- Evaluar la variación de polifenoles en extractos metanólicos y etanólicos de hojas de *Rubus* spp., silvestres y establecidas en invernadero.
- Evaluar la variación de la actividad antibacteriana contra *Clavibacter michiganensis* subsp., *michiganensis*, *Pseudomonas* sp., y *Pantoea stewartii*, de extractos metanólicos y etanólicos de hojas de *Rubus* spp., silvestres y establecidas en invernadero.
- Determinar si existe relación entre las características físicas de las muestras a través del espacio y el tiempo, con el contenido de polifenoles y la actividad antibacteriana de los extractos.
- Determinar si existe relación entre la variación de polifenoles a través del espacio y el tiempo con la actividad antibacteriana de los extractos.
- Evaluar cuantitativamente el efecto inhibitorio de los extractos sobre las bacterias modelo.

2.7. Hipótesis

- A través del tiempo y el espacio los extractos de las muestras de *Rubus* spp., presentan diferente contenido de polifenoles y diferente actividad antibacteriana.
- Los extractos de plantas de zarzamora y frambuesa establecidas bajo invernadero presentan menor actividad antibacteriana en comparación con extractos de sus contrapartes silvestres.
- Existe una relación lineal entre las características físicas de las muestras, a través del espacio y el tiempo, con el rendimiento de polifenoles y la actividad antibacteriana de los extractos.
- Existe una relación lineal entre la variación de polifenoles, a través del espacio y el tiempo, con la actividad antibacteriana de los extractos.

Capítulo 3

Materiales y métodos

3.1. Material microbiológico

Para la evaluación antibacteriana se emplearon las cepas de *Pantoea stewartii*, *Pseudomonas* sp., y *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*, aisladas e identificadas en el laboratorio de Bioquímica Ecológica del CINVESTAV Unidad Irapuato a cargo del Dr. Víctor Olalde Portugal.

3.2. Colecta de material vegetal

Los materiales silvestres se colectaron en diversas zonas del estado de Michoacán, México y fueron identificados de manera molecular en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Tlajomulco de Zuñiga Jalisco, a cargo del Dr. Juan Florencio Gómez Leyva. En el municipio de Uruapan se colectaron los materiales *Rubus adenotrichus* (RAU, 19° 26′ 17″ N y 102° 03′ 52″ W), *Rubus orthostachys* (ROU, 19° 26′ 09.8″ N y 102° 03′ 48.8″ W) y *Rubus glaucus* (RGU, 19° 26′ 23.8″ N y 102° 03′ 54.2″ W); en el municipio de Nahuatzen los materiales de *Rubus glaucus* (RGN, 19° 40′ 36.4″ N y 101° 55′ 01.8″ W y RGN2 19° 40′ 10.5″ N y 101° 38′ 20.1″ W), *Rubus adenotrichus* (RAN, 19° 40′ 03.2″ N y 101° 55′ 02.5″ W) y *Rubus pringlei* (RPN, 19° 40′ 10.5″ N y 101° 55′ 00.2″ W); mientras que en el municipio de Cd. Hidalgo se colectó a *Rubus glaucus* (RGH, 19° 36′ 34″ N y 100° 38′ 20.1″ W), de estos materiales se tomaron hojas para evaluar durante los meses: junio-julio de 2016 (colecta 1), noviembre-diciembre de 2016 (colecta 2) y marzo-abril de 2017 (colecta 3). Mientras que muestras de los mismos materiales pero establecidos en invernadero se colectaron durante los meses: enero-febrero de 2017 (colecta 4) y abril-mayo de 2017 (colecta 5). Las hojas colectadas presentaban apariencia sana, sazonas pero no estado de senescencia.

3.2.1. Características físicas de las muestras (foliolos)

Con la finalidad de establecer las condiciones físicas de las muestras al momento de la colecta y determinar si se relacionan con el contenido de polifenoles y la actividad antibacteriana de los extractos, se evaluaron los valores de tamaño y color de foliolos.

3.2.1.1. Tamaño

Se registró la medida longitudinal y transversal de foliolos, los datos se determinaron con un vernier digital (marca Truper) y se reportaron en mm. Las medidas se realizaron al azar sobre 50 foliolos de cada material de *Rubus*, durante cada periodo de colecta.

3.2.1.2. Color

Se midió utilizando un colorímetro de Reflectancia (Marca Lovibond con patrón de calibración blanco de $L^* = 94.43$, $a^* = -1.01$ y $b^* = 0.24$) para obtener las coordenadas del sistema de color CIE $L^*a^*b^*$, en donde L^* representa la luminosidad con intervalo de cero para el negro y cien para el blanco, a^* corresponde al tono de colores que varía del verde para valores negativos al rojo para valores positivos y b^* corresponde al color azul para valores negativos y amarillo para valores positivos (Figura 3.1). La evaluación se realizó al azar sobre 50 foliolos de cada material de *Rubus*, durante cada periodo de colecta.

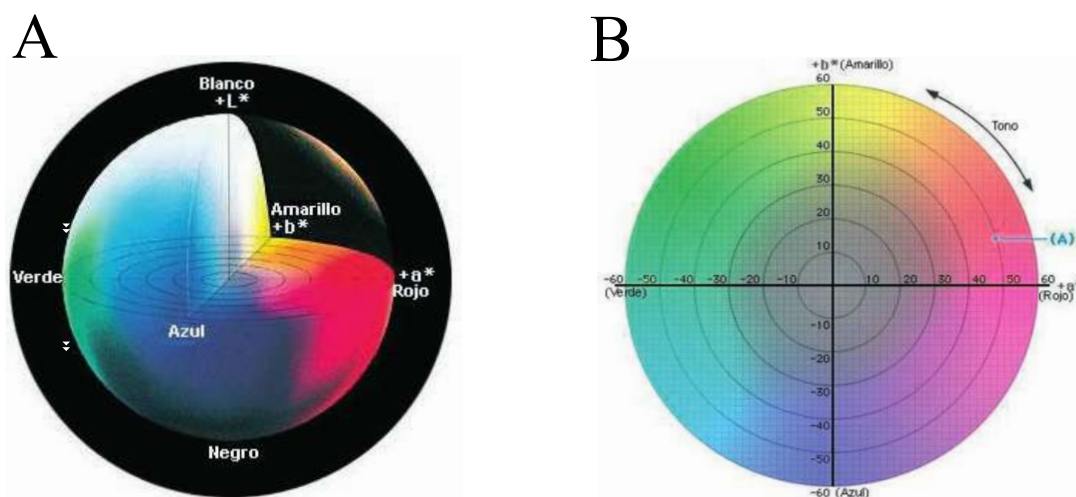


Figura 3.1: Espacio de color $L^*a^*b^*$. Representación del sólido de colores para el espacio $L^*a^*b^*$ (A) y vista del sólido de colores cortado horizontalmente en un valor de L^* constante (B; KONICA MINOLTA SENSING, INC.)

3.3. Obtención de extractos

3.3.1. Liofilización de material vegetal

Las muestras colectadas fueron liofilizadas en un equipo marca LABCONCO a una temperatura de $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ y presión de vacío de 0.160 mBar. Concluido el proceso de liofilización, los foliolos se pulverizaron (partículas menores a 5 mm) y almacenaron en bolsas herméticas de plástico a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su utilización.

3.3.2. Maceración de muestras y obtención de extractos

Para determinar el rendimiento de extracto primeramente se maceraron las muestras a partir de dos solventes, metanol y etanol. Para esto 5 g, de muestra liofilizada, se maceraron en 50 mL de solvente por un periodo de 5 días a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, con 1 hora de agitación constante a 150 rpm durante cada día del proceso de maceración. Posteriormente el sobrenadante se filtró a través de papel filtro Whatman # 4 y se aforó a 50 mL. Los extractos obtenidos se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

3.4. Determinación del rendimiento de extracto

Para evaluar la concentración de compuestos polares presentes en cada extracto, se tomaron dos mililitros del extracto a evaluar y se vertieron en un tubo de ensayo (a peso constante), posteriormente se colocó dentro de un horno de aire forzado hasta evaporar el solvente. La concentración de extracto se obtuvo mediante la siguiente formula:

$$Cp = Pf - Pi$$

donde Cp corresponde al contenido de compuestos polares (extracto), Pf al peso del tubo con extracto y Pi al peso inicial del tubo (sin extracto).

3.5. Cuantificación de compuestos fenólicos

Se determinó siguiendo el protocolo descrito por Singleton et al. (1999), con algunas modificaciones. La mezcla de reacción consistió en 50 μL de muestra (extracto diluido 1 a 10), 100 μL de reactivo Folin-Ciocalteu 1N y 550 μL de agua destilada, para un volumen final de 700 μL , con un tiempo de reacción de 8 min; posteriormente se agregaron 300 μL de Na_2CO_3 al 7.5 %, la mezcla se mantuvo en reposo durante 15 min a temperatura ambiente. Al finalizar la reacción se tomó la lectura de absorbancia a 760 nm en espectrofotometro UV-Vis marca JENWAY 6305. Para reportar los resultados se construyó una curva de calibración con ácido gálico (marca Sigma-Aldrich) a una concentración de 0.5 mg/mL, de la cual se tomaron alícuotas de 5 μL a 50 μL (2.5 a 25 μg de ácido gálico) con intervalos de 5 μL , mismas que sustituyeron al extracto durante la reacción. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por g de muestra (mgEAG/g).

3.6. Actividad antibacteriana de extractos

3.6.1. Resuspensión de extractos

Previo a las pruebas de actividad antibacteriana, se tomaron 10 mL del extracto a evaluar y se concentraron en evaporador rotatorio a 45 °C, con la finalidad de evaporar el solvente, el concentrado se resuspendió en una solución de Dimetilsulfóxido al 10 % acorde a lo reportado por El-Khateeb et al. (2013). Cada extracto se diluyó a una concentración de 10 mg/mL.

3.6.2. Acondicionamiento de la bacteria

3.6.2.1. Reactivación de la bacteria

La reactivación bacteriana se realizó mediante el método de estriado sobre medio papa-dextrosa-agar (PDA), consecuentemente cada bacteria se incubó a 27 ± 2 °C hasta observar la formación de colonias bacterianas (24 horas para *Pseudomonas* sp., y *Pantoea stewartii* y 72 horas para *Cmm*), las cuales se emplearon para preparar el inóculo a utilizar en los tratamientos.

3.6.2.2. Preparación del Preinóculo

Una vez reactivada la bacteria se tomaron tres colonias bacterianas y se colocaron en 5 mL de medio papa-dextrosa (PD), posteriormente se dio vórtex hasta homogeneizar la mezcla.

3.6.2.3. Preparación del inóculo

Una vez reactivada la bacteria se tomaron tres colonias bacterianas y se colocaron en 125 mL de medio papa-dextrosa (PD), el cual se incubó a temperatura ambiente y agitación constante a 150 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.6, la cual fue determinada con espectrofotometro UV/Vis marca JENWAY 6305 a 540 nm (Zwietering et al., 1990).

3.6.3. Pruebas de sensibilidad mediante antibiogramas

Para la elección de un control positivo (antibiótico) contra el cual comparar la actividad de los extractos, se realizaron pruebas con antibiogramas marca MULTIBAC I.D. Los antibiogramas fueron colocados sobre medio PDA previamente inoculado con 100 μ L de la bacteria, seguido de incubación a 27 ± 2 °C durante 24 horas para *Pseudomonas* sp., y *Pantoea stewartii* y 72 horas para *Cmm*.

3.6.4. Pruebas de sensibilidad mediante difusión en disco

Con la finalidad de evidenciar la actividad antimicrobiana de los extractos se realizaron pruebas cualitativas mediante el método de difusión en disco. Para los tratamientos, fracciones circulares de papel absorbente estéril (Bio-RadMR) de 5.5 mm de diámetro, se impregnaron con 600 μ g (60 μ L) del extracto a evaluar. Como control negativo se aplicaron 60 μ L de

DMSO al 10 % y como control positivo 60 μL de DMSO al 10 % más 10 μg de gentamicina. Los discos se colocaron equidistantes sobre medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) inoculado con 100 μL de bacteria, previamente crecida en medio papa-dextrosa (PD) a temperatura ambiente y agitación constante a 150 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.6 medida en espectrofotómetro a 540 nm. Tratamientos y controles se incubaron a 27 ± 2 °C durante 24 h para *Pantoea stewartii* y *Pseudomonas* sp., y 72 h para *Cmm*. Transcurrido el tiempo de incubación se midió el diámetro de los halos de inhibición.

Para determinar si existe una relación lineal entre la variación de polifenoles (por efecto del periodo de colecta) presentes en 600 μg de extracto y la actividad antimicrobiana observada en los ensayos de difusión en disco, se realizaron análisis de regresión donde primeramente se determinó el porcentaje de polifenoles presentes en el extracto, mediante la siguiente fórmula:

$$PP = (RP \times 100) / RE$$

donde PP corresponde al porcentaje de polifenoles, RP al rendimiento de polifenoles por gramo de muestra y RE al rendimiento de extracto por gramo de muestra. Para finalmente determinar la concentración de polifenoles presentes en 600 μg de extracto con base en la siguiente fórmula:

$$PT = (600 \times PP) / 100$$

donde PT corresponde a la concentración de polifenoles, en μgEAG , presentes en 600 μg de extracto.

3.6.5. Pruebas de sensibilidad mediante dilución seriada

Los tratamientos contenían 4.6 mL de medio papa-dextrosa (PD), 100 μL de inóculo bacterial (DO de 0.6 a 540 nm) y 300 μL de DMSO al 10 % más 3000 μg del extracto a evaluar. En el control negativo la solución de DMSO carecía de extracto, mientras que en el control positivo se reemplazó al extracto por 50 μg de gentamicina. Tratamientos y controles se incubaron en obscuridad durante 10 h a temperatura ambiente y con agitación constante a 150 rpm. Trascurrido el tiempo de incubación se tomó 1 mL de tratamiento o control y se realizaron seis diluciones decimales seriadas en solución salina, estéril, de cloruro de sodio (NaCl) al 0.85 %, de cada dilución se tomó una alícuota de 100 μL y se distribuyó sobre cajas de Petri con medio PDA. Las cajas de Petri se incubaron a 27 ± 2 °C durante 24 h para *Pseudomonas* sp., y *Pantoea stewartii* y durante 72 h para *Cmm*. Transcurrido el periodo de incubación se contabilizó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) correspondientes a cada dilución.

3.7. Análisis estadístico

El análisis de varianza y la comparación de medias, correspondiente al contenido de extracto, contenido de compuestos polares y actividad antibacteriana mediante difusión en disco y dilución seriada, así como los análisis factoriales, se llevaron a cabo con los programas

estadísticos Statgraphis centurión XV y R versión 3.4.2., los análisis de dispersión con el programa R versión 3.4.2., y los análisis de regresión se con el programa Statgraphis centurión XV.

Capítulo 4

Resultados y discusión

4.1. Características físicas de las muestras

4.1.1. Tamaño de folíolos

los resultados evidenciaron diferencias en tamaño de folíolos entre los materiales evaluados y variación en tamaño para cada material de *Rubus* durante los periodos de colecta, tanto estado silvestre (Figura 4.1 y Figura 4.2) como en invernadero (Figura 4.3 y Figura 4.4), sin embargo se observó una disminución de tamaño generalizada para muestras colectadas en invernadero.



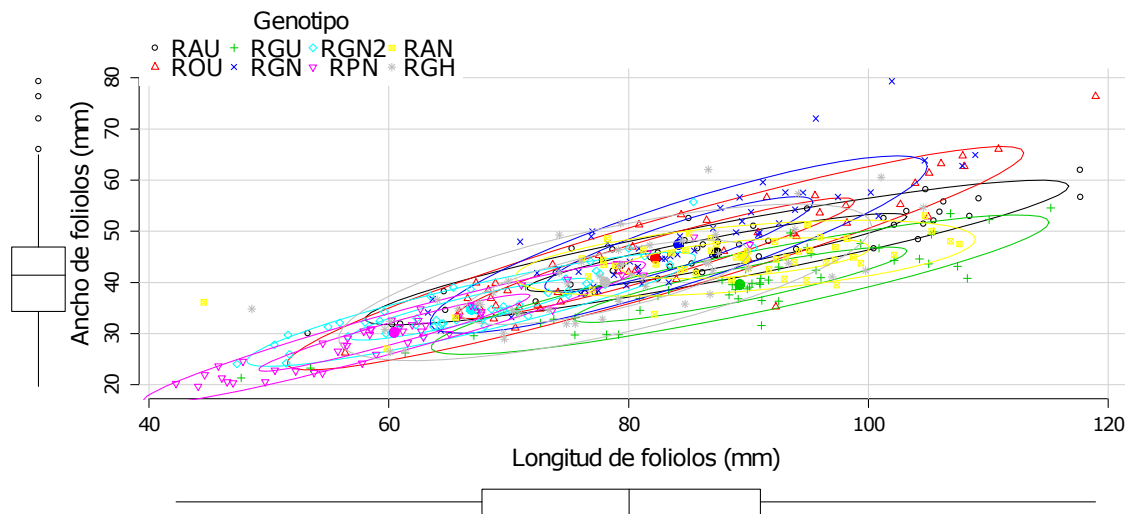


Figura 4.1: Tamaño de foliolos de *Rubus* spp., colecta 2. Obsérvense diferencias en longitud y ancho de foliolos para cada material de *Rubus* (cada uno representado con un color específico). Por otra parte, del total de foliolos evaluados para este periodo de colecta, el 50 % presentó un tamaño longitudinal de entre 65 mm y 90 mm, así como una anchura de entre 35 mm y 40 mm, valores representados por los diagramas de cajas y bigotes ubicados en la parte inferior y en el extremo izquierdo del diagrama de dispersión.

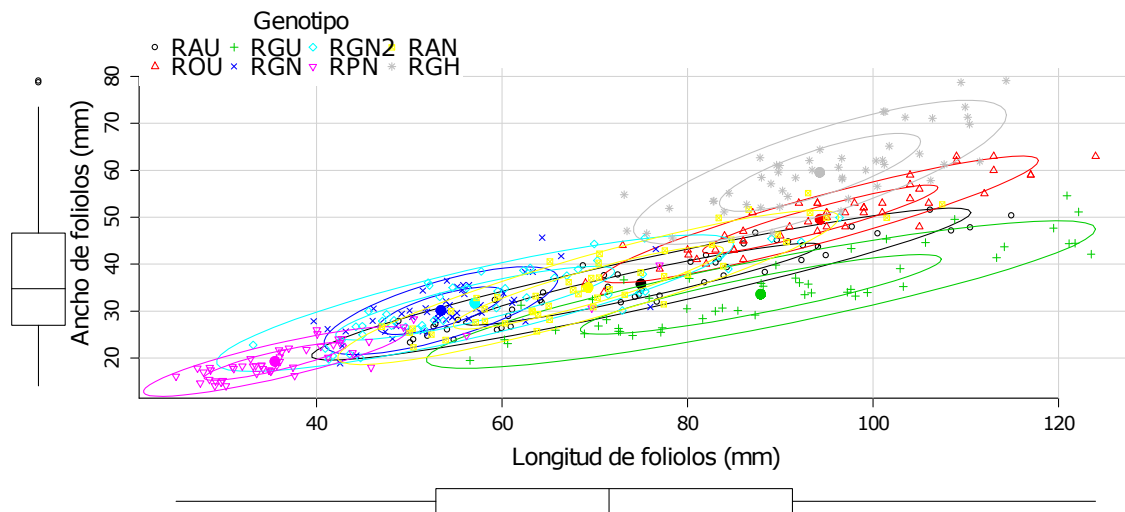


Figura 4.2: Tamaño de foliolos de *Rubus* spp., colecta 3. Nótese mayores diferencias en longitud y ancho de foliolos entre materiales de *Rubus*, respecto al periodo de colecta 2. Donde del total de foliolos evaluados, el 50 % presentó un tamaño longitudinal aproximado de entre 55 mm y 90 mm, así como una anchura de entre 28 mm y 40 mm, valores representados por los diagramas de cajas y bigotes ubicados en la parte inferior y en el extremo izquierdo del diagrama de dispersión.

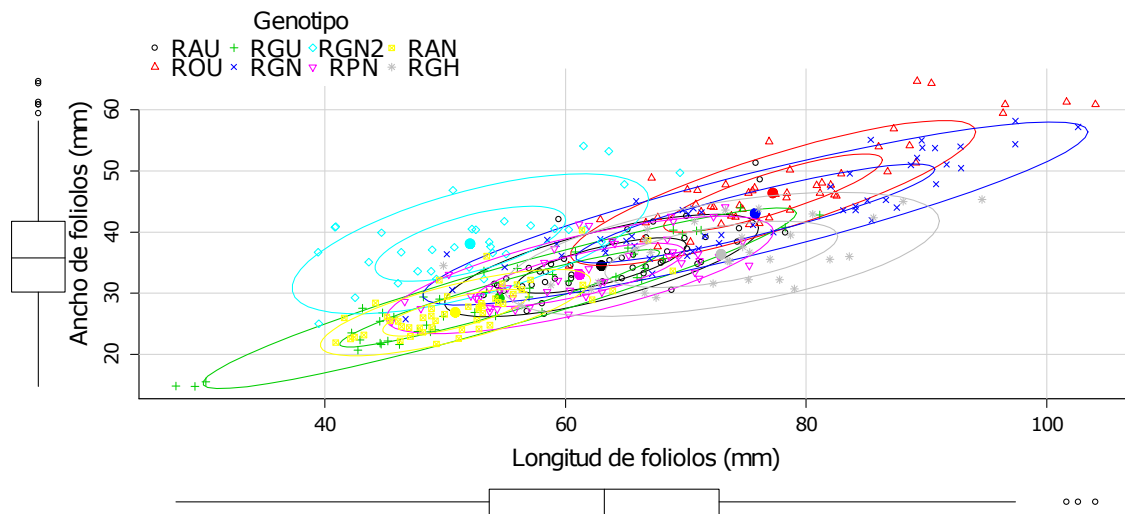


Figura 4.3: Tamaño de foliolos de *Rubus* spp., colecta 4. Obsérvese una reducción generalizada en longitud de foliolos respecto a muestras colectadas en estado silvestre. Donde el 50 % de las muestras presentó un tamaño longitudinal de entre 55 mm y 75 mm, así como una anchura de entre 30 mm y 42 mm, valores representados por los diagramas de cajas y bigotes ubicados en la parte inferior y en el extremo izquierdo del diagrama de dispersión.

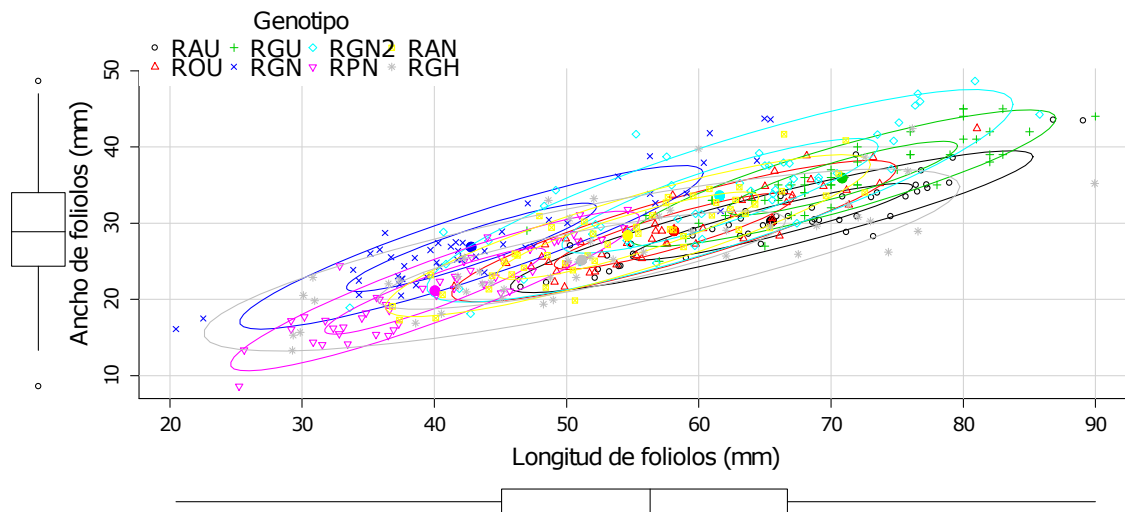


Figura 4.4: Tamaño de foliolos de *Rubus* spp., colecta 5. Nótese una reducción generalizada en tamaño de foliolos respecto a muestras colectadas en estado silvestre. Donde el 50 % de las muestras presentó un tamaño longitudinal de entre 45 mm y 65 mm, así como una anchura de entre 25 mm y 35 mm, valores representados por los diagramas de cajas y bigotes ubicados en la parte inferior y en el extremo izquierdo del diagrama de dispersión.

4.1.2. Color de foliolos

De manera similar a los resultados obtenidos para el tamaño, el color de los foliolos fue distinto entre genotipos y dentro de un mismo genotipo al evaluar diferentes periodos de

colecta tanto en estado silvestre como en invernadero (Figura 4.5).

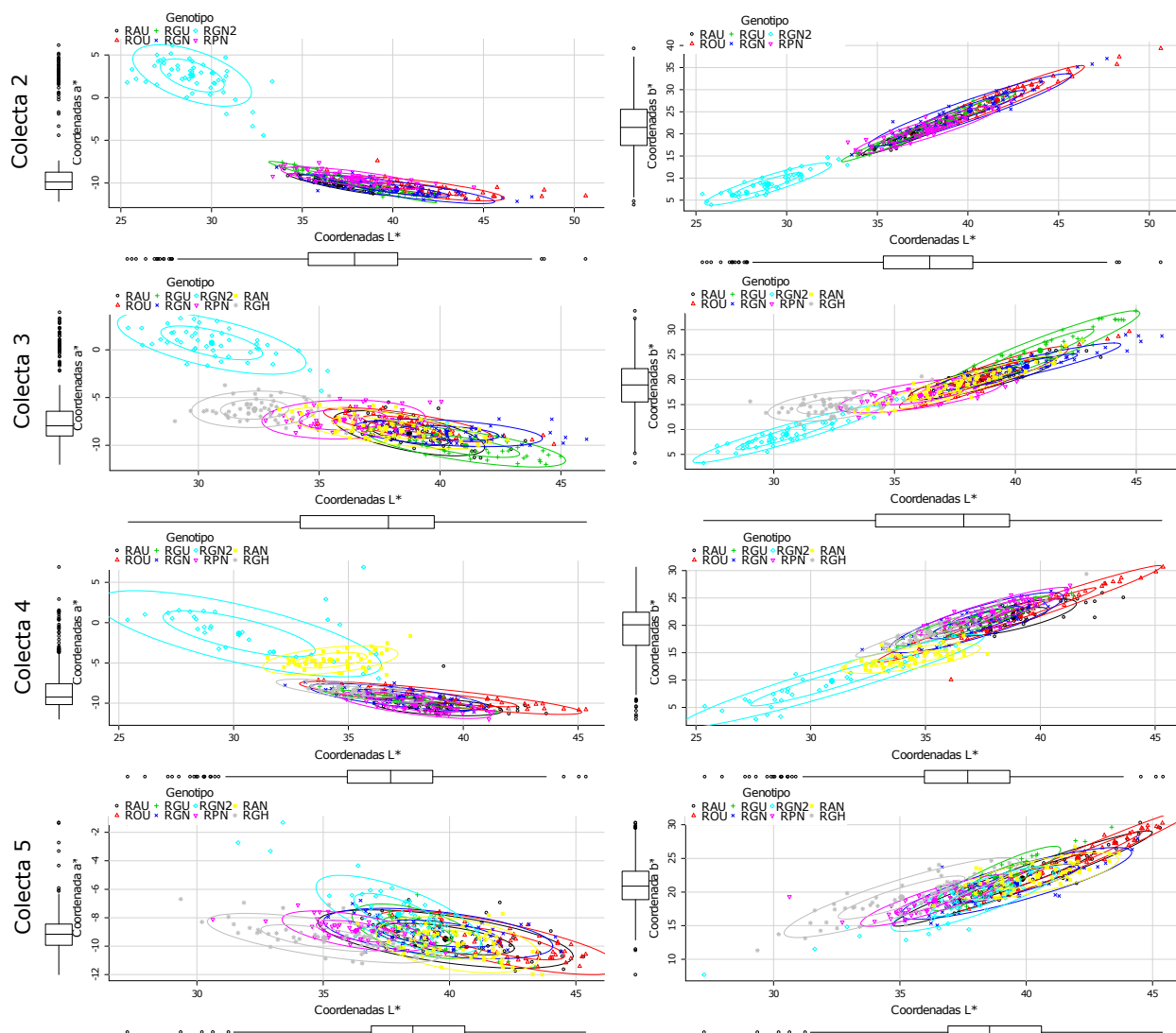


Figura 4.5: Coordenadas de color $L^*a^*b^*$ para folíolos de *Rubus* spp. Diagramas de dispersión ubicados a la izquierda muestran valores L^* y a^* , mientras que diagramas ubicados a la derecha valores L^* y b^* . Nótese que durante los diferentes periodos de colecta existen diferencias entre los materiales de *Rubus* (cada uno representado por un color particular), siendo el periodo de colecta 2 donde se observa mayor homogeneidad. Por otra parte, RGN2 (color azul) fue quien presentó valores contrastantes respecto al resto de materiales.

4.2. Rendimiento de extracto

Con relación al rendimiento de extracto, de manera general el metanol extrajo mayor concentración de compuestos polares ($p < 0.001$), para muestras colectadas en campo e inver-

nadero (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1: Diferencias en rendimiento de extracto (mg/g de muestra) entre maceración metanólica y etanólica de hojas de *Rubus* spp., códigos de significancia: ”***” ($p < 0.001$), ”**” ($p < 0.01$) y ”*” ($p < 0.05$). S/D= sin datos. Obsérvese que en las comparaciones donde se registran diferencias significativas, el mayor rendimiento de extracto corresponde a maceración metanólica.

Genotipo	Colecta	Maceración		Significancia
		Metanólica	Etanólica	
ROU	1	166.7±4	135.3±12.4	***
	2	194.7±1.5	71.7±1.2	***
	3	162±2	137±5.3	**
	4	191±10.1	153±3	***
	5	200.7±7.6	132.3±8	***
RAU	1	183±12.1	120.3±2.5	***
	2	159.7±7.2	74.3±0.6	***
	3	212.7±4.6	148.3±6.5	***
	4	188±3.1	160.7±2.9	***
	5	193±2.3	136.7±6	***
RGU	1	157.7±0.6	138.3±4.2	***
	2	200.7±3.1	90.7±2.9	***
	3	184±4.4	166.7±2.9	***
	4	183±1	147.3±4	***
	5	213.3±1.2	132.3±6.5	***
RGN	1	160.3±8.1	118.7±1.5	***
	2	193±23.1	38±1	***
	3	183±2.6	148.7±5.7	**
	4	179.3±2.1	95.3±1.5	***
	5	167.3±5.5	128.7±3.1	***
RGN2	1	187.3±2.9	134±2.6	***
	2	182.3±1.5	38±5.6	***
	3	175.7±6.4	154.3±2.5	**
	4	167.3±4.7	148±4.6	**
	5	184.3±9.8	133.7±2.5	***
RAN	1	214.3±4.2	158.3±3.2	***
	2	205.5±5	51.7±2.1	***
	3	202.3±2.5	147.3±3.1	***
	4	205.3±5.7	174.3±4.9	***
	5	175±3	159±1	**
RPN	1	172.3±4.2	148.7±5.5	***
	2	154.3±9.1	41.3±1.5	***
	3	125.7±1.2	116.7±3.5	
	4	220.7±7.4	146±2.6	***
	5	176±5.3	160.7±3.5	*
RGH	1	139±1.7	117.7±1.2	***
	2	155.7±2.3	32±1	***
	3	137.7±3.1	135.3±2.5	
	4	131.3±2.5	S/D	
	5	122.3±5.5	S/D	

Registrando un valor mínimo de 122.3 ± 5.5 mg de extracto/g y un máximo de 220.7 ± 7.4 mg/g; mientras que el etanol presentó un aproximado de 100 mg menos, tanto para su valor inferior como superior respecto al metanol.

Al comparar el rendimiento de extracto (mg/g de muestra) entre genotipos de una misma especie colectados en diferentes zonas geográficas (Uruapan, Nahuatzen y Cd. Hidalgo, Michoacán), se observaron diferencias, lo cual indica que aunque el periodo de colecta sea el mismo la síntesis de compuestos polares difiere para cada material por efecto de la región donde se desarrolla (Figura 4.6). Por otra parte, también se observaron diferencias al establecer las plantas bajo invernadero, donde las condiciones de riego, nutrición, temperatura, luminosidad y humedad, entre otras, inciden de manera homogénea para los materiales evaluados, lo que sugiere que la variación no solo se debe a la influencia de la región de crecimiento sino también a una posible variación genotípica que pudo surgir como respuesta a las diferentes fuerzas de selección natural que afectan a los materiales de acuerdo a la región en la que se desarrollan.

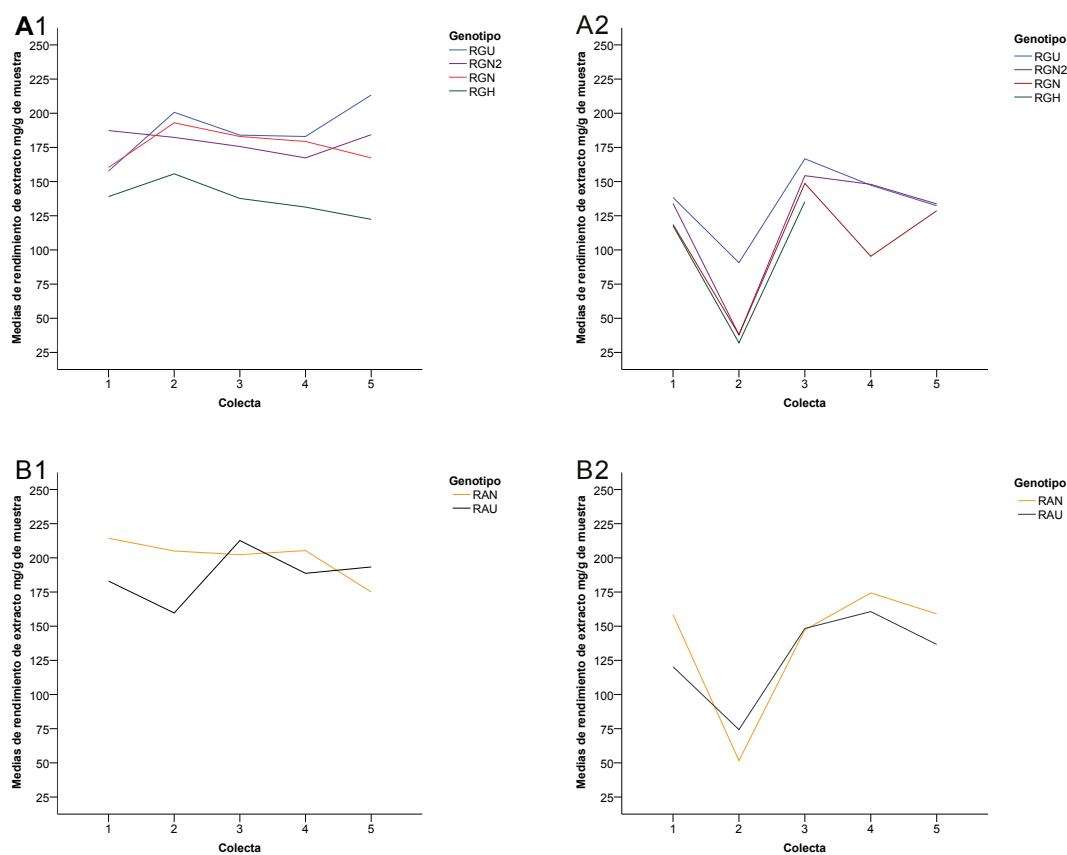


Figura 4.6: Efecto de la zona de colecta y el periodo de colecta sobre el rendimiento de extracto entre genotipos de *Rubus glaucus* (A1 extractos metanólicos y A2 extractos etanólicos) y *Rubus adenotrichus* (B1 extractos metanólicos y B2 extractos etanólicos). Nótese diferencias en rendimiento de extracto para genotipos de cada especie, en un mismo periodo de colecta tanto en estado silvestre (colecta 1, 2 y 3) como en invernadero (colecta 4 y 5).

Al evaluar las condiciones de crecimiento se observó una media en rendimiento de extracto superior para invernadero (163.56 mg/g de muestra) $p < 0.001$, donde extractos metanólicos de algunas plantas, presentaron mayor rendimiento en comparación a extractos de los mismos ejemplares pero colectados en estado silvestre. En contraparte, extractos metanólicos de RAN y RGH de la colecta 5 mostraron menor rendimiento, $p < 0.05$, respecto a extractos (metanólicos) de plantas silvestres.

Por otra parte, se observó interacción, $p < 0.001$, entre periodo de colecta y genotipo evaluado, en estado silvestre e invernadero, sobre el rendimiento de extracto obtenido tanto por maceración metanólica como etanólica (Figura 4.7).

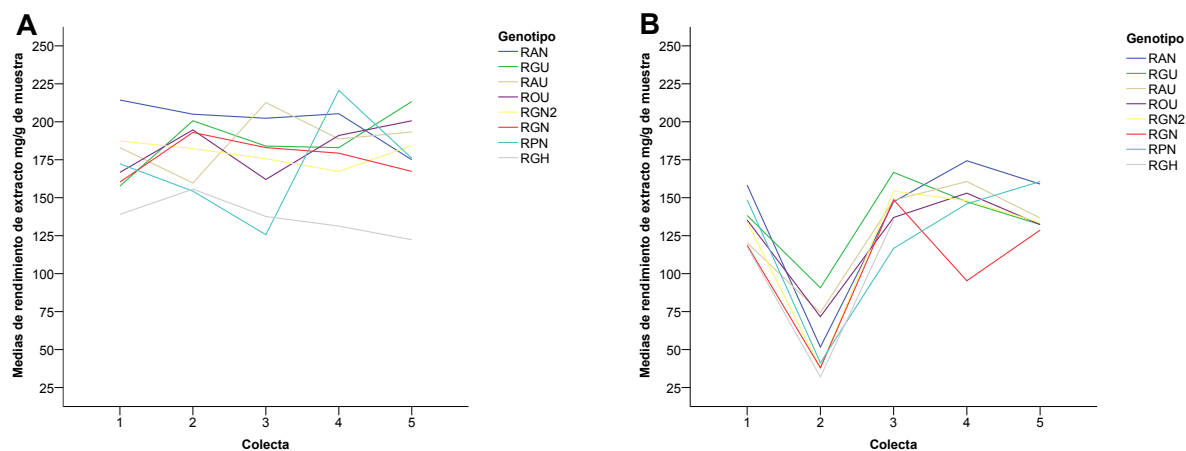


Figura 4.7: Interacción en rendimiento de extracto entre materiales de *Rubus* spp., por efecto del periodo de colecta (A maceración metanólica y B maceración etanólica). Obsérvese que a través de los periodos de colecta cambia la jerarquía de materiales de *Rubus* a partir de los cuales se obtiene mayor rendimiento de extracto.

Finalmente no se observaron relaciones lineales homogéneas (coeficiente de correlación “CC” y valores de R^2) para los distintos materiales de *Rubus* (ver cuadros 6.5 y 6.6 en el apartado de anexos), al correlacionar las características físicas de sus folíolos durante diferentes periodos de colecta con el rendimiento de extracto obtenido, lo que sugiere que no se puede realizar una predicción precisa del rendimiento de extracto a obtener, teniendo como base el tamaño y color de folíolos.

4.3. Contenido de polifenoles

Como se comento en el apartado de materiales y métodos, para poder determinar la concentración de polifenoles presente en las muestras (hojas de *Rubus*), se construyo una curva de calibración con ácido gálico, la cual presentó valores de R^2 y coeficiente de correlación superiores a 0.995 (Figura 4.8) y se obtuvo la siguiente ecuación:

$$Y = a + b * X$$

donde Y es igual a la absorbancia, a corresponde al intercepto, b a la pendiente y X a la concentración de ácido gálico (los valores a y b son obtenidos a partir del análisis de regresión), ecuación que se empleó para determinar la concentración de polifenoles por unidad de extracto de hojas de *Rubus* spp.

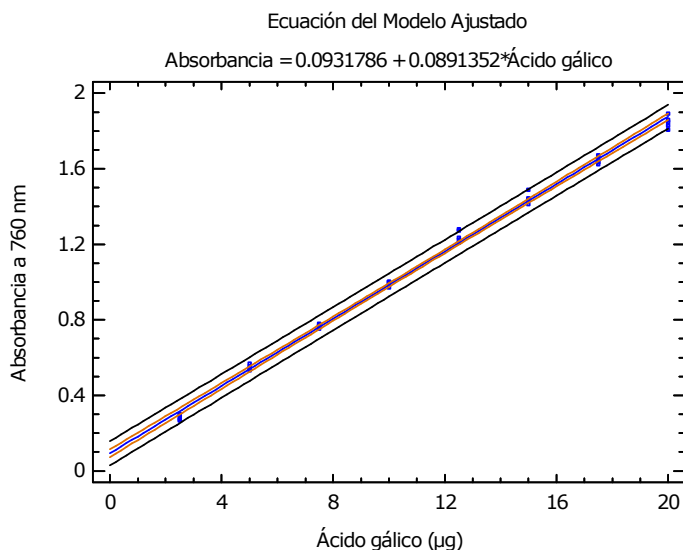


Figura 4.8: Curva de calibración con ácido gálico. Obsérvese que el incremento en absorbancia es proporcional al incremento en concentración de ácido gálico.

La concentración de polifenoles en extractos metanólicos de hojas de los materiales evaluados, fue comparable a la reportada para frutos de algunos cultivares de zarzamora y frambuesa, entre 1000 y 5000 mgEAG/100 gr de muestra seca (Cuevas-Rodríguez et al., 2010; Milosević et al., 2012; de Souza et al., 2014; Mikulic-Petkovsek et al., 2017).

Como ya se comentó, el metanol registró un mayor poder extractante respecto al etanol. Esta tendencia se mantuvo de manera general con la extracción de polifenoles, ya que el metanol extrajo una concentración superior ($p < 0.05$) en el 70 % de las muestras, mientras que en el 30 % restante no se observaron diferencias significativas (Cuadro 4.2). Resultados similares fueron reportados por Azlim Almey et al. (2010) quienes compararon el contenido de polifenoles de cuatro especies de plantas y observaron que en tres de ellas (*Polygonum minus*, *Murraya koenigii* y *Citrus hysrix*) el metanol extrajo mayor concentración respecto al etanol, mientras que, con el cuarto material (*Pandanus odoru*) el extracto etanólico presentó una concentración mayor de polifenoles. Lo anterior resalta la importancia de emplear solventes con diferentes grados de polaridad para la extracción de polifenoles, ya que estos compuestos al acomplejarse con moléculas como azúcares, ácidos o grupos alquilo, cambian su polaridad dificultando una extracción eficiente (García-Salas et al., 2010).

Cuadro 4.2: Diferencias en rendimiento de polifenoles (mgEAG/g de muestra) entre maceración metanólica y etanólica de hojas de *Rubus* spp., códigos de significancia: ”***” ($p < 0.001$), ”**” ($p < 0.01$) y ”*” ($p < 0.05$). S/D= sin datos. Apréciase que en las comparaciones donde se registran diferencias significativas, el mayor rendimiento de polifenoles corresponde a maceración metanólica.

Genotipo	Colecta	Maceración		Significancia
		Metanólica	Etanólica	
ROU	1	17.4±1.3	14.6±0.7	
	2	50.3±3.1	22.6±0.7	***
	3	35.4±1.7	30.7±0.9	*
	4	38.1±1.6	26.3±0.9	***
	5	48.9±2.2	38.2±0.9	***
RAU	1	10.1±1.3	8.8±0.4	
	2	28.5±1.1	24.7±0.7	*
	3	30±0.2	19.5±0.8	***
	4	20.3±2.2	17.8±0.8	
	5	35.4±2	26.5±0.3	***
RGU	1	22.3±1.2	21.4±0.3	
	2	42.1±3.1	33±0.3	***
	3	49.3±1.9	46.3±1.7	
	4	48.3±1.4	27.2±0.9	***
	5	41.3±0.9	29.2±1.5	***
RGN	1	22.9±1.1	22±0.3	
	2	21.1±0.1	4.6±0.1	***
	3	23.3±0.4	16.2±0.6	***
	4	21.8±0.8	11.3±0.5	***
	5	35.3±0.6	25.9±0.8	***
RGN2	1	32.1±1.7	31.1±0.5	
	2	36.2±1.9	7.6±0.3	***
	3	46.5±1.9	38.3±0.5	***
	4	27.6±1.1	19.6±0.7	***
	5	41.7±0.6	29.2±0.9	***
RAN	1	30.6±1.7	22.8±0.2	***
	2	29.4±1.1	7±0.6	***
	3	36.1±1.2	20.9±0.4	***
	4	29.1±0.5	22.3±3.3	***
	5	27.8±1.2	22.8±0.3	**
RPN	1	26.5±0.8	27.4±0.8	
	2	28.4±1.9	7±0.6	***
	3	18.7±0.3	15.7±0.9	
	4	45.9±1	24.4±0.6	***
	5	53.6±3.6	45.2±1.4	***
RGH	1	19.7±0.6	17.6±0.6	
	2	20.6±0.9	1.9±0.7	***
	3	25.2±1.9	23.3±1	
	4	S/D	S/D	
	5	25.5±0.7	S/D	

Al comparar la concentración de polifenoles entre genotipos de una misma especie colectados en diferentes zonas geográficas, se observaron resultados similares a los obtenidos para el rendimiento de extracto, donde el rendimiento de polifenoles fue diferente entre genotipos durante los diferentes periodos de colecta (Figura 4.9). Resultados similares fueron reportados por Tabarki et al. (2017), quienes al comparar el contenido de polifenoles totales de 4 genotipos de *Rubus ulmifolius* colectados en diferentes zonas geográficas, encontraron diferencias significativas, atribuyendo esta variación a las diferentes zonas de colecta de las muestras. Estos autores también observaron diferencias en el perfil fitoquímico de los extractos, donde compuestos fenólicos tales como el ácido gálico, ácido clorogénico y kaempferol variaron en concentración, diferencias que potencialmente puede afectar la bioactividad de los extractos.

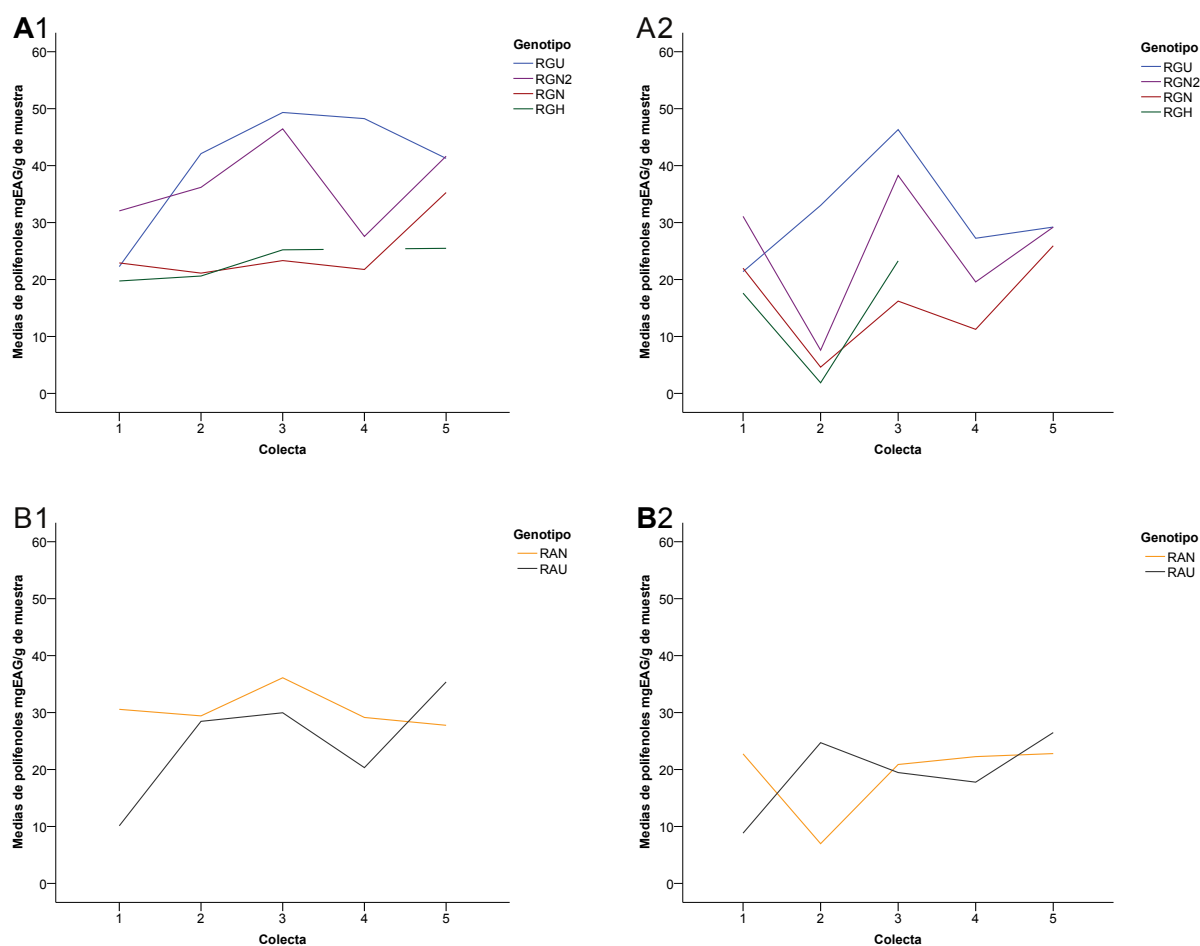


Figura 4.9: Efecto de la zona y el periodo de colecta sobre el rendimiento de polifenoles entre genotipos de: A) *Rubus glaucus* (A1 extractos metanólicos y A2 extractos etanólicos) y B) *Rubus adenotrichus* (B1 extractos metanólicos y B2 extractos etanólicos). Nótese diferencias en rendimiento de polifenoles para genotipos de cada especie, en un mismo periodo de colecta.

Los resultados evidenciaron que la condición de crecimiento influyó sobre la producción

de polifenoles, sin embargo, la respuesta varió durante los diferentes periodos de colecta y fue distinta para cada genotipo de *Rubus* evaluado, lo que sugiere que cada material de *Rubus*, aun siendo de la misma especie, presentó diferente capacidad para sintetizar metabolitos como respuesta de adaptación a las condiciones de desarrollo (Figura 4.10), indicando que el genotipo es el factor que más influye sobre la producción de estos compuestos.

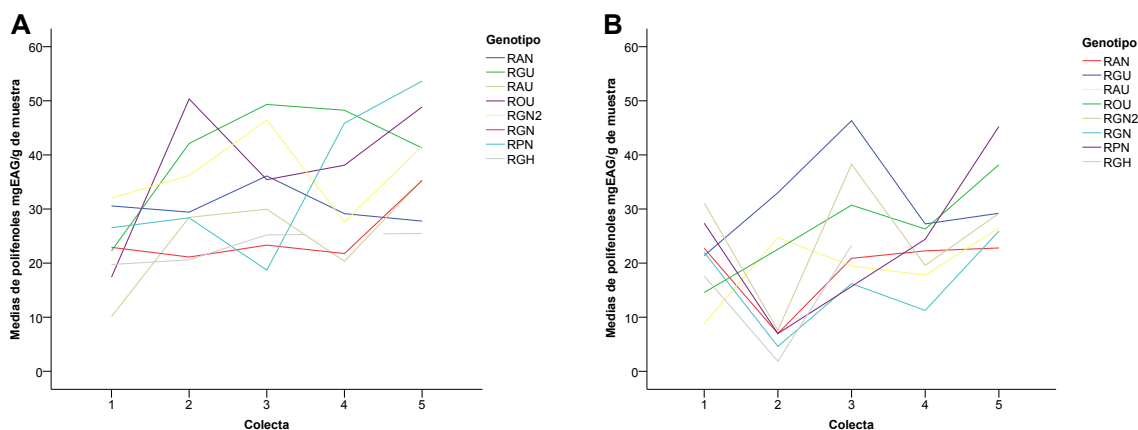


Figura 4.10: Interacción en rendimiento de polifenoles entre materiales de *Rubus* spp., por efecto del periodo de colecta (A maceración metanólica y B maceración etanólica). Obsérvese que a través de los periodos de colecta cambia la jerarquía de materiales de *Rubus* a partir de los cuales se obtiene mayor rendimiento de polifenoles, inclusive al encontrarse en invernadero (colecta 4 y 5).

Lo anterior se observó al comparar la producción de polifenoles entre materiales silvestres y establecidos bajo condiciones controladas, donde algunos ejemplares como RPN, incrementaron la producción de polifenoles en invernadero ($p < 0.001$) en contraparte con materiales como RGN que mantienen la producción bajo estas condiciones (Figura 4.11). Resultados similares fueron reportados por Cardeñosa et al. (2016), quienes al evaluar el contenido de polifenoles en variedades de arándano bajo diferentes condiciones de crecimiento (túnel plástico y cielo abierto) concluyeron que el genotipo fue el factor que más influyó sobre la producción de estos metabolitos, así mismo Gündüz and Özdemir (2014) reportaron que plantas de fresa establecidas bajo invernadero pueden producir concentraciones de polifenoles similares a plantas crecidas en cielo abierto.

Por otra parte, se observó interacción, $p < 0.001$, entre el rendimiento de polifenoles obtenido por maceración metanólica y etanólica para un mismo material de *Rubus* a través del tiempo (Figura 4.11).

Finalmente no se observaron relaciones lineales homogéneas (coeficiente de correlación “CC” y valores de R^2) para los distintos materiales de *Rubus* (ver cuadros 6.7 y 6.8 en el apartado de anexos), al correlacionar las características físicas de sus folíolos durante diferentes periodos de colecta con el rendimiento de polifenoles, lo que sugiere que no se puede realizar una predicción confiable del rendimiento de polifenoles a obtener, teniendo como base el tamaño y color de folíolos.

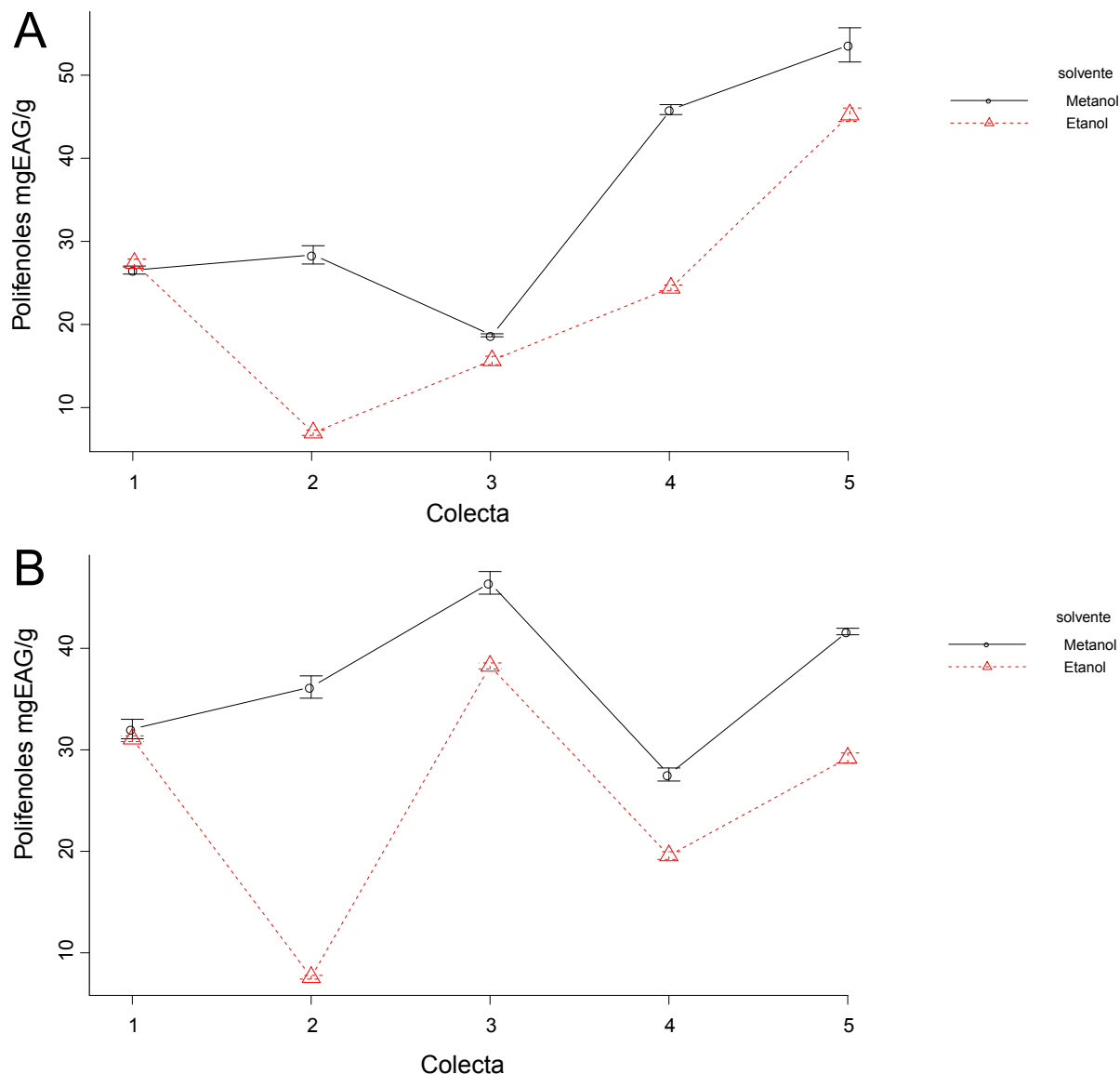


Figura 4.11: Interacción en rendimiento de polifenoles extraídos mediante maceración metanólica y etanólica, por efecto del periodo de colecta ($p < 0.001$) y la condición de crecimiento (colecta 1,2 y 3 corresponden a materiales silvestres y colecta 4 y 5 a materiales establecidos en invernadero). A) *Rubus pringlei* (RPN) y B) *Rubus glaucus* (RGN). Apréciase que en ciertos periodos de colecta se obtiene el mismo rendimiento de polifenoles para ambos tipos de maceración.

4.4. Sensibilidad a antibióticos (antibiogramas)

Los resultados evidenciaron que las bacterias *Clavibacter michiganensis* subsp., *michiganensis* y *Pantoea stewartii* presentan mayor sensibilidad a antibióticos respecto a *Pseudomonas* sp., (Figura 4.12). Siendo la gentamicina el antibiótico que mostró efecto inhibitorio

sobre los tres microorganismos evaluados, por lo tanto se eligió como control positivo para los ensayos de difusión en disco y dilución seriada (Cuadro 4.3).

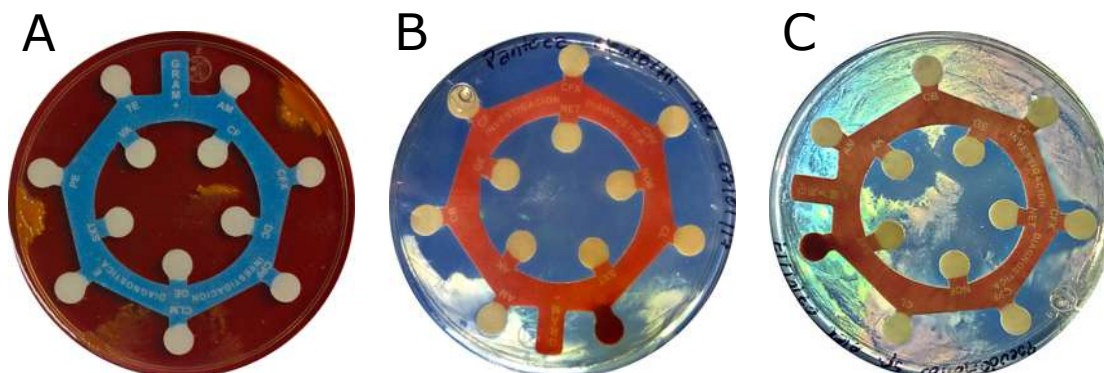


Figura 4.12: Sensibilidad de bacterias a antibióticos. *Clavibacter michiganensis* subsp., *michiganensis* (A), *Pantoea stewartii* (B) y *Pseudomonas* sp., (C). Apreciese que *Pseudomonas* sp., muestra mayor resistencia a antibióticos.

Cuadro 4.3: Sensibilidad de las bacterias a antibióticos. Las X representan a los antibióticos que mostraron inhibición bacteriana. Nótese que la gentamicina y la ciprofloxacina son los antibióticos que inhiben el crecimiento de las tres bacterias evaluadas.

Clave	Antibiótico	Concentración	<i>Cmm</i>	<i>Pantoea stewartii</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
AM	Ampicilina	10 μg	X		
CF	Cefalotina	30 μg		X	
CFX	Cefotaxima	30 μg	X	X	
NET	Netilmicina	30 μg		X	X
CPF	Ciprofloxacina	5 μg	X	X	X
NOF	Norfoxacina	10 μg		X	
SXT	Sulfametoxazol y Trimetoprima	25 μg	X	X	
AK	Amikacina	30 μg		X	X
GE	Gentamicina	10 μg	X	X	X
VA	Vancomicina	30 μg	X		
TE	Tetraciclina	30 μg	X		
NET	Netilmicina	30 μg			

4.5. Sensibilidad bacteriana a extractos mediante difusión en disco

Con base a los resultados obtenidos para rendimiento de extracto y polifenoles, se esperaba encontrar una actividad antibacteriana predominante hacia extractos metanólicos. De manera

interesante los extractos metanólicos no presentaron la tendencia esperada, ya que tanto metanólicos como etanólicos generaron halos inhibición, contra *Clavibacter michiganensis* subsp., *michiganensis* (Cmm: Figura 4.13), clasificados como inactivos (<9 mm), parcialmente activos (de 9 a 12 mm) y activos (de 13 a 18 mm), de acuerdo a lo descrito por Alves et al. (2000).

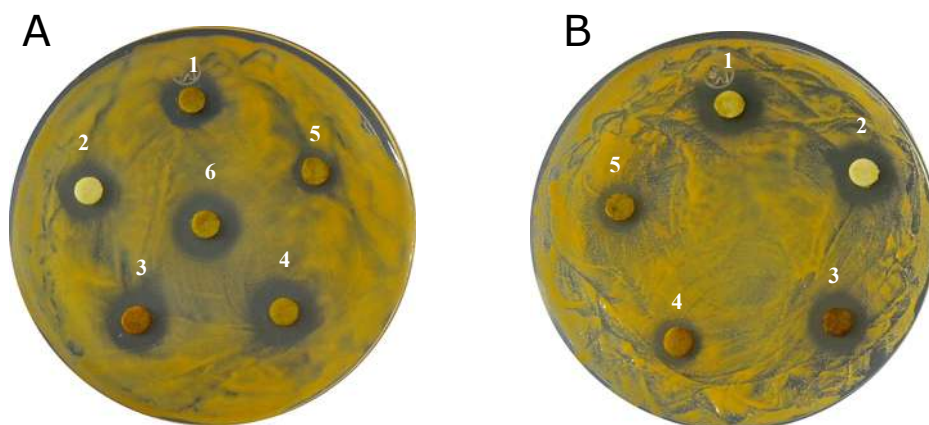


Figura 4.13: Efecto inhibitorio de extractos metanólicos (A) de RAU (1), RPN (2), RGN2 (3), RGU (4), RGN (5) y ROU (6) así como etanólicos (B) de RAU (1), RPN (2), RGN2 (3), RAN (4) y RGN (5) de la colecta 2, sobre *Clavibacteri michiganensis* subsp., *michiganensis*. Apréciese que a pesar de colocar la misma concentración de extracto en cada uno de los discos (600 μ g), se observan diferentes diámetros de inhibición.

Por otra parte el control con gentamicina generó halos de inhibición de 33 ± 1.56 mm, que siguiendo el mismo esquema de clasificación se encuentra en la categoría de muy activo (>18 mm: Figura 4.14).

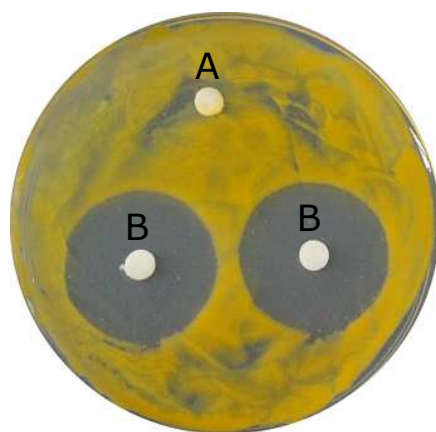


Figura 4.14: Efecto del control negativo (A) y control positivo (B) sobre *Clavibacter michiganensis* subsp., *michiganensis*. Obsérvece que el DMSO (control negativo) no genera halos de inhibición.

Al parecer dentro de un mismo genotipo se sintetizan diferentes compuestos antimicrobianos a lo largo de los periodos de colecta, lo anterior fue evidenciado en muestras de RPN, donde extractos metanólicos de las colectas 2, 3 y 4 presentaron mayor inhibición, $p < 0.01$ (Figura 4.15), a diferencia de la colecta 1 donde se registró mayor inhibición, $p < 0.001$, por efecto de extractos etanólicos, ésto también indica que cada solvente fue capaz de extraer diferentes compuestos con actividad antibacteriana, a partir de una misma muestra. Resultados similares fueron descritos por Zeidan et al. (2013) quienes reportaron que extractos metanólicos y etanólicos de *Rubus sanguineus*, presentaron la misma actividad contra bacterias Gram negativas, pero al evaluar bacterias Gram positivas observaron mayor actividad por efecto de extractos etanólicos.

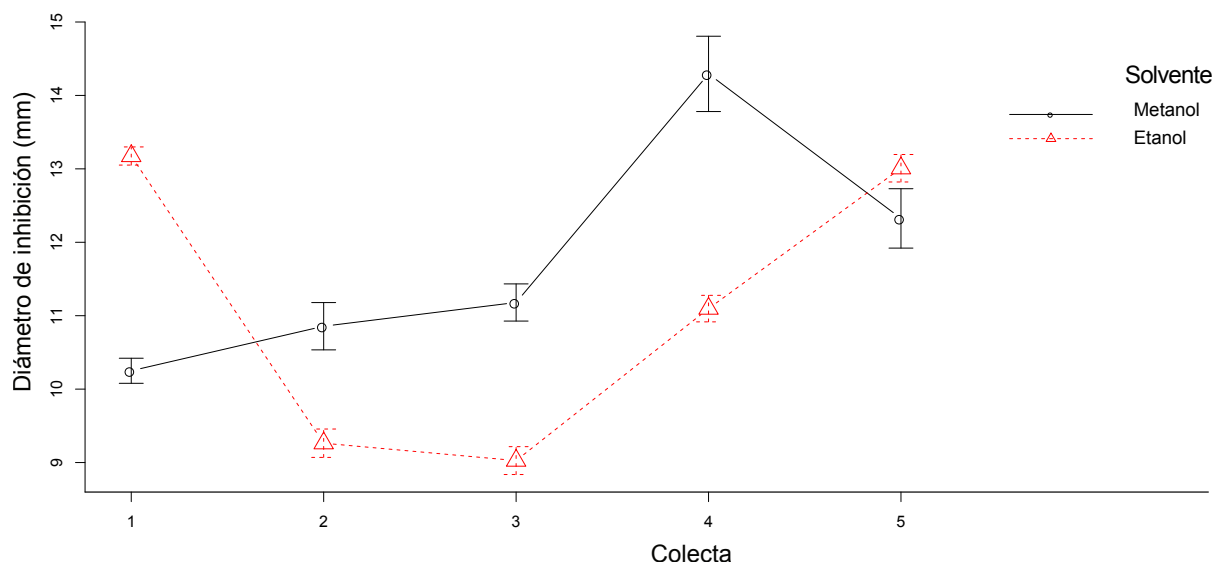


Figura 4.15: Interacción entre la actividad antibacteriana, frente a *Clavibacter michiganensis* subsp., *michiganensis*, de extractos metanólicos y etanólicos de RPN por efecto del periodo de colecta. Colectas 1, 2 y 3 corresponden a material silvestre y colectas 4 y 5 a material crecido en invernadero. Nótese que en ciertos periodos de colecta el grado de actividad antibacteriana es mayor en extractos etanólicos, respecto a extractos metanólicos del mismo material de *Rubus*.

De manera similar a los resultados obtenidos para extracto y polifenoles, se observaron diferencias significativas al comparar la actividad antibacteriana de extractos metanólicos y etanólicos de genotipos de una misma especie pero colectados en diferentes zonas geográficas (Figura 4.16). Resultados similares son reportados por Tabarki et al. (2017) quienes al evaluar la actividad antibacteriana de extractos metanólicos de cuatro ejemplares de *Rubus ulmifolius*, crecidos en diferentes regiones geográficas, mostraron diferente actividad antimicrobiana, con halos de inhibición similares a los reportados en el presente trabajo. Ellos atribuyen esta variación a la diferente composición fitoquímica de los extractos, dada por efecto de la condición de crecimiento, entre los compuestos que variaron encontraron ácido gálico, ácido clorogénico y kaempferol.

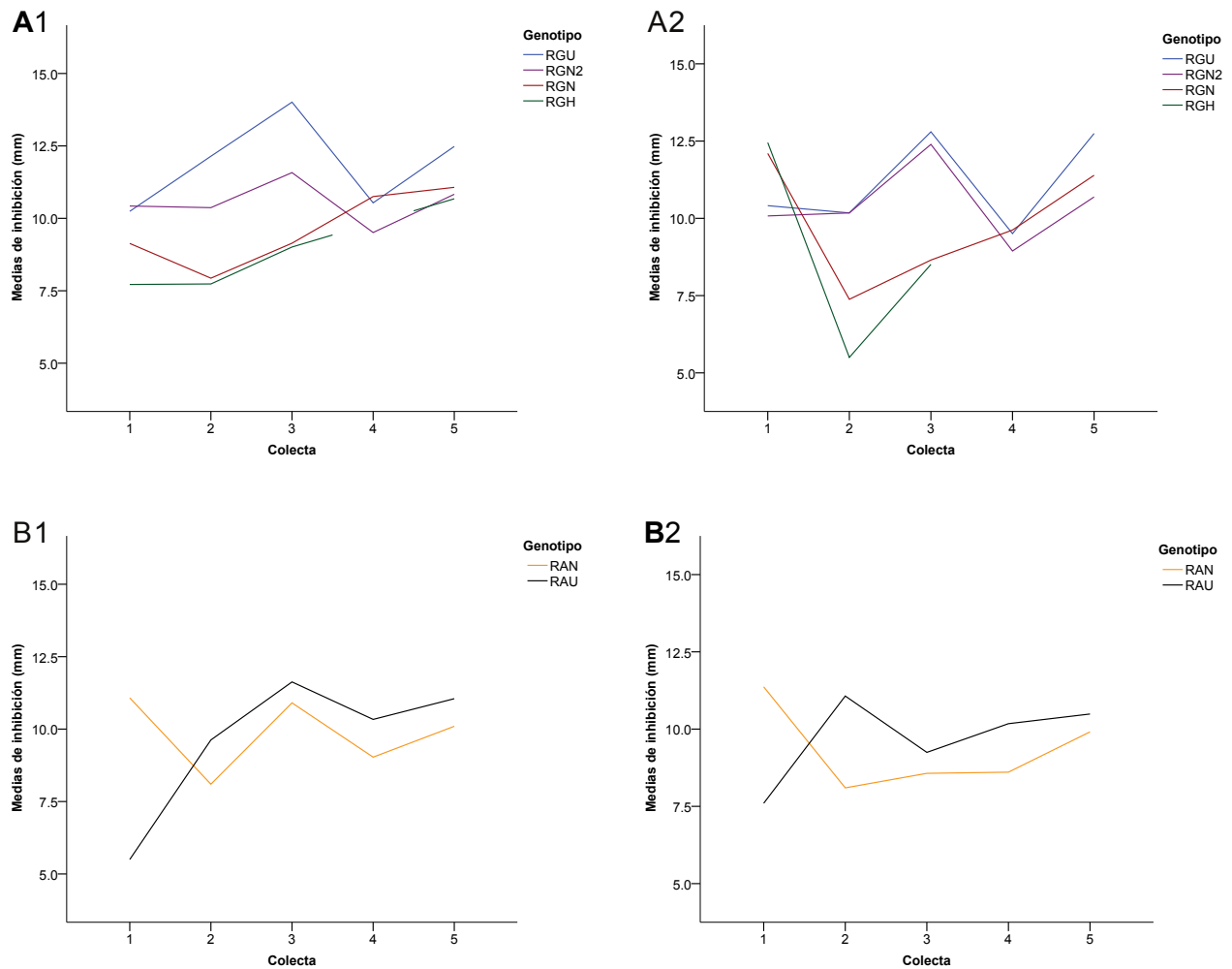


Figura 4.16: Efecto de la zona y el periodo de colecta sobre la actividad antibacteriana, contra *Clavibacter michiganensis* subsp., *michiganensis*, de genotipos de: A) *Rubus glaucus* (A1 extractos metanólicos y A2 extractos etanólicos) y B) *Rubus adenotrichus* (B1 extractos metanólicos y B2 extractos etanólicos). Apréciense diferencias en diámetros de inhibición para extractos de diferentes genotipos de una misma especie, en un mismo periodo de colecta.

Con relación a la condición de crecimiento, extractos metanólicos de algunos ejemplares de *Rubus* en invernadero, como RPN, mostraron mayor inhibición ($p < 0.001$) respecto a extractos del mismo material pero en estado silvestre, mientras que muestras de materiales como RGN2 mantuvieron su actividad, $p < 0.05$ (Figura 4.17). Lo anterior sugiere que la actividad de los extractos está más influenciada por la plasticidad que presenta cada genotipo que por las propias condiciones de crecimiento. Resultados similares fueron reportados por Ouerghemmi et al. (2017), quienes al evaluar la actividad antimicrobiana de extractos metanólicos de *Ruta chalepensis*, silvestre y cultivada, contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, reportaron que para *Pseudomonas aeruginosa* la mayor inhibición se dio por extractos de

plantas silvestres, mientras que para *Escherichia coli* por extractos de plantas cultivadas, lo que indica una modificación en tipo o concentración de compuestos antimicrobianos por efecto de la condición de crecimiento.

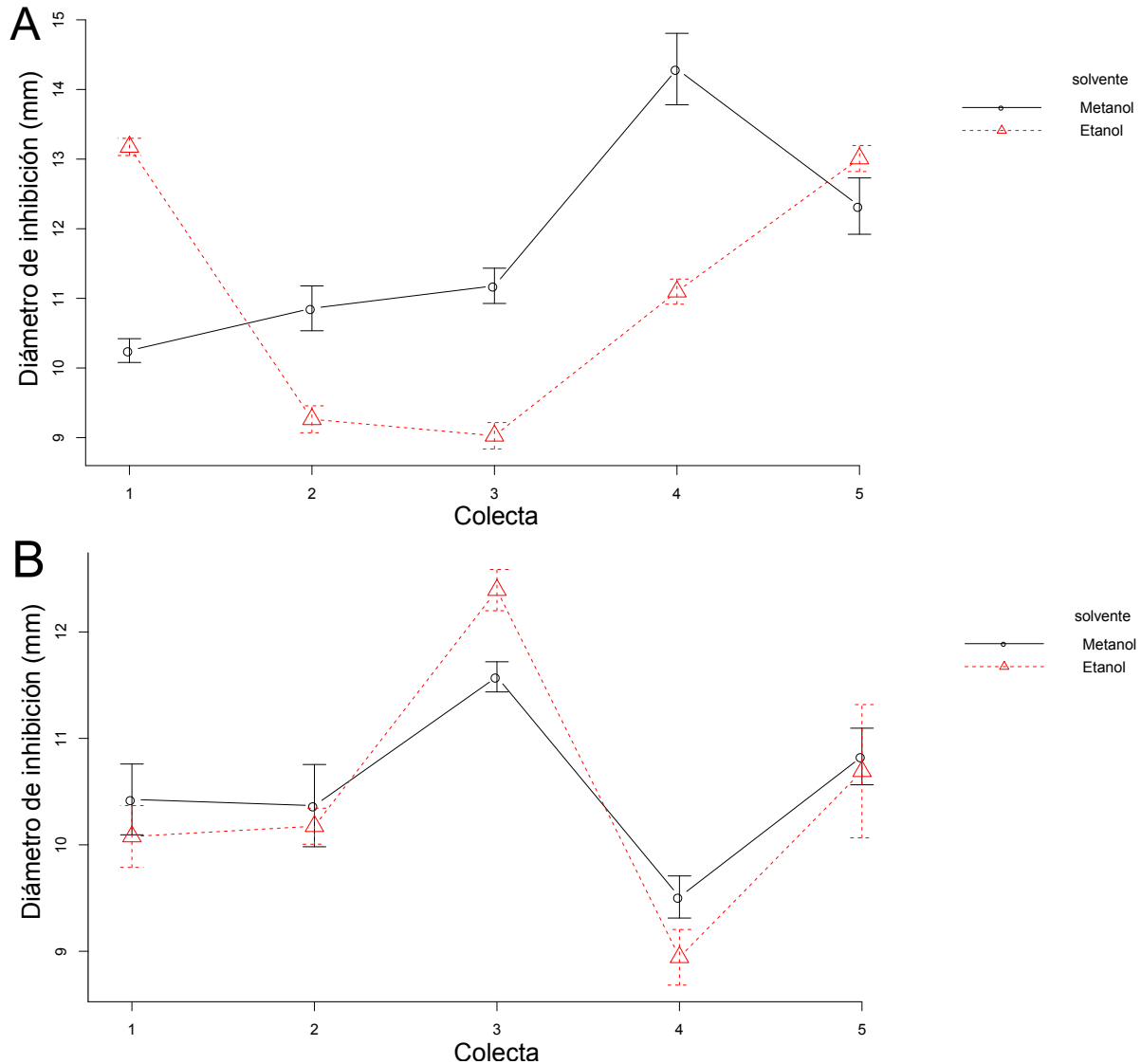


Figura 4.17: Efecto de la condición de crecimiento sobre la actividad antibacteriana, contra *Clavibacter michiganensis* subsp., *michiganensis*, de extractos de *Rubus pringlei* (RPN; A) y *Rubus glaucus* (RGN2; B). Colectas 1,2,3 corresponden a muestras obtenidas en estado silvestre mientras que colectas 4 y 5 a muestras obtenidas en invernadero. Obsérvese que en el periodo de colecta 4 se obtuvo una mayor inhibición por efecto de extractos metanólicos de RPN, en comparación con extractos metanólicos del mismo material pero en estado silvestre, mientras que extractos metanólicos y etanólicos de RGN2 presentan valores de inhibición que se encuentran dentro de la amplitud registrada en estado silvestre, para verificación consúltese los cuadros 6.2 y 6.3 en el apartado de anexos.

De manera similar a los resultados obtenidos para rendimiento de extracto y polifenoles, se observó interacción, $p < 0.001$, entre periodo de colecta y genotipo evaluado, tanto en estado silvestre como en invernadero, sobre la actividad antibacteriana (contra *Cmm*) de extractos metanólicos y etanólicos de *Rubus* spp., (Figura 4.18).

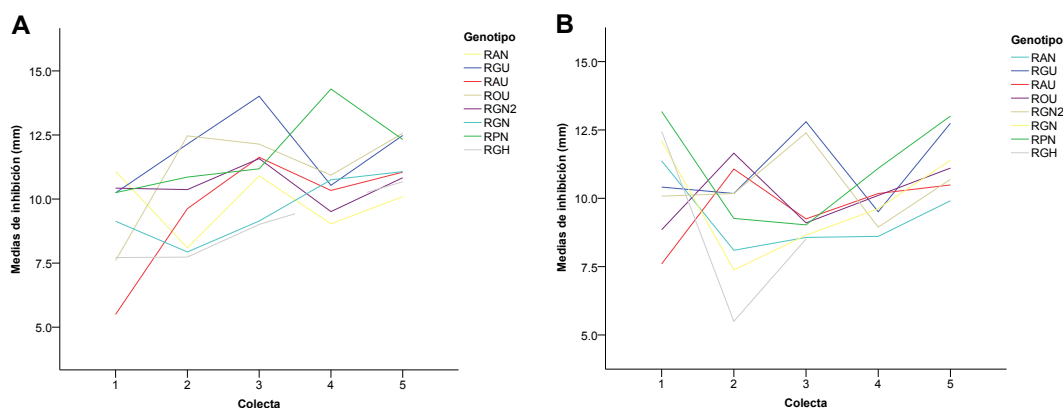


Figura 4.18: Interacción, $p < 0.001$, en actividad antibacteriana contra *Clavibacter michiganensis* subsp., *michiganensis*, entre materiales de *Rubus* spp., por efecto del periodo de colecta (extractos metanólicos A y extractos etanólicos B). Nótese que a través de los periodos de colecta cambia la jerarquía de materiales de *Rubus* a partir de los cuales se obtienen extractos que presentan mayor efecto inhibitorio sobre *Cmm*.

Con base en los resultados obtenidos en el análisis de regresión lineal (Cuadro 4.4) y puesto que de manera general el valor de p (*Valor - P*) fue menor a 0.05 (< 0.05) para extractos metanólicos y etanólicos de los genotipos evaluados (excepto para extractos etanólicos de RGU), se concluye que existe una relación estadísticamente significativa entre la variación de polifenoles a través del tiempo y la actividad antibacteriana de los extractos. Sin embargo también se observó que los coeficiente de correlación (CC) variaron entre genotipos, generando relaciones entre variables (polifenoles e inhibición) relativamente débiles ($CC > 0.1$ y < 0.5), moderadamente fuertes ($CC \geq 0.5$ y < 0.9) y relativamente fuertes ($CC \geq 0.9$ y < 1), esto sugiere que la producción de los compuestos que inhiben a *Cmm* puede no ser proporcional a la producción de polifenoles totales, por lo que no se puede considerar un incremento en producción de polifenoles como indicativo de un incremento proporcional en la actividad del extracto, lo anterior se demuestra al analizar el estadístico R^2 , ya que dependiendo del genotipo evaluado y el solvente (metanol o etanol) empleado durante la maceración, este puede explicar del 1.4% al 82% de la inhibición dada por la concentración de polifenoles presentes en el extracto por efecto del periodo de colecta (Figura 4.19).

Se ha reportado que existe correlación entre el contenido de polifenoles totales de hojas de *Rubus* spp., y la actividad antióxidante de los extractos (Tabarki et al., 2017), sin embargo son mínimos los trabajos que reporten correlación entre el contenido de polifenoles y la actividad antimicrobiana de extractos de *Rubus*, incluso durante la revisión bibliográfica no se encontró trabajo alguno en el que se reporte correlación entre la variación de polifenoles totales al evaluar diferentes periodos de colecta y la actividad antimicrobiana de los extractos,

Cuadro 4.4: Análisis de regresión lineal simple donde se evaluó la correlación entre la concentración de polifenoles (en 600 μg de extracto) durante los diferentes periodos de colecta y la actividad antimicrobiana contra *Clavibacter michiganensis* subsp., *michiganensis*. Apréciase que el valor de R^2 , es diferente para cada material de *Rubus*, indicando diferentes grados de correlación.

Genotipo	Extractos metanólicos				Extractos etanólicos			
	Valor - P	CC	R^2	R^2 ajus.	Valor - P	CC	R^2	R^2 ajus.
ROU	<0.001	0.9	0.82	0.81	<0.001	0.78	0.62	0.6
RAU	<0.001	0.72	0.52	0.5	<0.001	0.75	0.56	0.55
RGU	<0.05	0.38	0.14	0.11	>0.05	0.17	0.014	-0.02
RGN	<0.001	0.58	0.34	0.31	<0.001	0.82	0.67	0.66
RGN2	<0.001	0.68	0.46	0.44	<0.001	0.68	0.47	0.45
RAN	<0.01	0.48	0.23	0.2	<0.001	0.56	0.31	0.29
RPN	<0.05	0.42	0.17	0.14	<0.001	0.72	0.51	0.5
RGH	<0.001	0.88	0.78	0.78	<0.001	0.7	0.5	0.47

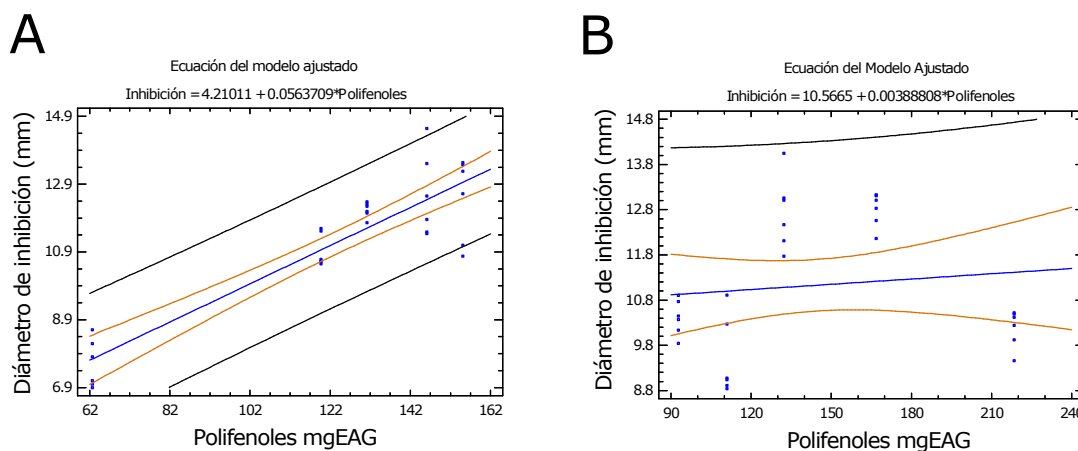


Figura 4.19: Modelo lineal ajustado, donde se contrasta la relación que existe entre las concentraciones de polifenoles registradas durante diferentes periodos de colecta y la actividad antibacteriana de los extractos, contra *Clavibacter michiganensis* subsp., *michiganensis*. (A) extractos metanólicos de ROU (*Rubus orthostachys*, Uruapan) y (B) extractos etanólicos de RGU (*Rubus glaucus*, Uruapan). Obsérvese que el incremento en bioactividad es casi proporcional al incremento en polifenoles para extractos de ROU, mientras que para extractos de RGU no se presenta este patrón.

por los tanto es difícil comparar los resultados reportados en este trabajo. Sin embargo, para especies de plantas no relacionadas con el género *Rubus* se ha evaluado la correlación

entre estas variables, tal es el caso de lo reportado por Todorovic et al. (2017) quienes correlacionan la concentración de polifenoles en extractos polares de once diferentes polvos de cocoa comercial con la actividad antibacteriana que muestran estos extractos, observando que estas variables no se correlacionan al evaluar la inhibición de bacterias Gram positivas, pero sí al evaluar bacterias Gram negativas, lo que sugiere que los compuestos que inhiben a estos dos grupos de bacterias pueden no ser los mismos y que no siempre habrá una correlación entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antibacteriana de los extractos, sin embargo no evalúan la correlación entre la variación en contenido de polifenoles por efecto del tiempo y la actividad de los extractos. Por otra parte Tabarki et al. (2017) al evaluar la concentración de polifenoles en cuatro materiales de *Rubus ulmifolius* colectados en cuatro zonas geográficas diferentes, observaron diferencias en el contenido de polifenoles totales y polifenoles particulares como ácido gálico, ácido clorogénico y kaempferol, mismos que se ha reportado presentan actividad antibacteriana, atribuyendo esta variación al efecto de las diferentes zonas de colecta sobre la síntesis de estos compuestos, efecto que también podría ocurrir al colectar las muestras durante diferentes periodos de colecta o al modificar la condición de crecimiento de los materiales evaluados, lo que podría explicar los diferentes grados de correlación observados para cada material de *Rubus* reportados en el presente trabajo.

Al evaluar relación entre las características físicas de foliolos durante los diferentes periodos de colecta, con la actividad antibacteriana (contra *Cmm*) de los extractos, los coeficiente de correlación “CC” y los valores de R^2 fueron distintos para cada material de *Rubus* (ver cuadros 6.9 y 6.10 en el apartado de anexos), lo que sugiere que no se puede realizar una predicción precisa de la actividad antibacteriana de los extractos, teniendo como base el tamaño y color de foliolos.

La bacteria *Pseudomonas* sp., no registró sensibilidad a 600 μg de extracto/disco (Figura 4.20), para descartar que la respuesta fuera debido a una baja concentración se aplicó un tratamiento con 2400 μg /disco, obteniendo el mismo resultado.

Respecto a *Pantoea stewartii* el tratamiento con 600 μg de extracto/disco modificó su patrón de crecimiento (Figura 4.21), esta respuesta se mantuvo al incrementar la concentración a 2400 μg /disco. En este contexto se ha reportado que extractos fenólicos obtenidos de ejemplares del género *Rubus*, llegan a modificar el crecimiento de bacterias al afectar los mecanismos de comunicación celular (Oliveira et al., 2016) mismos que regulan el crecimiento y procesos de infección en *Pantoea stewartii* (Koutsoudis et al., 2006). Por otra parte, se ha reportado que las bacterias Gram-negativas suelen presentar mayor resistencia a los polifenoles, en comparación con bacterias Gram-positivas, argumentando que algunos polifenoles presentan carga negativa favoreciendo su unión con la carga positiva de la bicapa lipídica de bacterias Gram-positivas (Koech et al., 2017), lo que conlleva a la degradación de la membrana provocando la muerte del microorganismo (Cox et al., 2001), en contraste la membrana de las bacterias Gram-negativas presenta polisacaridos cargados negativamente (Ikigai et al., 1993) lo que dificulta la interacción de los compuestos fenólicos con la bicapa lipídica de estas células.

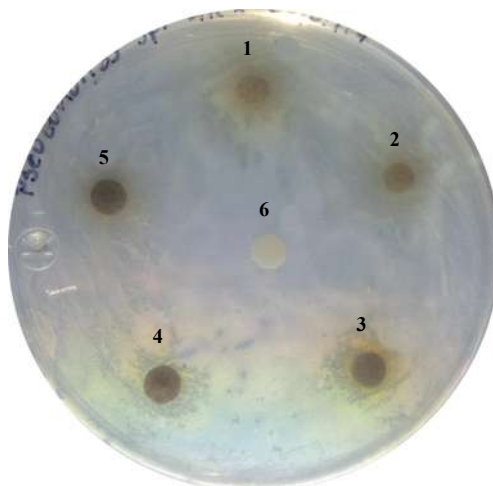


Figura 4.20: Efecto de extractos metanólicos de RAU (1), RGN (2), RGU (3), RGN (2) y ROU (2) de la colecta 2, así como del control negativo (6), sobre *Pseudomonas* sp. Nótese que ninguno de los extractos generó halos de inhibición, tendencia que se presentó para la totalidad de extractos.

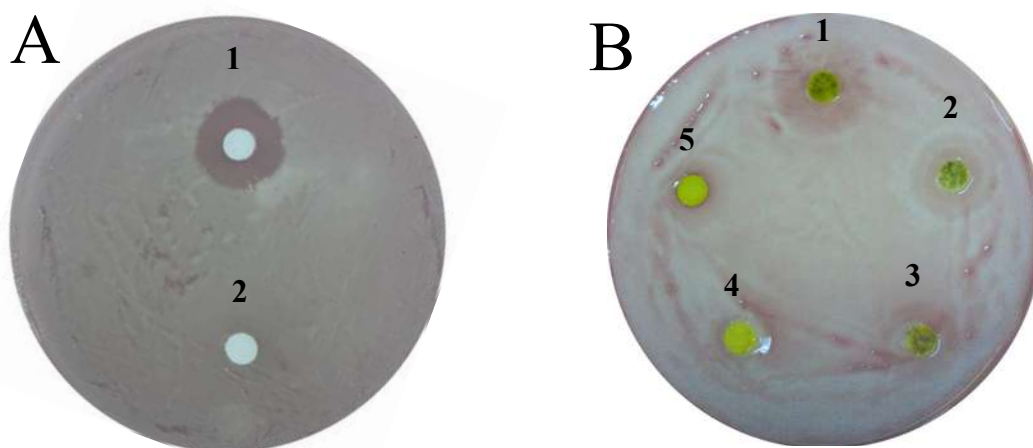


Figura 4.21: Efecto de control positivo (A1), negativo (A2) y extractos metanólicos (B) de RAU (1), RGN (2), RGU (3), ROU (4) y RPN (5) de la colecta 2, sobre el crecimiento de *Pantoea stewartii*. Apréciase una modificación en el patrón de crecimiento de la bacteria por efecto de extractos de *Rubus* spp., tendencia que se mantuvo para la totalidad de extractos y que no se observó en el control negativo (A2).

4.6. Sensibilidad bacteriana mediante dilución seriada

Para evaluar cuantitativamente el efecto de compuestos polares de *Rubus* sobre el crecimiento de *Cmm* y con base en los resultados obtenidos mediante difusión en disco, se

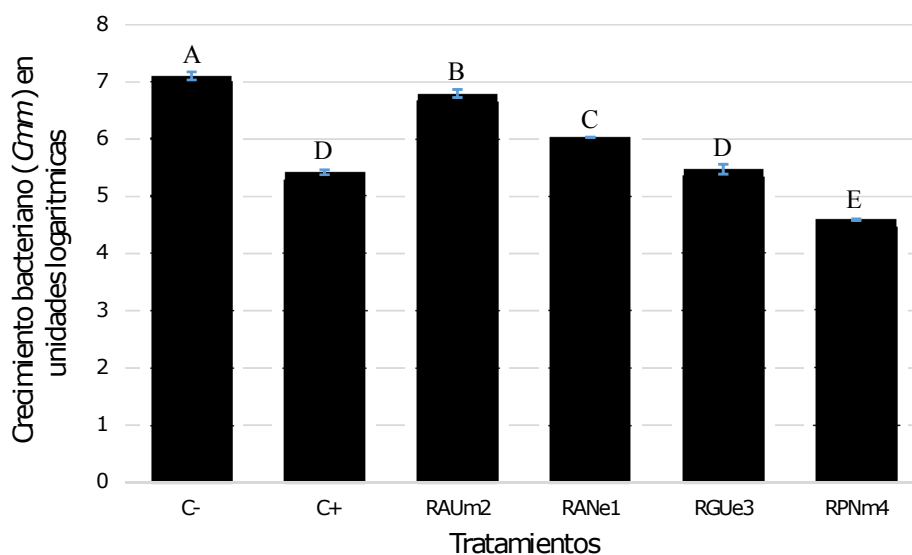


Figura 4.22: Efecto del control negativo (C-), control positivo (C+) y extractos (RAUm2, RANe1, RGUe3 y RPNm4), sobre el crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subsp., *michiganensis* (Cmm). Obsérvense diferencias significativas respecto al crecimiento bacteriano entre los extractos evaluados, así como un menor crecimiento de la bacteria por efecto de RPNm4 en comparación con la gentamicina (C+).

emplearon los extractos clasificados como parcialmente activos, con halos de inhibición de 9.6 ± 0.9 mm (metanólico de *Rubus adenotrichus* Uruapan, colecta 2; RAUm2), 11.4 ± 0.9 mm (etanólico de *Rubus adenotrichus* Nahuatzen, colecta 1; RANe1) y 12.8 ± 0.4 mm (etanólico de *Rubus glaucus* Uruapan colecta 3; RGUe3), todos significativamente diferentes, $p < 0.05$, así como el extracto con categoría de activo que mostró halos de inhibición de 14.3 ± 1.3 mm (metanólico de *Rubus pringley* Nahuatzen, colecta 4; RPNm4).

Aunque los halos de inhibición registrados para el control positivo fueron superiores, $p < 0.001$, a los generados por los extractos, los datos obtenidos por dilución seriada evidenciaron que al confrontar la bacteria con el extracto RPNm4 en medio líquido, se inhibió su crecimiento en un 99.7% mientras el extracto RGUe3 y la gentamicina inhibieron un 97.65% y un 97.94%, respectivamente (Figura 4.22).

Estos resultados sugieren que los compuestos antibacterianos presentes en extractos de *Rubus*, tienen reducida capacidad para difundirse en un medio sólido, en comparación con el antibiótico. Kotan et al. (2014) reportaron que extractos metanólicos de hojas y tallos de *Origanum onites*, no mostraron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Cmm*, sin embargo establecieron concentraciones mínimas bactericidas para extractos acetónico, clorofórmico y hexánico de 40 mg/mL, 60 mg/mL y 40 mg/mL respectivamente, que corresponden a 66, 100 y 66 veces más a la concentración reportada en este trabajo, lo que evidencia el fuerte efecto inhibitorio de extractos de algunos materiales *Rubus* frente a *Cmm*.

Capítulo 5

Conclusiones

Cada uno de los ejemplares de *Rubus* presenta diferente capacidad de producción de polifenoles y compuestos con actividad antibacteriana al encontrarse en estado silvestre y en invernadero, adicionalmente esta capacidad varía al coleccionar las muestras durante diferentes periodos, efecto que debe ser considerado al evaluar el potencial de plantas como fuentes de compuestos bioactivos. Por otra parte, las características físicas de los foliolos no presentan una relación lineal con el rendimiento de extracto, polifenoles o la actividad antibacteriana de los extractos y un incremento en la producción de polifenoles no es indicativo de un incremento en la actividad antibacteriana de los extractos. Finalmente el ensayo por dilución seriada evidenció que los compuestos antibacterianos presentan una limitada difusión en medio sólido, respecto al antibiótico.

Bibliografía

- Abascal, K., Ganora, L., and Yarnell, E. (2005). The effect of freeze-drying and its implications for botanical medicine: a review. *Phytotherapy Research*, 19(8):655–660.
- Abreu, A. C., McBain, A. J., and Simoes, M. (2012). Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Natural product reports*, 29(9):1007–1021.
- Adaramola, B. and Onigbinde, A. (2017). Influence of extraction technique on the mineral content and antioxidant capacity of edible oil extracted from ginger rhizome. *Chem. Int*, 3(1).
- Agouni, A., Mostefai, H. A., Lagrue, A.-H., Sladkova, M., Rouet, P., Desmoulin, F., Pechanova, O., Martínez, M. C., and Andriantsitohaina, R. (2017). Paradoxical effect of nonalcoholic red wine polyphenol extract, provinolsTM, in the regulation of cyclooxygenases in vessels from Zucker fatty rats (fa/fa). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*, volume 922. Elsevier academic press San Diego.
- Ahmad, N., Gupta, S., and Mukhtar, H. (2000). Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor κ b in cancer cells versus normal cells. *Archives of biochemistry and biophysics*, 376(2):338–346.
- Alice, L. A. and Campbell, C. S. (1999). Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *American Journal of Botany*, 86(1):81–97.
- Alonso-Salces, R., Korta, E., Barranco, A., Berrueta, L., Gallo, B., and Vicente, F. (2001). Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple. *Journal of chromatography A*, 933(1):37–43.
- Alves, T. M. d. A., Silva, A. F., Brandão, M., Grandi, T. S. M., Smânia, E. d. F. A., Smânia Júnior, A., and Zani, C. L. (2000). Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(3):367–373.
- Ananga, A., Georgiev, V., and Tsoleva, V. (2013). Manipulation and engineering of metabolic and biosynthetic pathway of plant polyphenols. *Current pharmaceutical design*, 19(34):6186–6206.

- Aniszewski, T. (1994). The biological basis of quinolizidine alkaloids. *The science of legumes: an annual international scientific journal (Finland)*.
- Azlim Almey, A., Ahmed Jalal Khan, C., Syed Zahir, I., Mustapha Suleiman, K., Aisyah, M., and Kamarul Rahim, K. (2010). Total phenolic content and primary antioxidant activity of methanolic and ethanolic extracts of aromatic plants' leaves. *International Food Research Journal*, 17(4).
- Azwanida, N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants*, 4(196):2167–0412.
- Basu, P., Dixon, D., Varghese, S., Varghese, G., Varghese, G., and Maier, C. (2015). Detection of estrogenic and anti-estrogenic activities of dietary plant extracts by *In Vitro* reporter assays. *The FASEB Journal*, 29(1 Supplement):924–21.
- Bello, G. (2006). Catálogo de plantas medicinales de la comunidad indígena nuevo san juan parangaricutiro, michoacán. méxico. *Campo Experimental Uruapan. CIRPAC. INIFAP. Michoacán, México. Libro Técnico*.
- Benrey, B., Callejas, A., Rios, L., Oyama, K., and Denno, R. F. (1998). The effects of domestication of *Brassica* and *Phaseolus* on the interaction between phytophagous insects and parasitoids. *Biological Control*, 11(2):130–140.
- Buchanan, B. B. (2015). *Biochemistry and molecular biology of plants*. John Wiley & Sons.
- Cai, Y., Hu, X., Huang, M., Sun, F., Yang, B., He, J., Wang, X., Xia, P., and Chen, J. (2012). Characterization of the antibacterial activity and the chemical components of the volatile oil of the leaves of *Rubus parvifolius* l. *Molecules*, 17(7):7758–7768.
- Calderón, G. and Rzedowski, J. (2001). Flora fanerogámica del valle de méxico. *Comisión Nacional para el Estudio de la Biodiversidad e Instituto de Ecología, AC. México*.
- Cardeñosa, V., Girones-Vilaplana, A., Muriel, J. L., Moreno, D. A., and Moreno-Rojas, J. M. (2016). Influence of genotype, cultivation system and irrigation regime on antioxidant capacity and selected phenolics of blueberries (*Vaccinium corymbosum* l.). *Food chemistry*, 202:276–283.
- Carlson, R. R. and Vidaver, A. K. (1982). Bacterial mosaic, a new corynebacterial disease of wheat. *Plant Disease*, 66(1):76–79.
- Carril, E. P.-U. and García, A. Á. (2009). Metabolismo secundario de plantas.
- Chakraborty, S. and Newton, A. C. (2011). Climate change, plant diseases and food security: an overview. *Plant Pathology*, 60(1):2–14.

- Chen, P. X., Zhang, H., Marcone, M. F., Pauls, K. P., Liu, R., Tang, Y., Zhang, B., Renaud, J. B., and Tsao, R. (2017). Anti-inflammatory effects of phenolic-rich cranberry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) extracts and enhanced cellular antioxidant enzyme activities in caco-2 cells. *Journal of Functional Foods*.
- Chew, K., Khoo, M., Ng, S., Thoo, Y., Wan Aida, W., and Ho, C. (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *International Food Research Journal*, 18(4).
- Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., and Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*tropaeolum tuberosum* ruíz & pavón) tubers. *Separation and Purification Technology*, 55(2):217–225.
- Copping, L. (2001). The biopesticide manual: A world compendium of naturally occurring biopesticides. *Bracknell: BCPC Publications*.
- Cox, S., Mann, C., and Markham, J. (2001). Interactions between components of the essential oil of *melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3):492–497.
- Cuevas-Rodríguez, E. O., Yousef, G. G., García-Saucedo, P. A., Lóopez-Medina, J., Paredes-López, O., and Lila, M. A. (2010). Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in wild and domesticated mexican blackberries (*Rubus* spp.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(12):7458–7464.
- Ćujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., and Ibrić, S. (2016). Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food chemistry*, 194:135–142.
- Cuyckens, F., Shahat, A. A., Van den Heuvel, H., Abdel-Shafeek, K. A., El-Messiry, M. M., Nasr, M. M. S.-E., Pieters, L., Vlietinck, A. J., and Claeys, M. (2003). The application of liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and collision-induced dissociation in the structural characterization of acylated flavonol o-glycosides from the seeds of *Carrichtera annua*. *European journal of mass spectrometry*, 9(4):409–420.
- Da Porto, C. and Natolino, A. (2017). Supercritical fluid extraction of polyphenols from grape seed (*Vitis vinifera*): Study on process variables and kinetics. *The Journal of Supercritical Fluids*.
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 23(2):174–181.
- Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H., and Madani, K. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food chemistry*, 166:585–595.

- Davidson, P. and Naidu, A. (2000). Phyto-phenols. *Natural food antimicrobial systems*, 226:284–287.
- Davis, M. J., Gillaspie Jr, A. G., Vidaver, A. K., and Harris, R. W. (1984). Clavibacter: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including clavibacter xyli subsp. xyli sp. nov., subsp. nov. and clavibacter xyli subsp. cynodontis subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 34(2):107–117.
- de Souza, V. R., Pereira, P. A. P., da Silva, T. L. T., de Oliveira Lima, L. C., Pio, R., and Queiroz, F. (2014). Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*, 156:362–368.
- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons.
- Dubey, N., Kumar, A., Singh, P., and Shukla, R. (2010). Exploitation of natural compounds in eco-friendly management of plant pests. In *Recent developments in management of plant diseases*, pages 181–198. Springer.
- Eichenlaub, R., Gartemann, K.-H., and Burger, A. (2007). Clavibacter michiganensis, a group of gram-positive phytopathogenic bacteria. In *Plant-Associated Bacteria*, pages 385–421. Springer.
- El-Khateeb, A. Y., Elsherbiny, E., Tadros, L., Ali, S., Hamed, H., et al. (2013). Phytochemical analysis and antifungal activity of fruit leaves extracts on the mycelial growth of fungal plant pathogens. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 4:1–6.
- El-Wakeil, N. E. (2013). Botanical pesticides and their mode of action. *Gesunde Pflanzen*, 65(4).
- Flügel, M., Becker, A., Gartemann, K.-H., and Eichenlaub, R. (2012). Analysis of the interaction of clavibacter michiganensis subsp. michiganensis with its host plant tomato by genome-wide expression profiling. *Journal of biotechnology*, 160(1):42–54.
- Focke, W. O. (1914). *Species ruborum: Monographiae generis Rubi Prodromus*. Schweizerbart.
- Fraser, C. M. and Chapple, C. (2011). The phenylpropanoid pathway in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book*, page e0152.
- Galili, S. and Hovav, R. (2014). Determination of polyphenols, flavonoids, and antioxidant capacity in dry seeds. In *Polyphenols in Plants*, pages 305–323. Elsevier.

- García-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., and Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, 15(12):8813–8826.
- Gartemann, K.-H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R., and Burger, A. (2003). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*, 106(2):179–191.
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P., and Amiot, M. J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin c in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5):1370–1373.
- Gols, R., Van Dam, N. M., Raaijmakers, C. E., Dicke, M., and Harvey, J. A. (2009). Are population differences in plant quality reflected in the preference and performance of two endoparasitoid wasps? *Oikos*, 118(5):733–742.
- Gómez-Caravaca, A. M., Verardo, V., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., and Caboni, M. F. (2014). Phenolic compounds and saponins in plants grown under different irrigation regimes. In *Polyphenols in Plants*, pages 37–52. Elsevier.
- González, M. Á. B. and Garciglia, R. S. (2013). Plantas medicinales de la comunidad indígena nuevo san juan parangaricutiro, michoacán, México. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 9(1):126–138.
- Gu, X. and Tian, S. (2005). Pesticides and cancer. *World Sci-tech R & D*, 27(2):47–52.
- Gündüz, K. and Özdemir, E. (2014). The effects of genotype and growing conditions on antioxidant capacity, phenolic compounds, organic acid and individual sugars of strawberry. *Food chemistry*, 155:298–303.
- Gurjar, M. S., Ali, S., Akhtar, M., and Singh, K. S. (2012). Efficacy of plant extracts in plant disease management. *Agricultural Sciences*, 3(3):425.
- Gyawali, R., Hayek, S., and Ibrahim, S. (2015). Plant extracts as antimicrobials in food products: mechanisms of action, extraction methods, and applications. In *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*, pages 31–47. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.
- Hamill, F. A., Apio, S., Mubiru, N. K., Mosango, M., Bukenya-Ziraba, R., Maganyi, O. W., and Soejarto, D. D. (2003). Traditional herbal drugs of southern Uganda. part iii: isolation and methods for physical characterization of bioactive alkanols from *Rubus apetalus*. *Journal of ethnopharmacology*, 87(1):15–19.
- Handa, S., Khanuja, S., Longo, G., and Rakesh, D. (2008). Extraction technologies for medicinal and aromatic plants, no. 66. *Italy: United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology. Trieste.*

- Hans-Walter, H., Birgit, P., and Heldt, F. (2011). *Plant biochemistry*. Academic Press.
- Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of natural products*, 59(2):205–215.
- Hättenschwiler, S. and Vitousek, P. M. (2000). The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends in ecology & evolution*, 15(6):238–243.
- Hermes, D. A. and Mattson, W. J. (1992). The dilemma of plants: to grow or defend. *The quarterly review of biology*, 67(3):283–335.
- Hooker, W. J. (1981). *Compendium of potato diseases*, volume 8. International Potato Center.
- Hu, F., Wei, F., Wang, Y., Wu, B., Fang, Y., and Xiong, B. (2015). Egcg synergizes the therapeutic effect of cisplatin and oxaliplatin through autophagic pathway in human colorectal cancer cells. *Journal of pharmacological sciences*, 128(1):27–34.
- Hudson, S. A., Ecroyd, H., Dehle, F. C., Musgrave, I. F., and Carver, J. A. (2009). (-)-epigallocatechin-3-gallate (egcg) maintains κ -casein in its pre-fibrillar state without redirecting its aggregation pathway. *Journal of molecular biology*, 392(3):689–700.
- Ifeanacho, M. O., Ikewuchi, C. C., and Ikewuchi, J. C. (2017). Investigation of the profile of phenolic compounds in the leaves and stems of *Pandiaka heudelotii* using gas chromatography coupled with flame ionization detector. *Food science & nutrition*, 5(3):646–652.
- Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y., and Shimamura, T. (1993). Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1147(1):132–136.
- Jakubke, H.-D. and Jeschkeit, H. (1994). Concise encyclopedia chemistry. *Trans. Rev. Mary Eagleson.-Berlin, New York, Walter de Gruyter*.
- Jiménez-Arellanes, A., Cornejo-Garrido, J., Rojas-Bribiesca, G., Nicasio-Torres, M. d. P., Said-Fernández, S., Mata-Cárdenas, B. D., Molina-Salinas, G. M., Tortoriello, J., and Meckes-Fischer, M. (2012). Microbiological and pharmacological evaluation of the micropropagated *Rubus liebmannii* medicinal plant. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- Jones, C. G. and Hartley, S. E. (1999). A protein competition model of phenolic allocation. *Oikos*, pages 27–44.
- Kasselaki, A.-M., Goumas, D., Tamm, L., Fuchs, J., Cooper, J., and Leifert, C. (2011). Effect of alternative strategies for the disinfection of tomato seed infected with bacterial canker (*clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences*, 58(3):145–147.

- Khallouki, F., Breuer, A., Merieme, E., Ulrich, C. M., and Owen, R. W. (2017). Characterization and quantitation of the polyphenolic compounds detected in methanol extracts of *Pistacia atlantica* desf. fruits from the guelmim region of morocco. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 134:310–318.
- Koech, K., Wachira, F. N., Ngure, R., Wanyoko, J., Bii, C., Karori, S., and Kerio, L. (2017). Antimicrobial, synergistic and antioxidant activities of tea polyphenols.
- Kontogianni, V. G. (2014). Novel techniques towards the identification of different classes of polyphenols. In *Polyphenols in Plants*, pages 159–185. Elsevier.
- Kossah, R., Nsabimana, C., Zhang, H., Chen, W., et al. (2010). Optimization of extraction of polyphenols from syrian sumac (*Rhus coriaria* l.) and chinese sumac (*Rhus typhina* l.) fruits. *Research Journal of Phytochemistry*, 4(3):146–153.
- Kotan, R., Cakir, A., Ozer, H., Kordali, S., Cakmakci, R., Dadasoglu, F., Dikbas, N., Aydin, T., and Kazaz, C. (2014). Antibacterial effects of origanum onites against phytopathogenic bacteria: Possible use of the extracts from protection of disease caused by some phytopathogenic bacteria. *Scientia Horticulturae*, 172:210–220.
- Koutsoudis, M. D., Tsaltsas, D., Minogue, T. D., and von Bodman, S. B. (2006). Quorum-sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(15):5983–5988.
- Lindig-Cisneros, R., Benrey, B., and Espinosa-García, F. J. (1997). Phytoalexins, resistance traits, and domestication status in *Phaseolus coccineus* and *Phaseolus lunatus*. *Journal of Chemical Ecology*, 23(8).
- Lindig-Cisneros, R., Dirzo, R., and Espinosa-García, F. J. (2002). Effects of domestication and agronomic selection on phytoalexin antifungal defense in *Phaseolus* beans. *Ecological Research*, 17(3):315–321.
- Maeda, H. and Dudareva, N. (2012). The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual review of plant biology*, 63:73–105.
- Mandel, S. A., Amit, T., Weinreb, O., Reznichenko, L., and Youdim, M. B. (2008). Simultaneous manipulation of multiple brain targets by green tea catechins: a potential neuroprotective strategy for alzheimer and parkinson diseases. *CNS neuroscience & therapeutics*, 14(4):352–365.
- Martinelli, F., Scalenghe, R., Davino, S., Panno, S., Scuderi, G., Ruisi, P., Villa, P., Stropiana, D., Boschetti, M., Goulart, L. R., et al. (2015). Advanced methods of plant disease detection. a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(1):1–25.

- Martínez, J. (2012). Natural fungicides obtained from plants, fungicides for plant and animal diseases. *Fungicides for Plant Animal Diseases, InTech*. <http://www.intechopen.com/books>.
- Martini, S., D Addario, C., Colacevich, A., Focardi, S., Borghini, F., Santucci, A., Figura, N., and Rossi, C. (2009). Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. *International journal of antimicrobial agents*, 34(1):50–59.
- McCULLOCH, L. et al. (1925). *Aplanobacter insidiosum* n. sp., the cause of an alfalfa disease. *Phytopathology*, 15(8).
- McCutcheon, A., Ellis, S., Hancock, R., and Towers, G. (1994). Antifungal screening of medicinal plants of british columbian native peoples. *Journal of Ethnopharmacology*, 44(3):157–169.
- Mikulic-Petkovsek, M., Koron, D., Zorenc, Z., and Veberic, R. (2017). Do optimally ripe blackberries contain the highest levels of metabolites? *Food chemistry*, 215:41–49.
- Milosević, T., Milosević, N., Glisić, I., Mladenović, J., et al. (2012). Fruit quality attributes of blackberry grown under limited environmental conditions. *Plant, Soil and Environment*, 58(7):322–327.
- Morden, C. W., Gardner, D. E., and Weniger, D. A. (2003). Phylogeny and biogeography of pacific rubus subgenus idaeobatus (rosaceae) species: Investigating the origin of the endemic hawaiian raspberry r. macraei. *Pacific Science*, 57(2):181–197.
- Naczka, M. and Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1):95–111.
- Oliveira, B. D., Rodrigues, A. C., Cardoso, B. M. I., Ramos, A. L. C. C., Bertoldi, M. C., Taylor, J. G., da Cunha, L. R., and Pinto, U. M. (2016). Antioxidant, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of *Rubus rosaefolius* phenolic extract. *Industrial Crops and Products*, 84:59–66.
- Oszmiański, J., Wojdyło, A., Nowicka, P., Teleszko, M., Cebulak, T., and Wolanin, M. (2015). Determination of phenolic compounds and antioxidant activity in leaves from wild *Rubus* l. species. *Molecules*, 20(3):4951–4966.
- Ouerghemmi, I., Rebey, I. B., Rahali, F. Z., Bourgou, S., Pistelli, L., Ksouri, R., Marzouk, B., and Tounsi, M. S. (2017). Antioxidant and antimicrobial phenolic compounds from extracts of cultivated and wild-grown tunisian *Ruta chalepensis*. *Journal of food and drug analysis*, 25(2):350–359.
- Palaniappan, K. and Holley, R. A. (2010). Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International journal of food microbiology*, 140(2):164–168.

- Pang, J.-y., Zhao, K.-j., Wang, J.-b., Ma, Z.-j., and Xiao, X.-h. (2014). Green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, possesses the antiviral activity necessary to fight against the hepatitis b virus replication in vitro. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 15(6):533–539.
- Panizzi, L., Caponi, C., Catalano, S., Cioni, P., and Morelli, I. (2002). *In vitro* antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *Journal of ethnopharmacology*, 79(2):165–168.
- Pelletier, S. W. (1983). The nature and definition of an alkaloid. *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, John Wiley & Sons, New York, USA.
- Philogène, B., Regnault-Roger, C., and Vincent, C. (2005). Botanicals: yesterday and today promises. *Biopesticides of plant origin*, pages 1–15.
- Pimentel, D. (2009). Pesticides and pest control. In *Integrated pest management: innovation-development process*, pages 83–87. Springer.
- Qin, X. and Kong, F. (2006). Prospect and situation of biopesticides. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 34(16):4024–4057.
- Quave, C. L., Estévez-Carmona, M., Compadre, C. M., Hobby, G., Hendrickson, H., Beenken, K. E., and Smeltzer, M. S. (2012). Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics. *PloS one*, 7(1):e28737.
- Ramawat, K. G., Dass, S., and Mathur, M. (2009). *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine*. Springer.
- Reichling, J. (2010). Plant-microbe interactions and secondary metabolites with antibacterial, antifungal and antiviral properties. *Annual Plant Reviews Volume 39: Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites, Second edition*, pages 214–347.
- Riaz, M., Ahmad, M., and Rahman, N. (2011). Antimicrobial screening offruit, leaves, root and stem of *Rubus fruticosus*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(24):5920–5924.
- Richter, E. (2002). Acute human pesticide poisonings. *Encyclopedia of pest management*, pages 3–6.
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(10):2866–2887.
- Roper, M. C. (2011). *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*: lessons learned from a xylem-dwelling pathogen of sweet corn. *Molecular plant pathology*, 12(7):628–637.
- Russo, G. L., Vastolo, V., Ciccarelli, M., Albano, L., Macchia, P. E., and Ungaro, P. (2017). Dietary polyphenols and chromatin remodeling. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(12):2589–2599.

- Rzedowski, J., Calderón de Rzedowski, G., et al. (2005). *Familia rosaceae*. Number QK 211. F56 2005 no. 135.
- Sales, M. D. C., Costa, H. B., Fernandes, P. M. B., Ventura, J. A., and Meira, D. D. (2016). Antifungal activity of plant extracts with potential to control plant pathogens in pineapple. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(1):26–31.
- Sánchez, E., García, S., and Heredia, N. (2010). Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. *Applied and environmental microbiology*, 76(20):6888–6894.
- Scarpa, E.-S. and Ninfali, P. (2015). Phytochemicals as innovative therapeutic tools against cancer stem cells. *International journal of molecular sciences*, 16(7):15727–15742.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., Chun, W., et al. (2001). *Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria*. Number Ed. 3. American Phytopathological Society (APS Press).
- Schuster, M. L. (1975). Leaf freckles and wilt of corn incited by corynebacterium nebraskense schuster, hoff, mandel, lazar, 1972.
- Segura Ledesma, S., Zavala Robles, D., Equihua Cervantes, C., Andrés Agustín, J., and Yopez Torres, E. (2009). Los recursos genéticos de frutales en michoacán. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 15(3):297–305.
- Singh, B., Singh, N., Thakur, S., and Kaur, A. (2017). Ultrasound assisted extraction of polyphenols and their distribution in whole mung bean, hull and cotyledon. *Journal of food science and technology*, 54(4):921–932.
- Singh, B. N., Shankar, S., and Srivastava, R. K. (2011). Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (egcg): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochemical pharmacology*, 82(12):1807–1821.
- Singleton, V., Orthofer, R., and Lamuela-Raventós, R. (1999). Analysis of total phenols and others oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent (pp. 152-178). *London.[Links]*.
- Siracusa, L. and Ruberto, G. (2014). Plant polyphenol profiles as a tool for traceability and valuable support to biodiversity. In *Polyphenols in plants*, pages 15–33. Elsevier.
- Sisti, M., De Santi, M., Fraternali, D., Ninfali, P., Scoccianti, V., and Brandi, G. (2008). Antifungal activity of *Rubus ulmifolius* schott standardized *in vitro* culture. *LWT-Food Science and Technology*, 41(5):946–950.
- Spigno, G., Tramelli, L., and De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of food engineering*, 81(1):200–208.

- Sporleder, M. and Lacey, L. A. (2013). Biopesticides. In *Insect Pests of Potato*, pages 463–497. Elsevier.
- Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*, 30(18):3268–3295.
- Stojković, D., Petrović, J., Soković, M., Glamočlija, J., Kukić-Marković, J., and Petrović, S. (2013). *In situ* antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(13):3205–3208.
- Sulaiman, S. F., Sajak, A. A. B., Ooi, K. L., Seow, E. M., et al. (2011). Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(4):506–515.
- Tabarki, S., Aouadhi, C., Mechergui, K., Hammi, K. M., Ksouri, R., Raies, A., and Toumi, L. (2017). Comparison of phytochemical composition and biological activities of *Rubus ulmifolius* extracts originating from four regions of tunisia. *Chemistry & biodiversity*, 14(1).
- Tachibana, H. (2011). Green tea polyphenol sensing. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 87(3):66–80.
- Thacker, J. R. (2002). *An introduction to arthropod pest control*. Cambridge University Press.
- Thanina, A. C., Mourad, B., and Karim, A. (2015). Antibacterial activity of two extracts from *Rubus fruticosus* l. against resistant pathogens and their antioxidant potential. *African Journal of Microbiology Research*, 9(18):1255–1262.
- Thompson, M. M. (1997). Survey of chromosome numbers in rubus (rosaceae: Rosoideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, pages 128–164.
- Todorovic, V., Milenkovic, M., Vidovic, B., Todorovic, Z., and Sobajic, S. (2017). Correlation between antimicrobial, antioxidant activity, and polyphenols of alkalized/nonalkalized cocoa powders. *Journal of Food Science*, 82(4):1020–1027.
- Uchida, K., Tomita, H., Takemori, T., and Takamura, H. (2017). Effects of grilling on total polyphenol content and antioxidant capacity of eggplant (*Solanum melongena* l.). *Journal of food science*, 82(1):202–207.
- Venancio, V. P., Cipriano, P. A., Kim, H., Antunes, L. M., Talcott, S. T., and Mertens-Talcott, S. U. (2017). *Cocoplum* (*Chrysobalanus icaco* l.) anthocyanins exert anti-inflammatory activity in human colon cancer and non-malignant colon cells. *Food & function*, 8(1):307–314.
- Verpoorte, R. and Alfermann, A. W. (2013). *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. Springer Science & Business Media.

- Viñas, P. and Campillo, N. (2014). Gas chromatography–mass spectrometry analysis of polyphenols in foods. In *Polyphenols in Plants*, pages 103–157. Elsevier.
- Vitale, D. C., Piazza, C., Melilli, B., Drago, F., and Salomone, S. (2013). Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 38(1):15–25.
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant*, 3(1):2–20.
- Wang, Y., Chen, Q., Chen, T., Tang, H., Liu, L., and Wang, X. (2016). Phylogenetic insights into chinese rubus (rosaceae) from multiple chloroplast and nuclear dnas. *Frontiers in plant science*, 7.
- Ware, G. (1983). Pesticides, theory and application.
- Winterstein, E. H. and Trier, G. (1910). *Die alkaloid: eine monographie der natürlichen basen*. G. Borntraeger.
- Xu, Y. (2008). The application of biological pesticides and industrial development measures. *Chin. Agr. Sci. Bull*, 24(8):402–404.
- Yang, Z.-F., Bai, L.-P., Huang, W.-b., Li, X.-Z., Zhao, S.-S., Zhong, N.-S., and Jiang, Z.-H. (2014). Comparison of in vitro antiviral activity of tea polyphenols against influenza a and b viruses and structure–activity relationship analysis. *Fitoterapia*, 93:47–53.
- Yang J, L. (2001). Green chemistry and technology. *Beijing University of Posts and Telecommunications*, pages 176–180.
- Yonekura-Sakakibara, K. and Saito, K. (2009). Functional genomics for plant natural product biosynthesis. *Natural product reports*, 26(11):1466–1487.
- Zeidan, R., Oran, S., Khleifat, K., and Matar, S. (2013). Antimicrobial activity of leaf and fruit extracts of jordanian *Rubus sanguineus* friv.(rosaceae). *African Journal of Microbiology Research*, 7(44):5114–5118.
- ZHANG, H. and Ma, Y. (2017). Optimisation of high hydrostatic pressure assisted extraction of anthocyanins from rabbiteye blueberry pomace. *Czech Journal of Food Science*, 35(2).
- Zhang, H. and Zhang, H. (1998). New direction of pesticide development: biopesticides. *Journal of Modern Agriculture*, 4(9).
- Zhang, W., Jiang, F., and Ou, J. (2011). Global pesticide consumption and pollution: with china as a focus. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 1(2):125.
- Zhang, W. and Pang, Y. (2009). Impact of ipm and transgenics in the chinese agriculture. In *Integrated pest management: dissemination and impact*, pages 525–553. Springer.

- Zia-Ul-Haq, M., Riaz, M., De Feo, V., Jaafar, H. Z., and Moga, M. (2014). *Rubus fruticosus* L.: constituents, biological activities and health related uses. *Molecules*, 19(8):10998–11029.
- Zieliński, J., Kosiński, P., and Tomaszewski, D. (2004). The genus *rubus* (rosaceae) in southeastern lower silesia (poland). *Polish Botanical Journal*, 49(2):161–180.
- Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F., and Van't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and environmental microbiology*, 56(6):1875–1881.

Capítulo 6

Anexos

Cuadro 6.1: Diferencias en halos de inhibición (mm) contra *Clavibacter michiganensis* subsp., *michiganensis*, entre extractos metanólicos y etanólicos, códigos de significancia: ”***” ($p < 0.001$), ”**” ($p < 0.01$) y ”*” ($p < 0.05$). S/D= sin datos y S/I= sin inhibición.

Genotipo	Colecta	Tipo de extracto		Significancia
		Metanólico	Etanólico	
ROU	1	7.6±0.7	8.8±0.4	
	2	12.5±1.2	11.7±0.8	
	3	12.1±0.2	9.1±0.4	***
	4	10.9±0.5	10.1±0.4	
	5	12.6±1.2	11.1±0.4	*
RAU	1	S/I	7.6±0.4	***
	2	9.6±0.9	11.1±0.5	**
	3	11.6±0.9	9.2±0.5	***
	4	10.3±0.7	10.2±0.3	
	5	11.1±0.8	10.5±0.3	
RGU	1	10.2±1.4	10.4±0.4	
	2	12.1±1.2	10.2±0.4	*
	3	14±1.7	12.8±0.4	
	4	10.5±0.3	9.5±0.9	
	5	12.5±0.4	12.7±0.8	
RGN	1	9.1±0.3	12.1±0.6	***
	2	7.9±0.8	7.4±0.5	
	3	9.1±0.1	8.7±0.7	
	4	10.8±1.2	9.6±0.7	
	5	11.1±0.4	11.4±0.2	
RGN2	1	10.4±0.8	10.1±0.7	
	2	10.4±0.9	10.2±0.4	
	3	11.6±0.3	12.4±0.5	
	4	9.5±0.5	8.9±0.6	
	5	10.8±0.7	10.7±1.5	
RAN	1	11.1±1	11.4±0.8	
	2	8.1±0.8	8.1±0.8	
	3	10.9±0.2	8.6±0.6	***
	4	9±0.2	8.6±0.5	
	5	10.1±0.5	9.9±0.3	
RPN	1	10.3±0.4	13.2±0.3	***
	2	10.9±0.8	9.3±0.5	**
	3	11.2±0.6	9±0.5	***
	4	14.3±1.3	11.1±0.4	***
	5	12.3±1	13±0.5	
RGH	1	7.7±0.4	12.5±0.1	***
	2	7.7±0.8	S/I	***
	3	9±0.3	8.5±0.3	
	4	S/D	S/D	
	5	10.7±0.7	S/D	

Cuadro 6.2: Comparación de medias para rendimiento de extracto, rendimiento de polifenoles y actividad antibacteriana. Se analizaron por separado los datos obtenidos para metanol y etanol, los análisis se realizaron para cada genotipo de *Rubus* durante los diferentes periodos de colecta. Literales diferentes (^{a,b,c,d,...}) denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) para cada genotipo durante los diferentes periodo de colecta. S/D = sin datos y S/I = sin inhibición.

Genotipo	Colecta	Extracto mg/g		Polifenoles mgEAG/g		Inhibición mm	
		Metanol	Etanol	Metanol	Etanol	Metanol	Etanol
ROU	1	166.7±4 ^b	135.3±12.4 ^{a,b}	17.4±1.3 ^c	14.6±0.7 ^e	7.6±0.7 ^c	8.8±0.4 ^c
	2	194.7±1.5 ^a	71.7±1.2 ^c	50.3±3.1 ^a	22.6±0.7 ^d	12.5±1.2 ^a	11.7±0.8 ^a
	3	162±2 ^b	137±5.3 ^{a,b}	35.4±1.7 ^b	30.7±0.9 ^b	12.1±0.2 ^{a,b}	9.1±0.4 ^c
	4	191±10.1 ^a	153±3 ^a	38.1±1.6 ^b	26.3±0.9 ^c	10.9±0.5 ^b	10.1±0.4 ^b
	5	200.7±7.6 ^a	132.3±8 ^b	48.9±2.2 ^a	38.2±0.9 ^a	12.6±1.2 ^a	11.1±0.4 ^a
RAU	1	183±12.1 ^b	120.3±2.5 ^d	10.1±1.3 ^d	8.8±0.4 ^d	S/I	7.6±0.4 ^d
	2	159.7±7.2 ^c	74.3±0.6 ^e	28.5±1.1 ^b	24.7±0.7 ^b	9.6±0.9 ^c	11.1±0.5 ^a
	3	212.7±4.6 ^a	148.3±6.5 ^b	30±0.2 ^b	19.5±0.8 ^c	11.6±0.9 ^a	9.2±0.5 ^c
	4	188±3.1 ^b	160.7±2.9 ^a	20.3±2.2 ^c	17.8±0.8 ^c	10.3±0.7 ^{b,c}	10.2±0.3 ^b
	5	193±2.3 ^b	136.7±6 ^c	35.4±2 ^a	26.5±0.3 ^a	11.1±0.8 ^{a,b}	10.5±0.3 ^{a,b}
RGU	1	157.7±0.6 ^d	138.3±4.2 ^{b,c}	22.3±1.2 ^c	21.4±0.3 ^d	10.2±1.4 ^c	10.4±0.4 ^b
	2	200.7±3.1 ^b	90.7±2.9 ^d	42.1±3.1 ^b	33±0.3 ^b	12.1±1.2 ^c	10.2±0.4 ^b
	3	184±4.4 ^c	166.7±2.9 ^a	49.3±1.9 ^a	46.3±1.7 ^a	14±1.7 ^{b,c}	12.8±0.4 ^a
	4	183±1 ^c	147.3±4 ^b	48.3±1.4 ^a	27.2±0.9 ^c	10.5±0.3 ^a	9.5±0.9 ^b
	5	213.3±1.2 ^a	132.3±6.5 ^c	41.3±0.9 ^b	29.2±1.5 ^c	12.5±0.4 ^b	12.7±0.8 ^a
RGN	1	160.3±8.1 ^b	118.7±1.5 ^c	22.9±1.1 ^{b,c}	22±0.3 ^b	9.1±0.3 ^b	12.1±0.6 ^a
	2	193±23.1 ^a	38±1 ^e	21.1±0.1 ^c	4.6±0.1 ^e	7.9±0.8 ^c	7.4±0.5 ^c
	3	183±2.6 ^{a,b}	148.7±5.7 ^a	23.3±0.4 ^b	16.2±0.6 ^c	9.1±0.1 ^b	8.7±0.7 ^b
	4	179.3±2.1 ^{a,b}	95.3±1.5 ^d	21.8±0.8 ^{b,c}	11.3±0.5 ^d	10.8±1.2 ^a	9.6±0.7 ^b
	5	167.3±5.5 ^{a,b}	128.7±3.1 ^b	35.3±0.6 ^a	25.9±0.8 ^a	11.1±0.4 ^a	11.4±0.2 ^a
RGN2	1	187.3±2.9 ^a	134±2.6 ^b	32.1±1.7 ^d	31.1±0.5 ^b	10.4±0.8 ^{a,c}	10.1±0.7 ^{b,c}
	2	182.3±1.5 ^{a,b}	38±5.6 ^c	36.2±1.9 ^c	7.6±0.3 ^e	10.4±0.9 ^{b,c}	10.2±0.4 ^{b,c}
	3	175.7±6.4 ^{a,b}	154.3±2.5 ^a	46.5±1.9 ^a	38.3±0.5 ^a	11.6±0.3 ^a	12.4±0.5 ^a
	4	167.3±4.7 ^b	148±4.6 ^a	27.6±1.1 ^e	19.6±0.7 ^d	9.5±0.5 ^c	8.9±0.6 ^c
	5	184.3±9.8 ^a	133.7±2.5 ^b	41.7±0.6 ^b	29.2±0.9 ^c	10.8±0.7 ^{a,b}	10.7±1.5 ^b
RAN	1	214.3±4.2 ^a	158.3±3.2 ^b	30.6±1.7 ^b	22.8±0.2 ^a	11.1±1 ^a	11.4±0.8 ^a
	2	205.5±5 ^{a,b}	51.7±2.1 ^d	29.4±1.1 ^b	7±0.6 ^b	8.1±0.8 ^c	8.1±0.8 ^c
	3	202.3± 2.5 ^b	147.3±3.1 ^c	36.1±1.2 ^a	20.9±0.4 ^a	10.9±0.2 ^a	8.6±0.6 ^c
	4	205.3±5.7 ^{a,b}	174.3±4.9 ^a	29.1±0.5 ^b	22.3±3.3 ^a	9±0.2 ^{b,c}	8.6±0.5 ^c
	5	175±3 ^c	159±1 ^b	27.8±1.2 ^b	22.8±0.3 ^a	10.1±0.5 ^{a,b}	9.9±0.3 ^b
RPN	1	172.3±4.2 ^b	148.7±5.5 ^b	26.5±0.8 ^c	27.4±0.8 ^b	10.3±0.4 ^c	13.2±0.3 ^a
	2	154.3±9.1 ^c	41.3±1.5 ^d	28.4±1.9 ^c	7±0.6 ^e	10.9±0.8 ^c	9.3±0.5 ^c
	3	125.7±1.2 ^d	116.7±3.5 ^c	18.7±0.3 ^d	15.7±0.9 ^d	11.2±0.6 ^{b,c}	9±0.5 ^c
	4	220.7±7.4 ^a	146±2.6 ^b	45.9±1 ^b	24.4±0.6 ^c	14.3±1.3 ^a	11.1±0.4 ^b
	5	176±5.3 ^b	160.7±3.5 ^a	53.6±3.6 ^a	45.2±1.4 ^a	12.3±1 ^b	13±0.5 ^a
RGH	1	139±1.7 ^b	117.7±1.2 ^b	19.7±0.6 ^b	17.6±0.6 ^b	7.7±0.4 ^c	12.5±0.1 ^a
	2	155.7±2.3 ^a	32±1 ^c	20.6±0.9 ^b	1.9±0.7 ^c	7.7±0.8 ^c	S/I
	3	137.7±3.1 ^b	135.3±2.5 ^a	25.2±1.9 ^a	23.3±1 ^a	9±0.3 ^b	8.5±0.3 ^b
	4	131.3±2.5 ^b	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
	5	122.3±5.5 ^c	S/D	25.5±0.7 ^a	S/D	10.7±0.7 ^a	S/D

Cuadro 6.3: Comparación de medias para rendimiento de extracto, rendimiento de polifenoles y actividad antibacteriana. Se analizaron por separado los datos obtenidos para metanol y etanol, los análisis se realizaron para todos los genotipos de *Rubus* durante cada periodo de colecta. Literales diferentes (*a,b,c,d,...*) denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre genotipos para cada periodo de colecta. S/D = sin datos y S/I = sin inhibición.

Colecta	Genotipo	Extracto mg/g		Polifenoles mgEAG/g		Inhibición mm	
		Metanol	Etanol	Metanol	Etanol	Metanol	Etanol
1	ROU	166.7±4 ^{c,d}	135.3±12.4 ^{b,c}	17.4±1.3 ^d	14.6±0.7 ^e	7.6±0.7 ^c	8.8±0.4 ^e
	RAU	183±12.1 ^{b,c}	120.3±2.5 ^{c,d}	10.1±1.3 ^e	8.8±0.4 ^f	S/I	7.6±0.4 ^f
	RGU	157.7±0.6 ^d	138.3±4.2 ^b	22.3±1.2 ^c	21.4±0.3 ^c	10.2±1.4 ^{a,b}	10.4±0.4 ^d
	RGN	160.3±8.1 ^d	118.7±1.5 ^d	22.9±1.1 ^c	22±0.3 ^c	9.1±0.3 ^b	12.1±0.6 ^{b,c}
	RGN2	187.3±2.9 ^b	134±2.6 ^{b,c}	32.1±1.7 ^a	31.1±0.5 ^a	10.4±0.8 ^{a,b}	10.1±0.7 ^d
	RAN	214.3±4.2 ^a	158.3±3.2 ^a	30.6±1.7 ^a	22.8±0.2 ^c	11.1±1 ^a	11.4±0.8 ^c
	RPN	172.3±4.2 ^{b,d}	148.7±5.5 ^{a,b}	26.5±0.8 ^b	27.4±0.8 ^b	10.3±0.4 ^{a,b}	13.2±0.3 ^a
	RGH	139±1.7 ^e	117.7±1.2 ^d	19.7±0.6 ^{c,d}	17.6±0.6 ^d	7.7±0.4 ^c	12.5±0.1 ^{a,b}
2	ROU	194.7±1.5 ^a	71.7±1.2 ^b	50.3±3.1 ^a	22.6±0.7 ^c	12.5±1.2 ^a	11.7±0.8 ^a
	RAU	159.7±7.2 ^{b,c}	74.3±0.6 ^b	28.5±1.1 ^d	24.7±0.7 ^b	9.6±0.9 ^{c,d}	11.1±0.5 ^{a,b}
	RGU	200.7±3.1 ^a	90.7±2.9 ^a	42.1±3.1 ^b	33±0.3 ^a	12.1±1.2 ^{a,b}	10.2±0.4 ^{b,c}
	RGN	193±23.1 ^a	38±1 ^{d,e}	21.1±0.1 ^e	4.6±0.1 ^e	7.9±0.8 ^{d,e}	7.4±0.5 ^d
	RGN2	182.3±1.5 ^{a,b}	38±5.6 ^{d,e}	36.2±1.9 ^c	7.6±0.3 ^d	10.4±0.9 ^{b,c}	10.2±0.4 ^{b,c}
	RAN	205.5±5 ^a	51.7±2.1 ^c	29.4±1.1 ^d	7±0.6 ^d	8.1±0.8 ^{d,e}	8.1±0.8 ^d
	RPN	154.3±9.1 ^c	41.3±1.5 ^d	28.4±1.9 ^d	7±0.6 ^d	10.9±0.8 ^{a,c}	9.3±0.5 ^c
	RGH	155.7±2.3 ^c	32±1 ^e	20.6±0.9 ^e	1.9±0.7 ^f	7.7±0.8 ^e	S/I
3	RUO	162±2 ^c	137±5.3 ^{c,d}	35.4±1.7 ^b	30.7±0.9 ^c	12.1±0.2 ^b	9.1±0.4 ^b
	RAU	212.7±4.6 ^a	148.3±6.5 ^{b,c}	30±0.2 ^c	19.5±0.8 ^e	11.6±0.9 ^b	9.2±0.5 ^b
	RGU	184±4.4 ^b	166.7±2.9 ^a	49.3±1.9 ^a	46.3±1.7 ^a	14±1.7 ^a	12.8±0.4 ^a
	RGN	183±2.6 ^b	148.7±5.7 ^{b,c}	23.3±0.4 ^d	16.2±0.6 ^f	9.1±0.1 ^c	8.7±0.7 ^b
	RGN2	175.7±6.4 ^b	154.3±2.5 ^b	46.5±1.9 ^a	38.3±0.5 ^b	11.6±0.3 ^b	12.4±0.5 ^a
	RAN	202.3±2.5 ^a	147.3±3.1 ^{b,d}	36.1±1.2 ^b	20.9±0.4 ^{d,e}	10.9±0.2 ^b	8.6±0.6 ^b
	RPN	125.7±1.2 ^e	116.7±3.5 ^e	18.7±0.3 ^e	15.7±0.9 ^f	11.2±0.6 ^b	9±0.5 ^b
	RGH	137.7±3.1 ^d	135.3±2.5 ^d	25.2±1.9 ^d	23.3±1 ^d	9±0.3 ^c	8.5±0.3 ^b
4	ROU	191±10.1 ^{b,c}	153±3 ^{b,c}	38.1±1.6 ^b	26.3±0.9 ^a	10.9±0.5 ^b	10.1±0.4 ^{a,b}
	RAU	188±3.1 ^c	160.7±2.9 ^b	20.3±2.2 ^d	17.8±0.8 ^d	10.3±0.7 ^{b,d}	10.2±0.3 ^{a,b}
	RGU	183±1 ^c	147.3±4 ^c	48.3±1.4 ^a	27.2±0.9 ^a	10.5±0.3 ^{b,c}	9.5±0.9 ^{b,c}
	RGN	179.3±2.1 ^{c,d}	95.3±1.5 ^d	21.8±0.8 ^d	11.3±0.5 ^e	10.8±1.2 ^{b,c}	9.6±0.7 ^{b,c}
	RGN2	167.3±4.7 ^d	148±4.6 ^c	27.6±1.1 ^c	19.6±0.7 ^{c,d}	9.5±0.5 ^{c,d}	8.9±0.6 ^c
	RAN	205.3±5.7 ^b	174.3±4.9 ^a	29.1±0.5 ^c	22.3±3.3 ^{b,c}	9±0.2 ^d	8.6±0.5 ^c
	RPN	220.7±7.4 ^a	146±2.6 ^c	45.9±1 ^a	24.4±0.6 ^{a,b}	14.3±1.3 ^a	11.1±0.4 ^a
	RGH	131.3±2.5 ^e	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
5	RUO	200.7±7.6 ^{a,b}	132.3±8 ^b	48.9±2.2 ^a	38.2±0.9 ^b	12.6±1.2 ^a	11.1±0.4 ^{b,c}
	RAU	193±2.3 ^{b,c}	136.7±6 ^b	35.4±2 ^c	26.5±0.3 ^d	11.1±0.8 ^{b,c}	10.5±0.3 ^{c,d}
	RGU	213.3±1.2 ^a	132.3±6.5 ^b	41.3±0.9 ^b	29.2±1.5 ^c	12.5±0.4 ^a	12.7±0.8 ^a
	RGN	167.3±5.5 ^e	128.7±3.1 ^b	35.3±0.6 ^c	25.9±0.8 ^d	11.1±0.4 ^{b,c}	11.4±0.2 ^b
	RGN2	184.3±9.8 ^{c,d}	133.7±2.5 ^b	41.7±0.6 ^b	29.2±0.9 ^c	10.8±0.7 ^c	10.7±1.5 ^{c,d}
	RAN	175±3 ^{d,e}	159±1 ^a	27.8±1.2 ^d	22.8±0.3 ^e	10.1±0.5 ^c	9.9±0.3 ^d
	RPN	176±5.3 ^{d,e}	160.7±3.5 ^a	53.6±3.6 ^a	45.2±1.4 ^a	12.3±1 ^{a,b}	13±0.5 ^a
	RGH	122.3±5.5 ^f	S/D	25.5±0.7 ^d	S/D	10.7±0.7 ^c	S/D

Cuadro 6.4: Amplitud en rendimiento de extracto, polifenoles y actividad antimicrobiana (contra *Clavibacter michiganensis* subsp., *michiganensis*, mediante difusión en disco) para los diferentes genotipos de *Rubus* colectados en el estado de Michoacán, México.

Genotipo	Extracto mg/g		Polifenoles mgEAG/g		Inhibición mm	
	Metanol	Etanol	Metanol	Etanol	Metanol	Etanol
RGU	157±0.6 a 213.3±1.2	90.7±2.9 a 166.7±2.9	22.3±1.2 a 49.3±1.9	21.4±0.2 a 46.3±1.7	10.2±1.8 a 14±1.7	9.5±0.9 a 12.98±0.4
RAU	159.7±7.2 a 212.7±4.6	74.3±0.6 a 160.74±2.9	10.1±1.3 a 35.4±2	8.8±0.4 a 26.5±0.3	5.5±0 a 11.6±0.9	7.6±0.4 a 11.1±0.5
ROU	162±2 a 200.7±7.6	71.7±1.2 a 153±3	17.4±1.3 a 50.3±3.1	14.6±0.7 a 38.2±0.9	7.6±0.8 a 12.5±1.2	8.9±0.4 a 11.7±0.8
RPN	125.7±1.2 a 220.7±7.4	41.3±1.5 a 160.7±3.5	18.7±0.3 a 53.6±3.6	7.0±0.6 a 45.2±1.4	10.3±0.4 a 14.3±1.3	9.0±0.5 a 13.2±0.4
RGN	160.3±8.1 a 193±23.1	38±1 a 148.7±5.7	21.1±0.1 a 35.3±0.6	4.6±0.1 a 25.9±0.8	7.9±0.8 a 11.1±0.4	7.4±0.5 a 12.1±0.8
RAN	175±3 a 214.3±4.2	51.7±2.1 a 174.3±4.9	27.8±1.2 a 36.1±1.2	7.0±0.6 a 22.8±0.3	8.1±0.8 a 11.1±1.3	8.1±0.8 a 11.4±0.9
RGN2	167.3±4.7 a 187.3±2.9	30.8±5.6 a 154.3±2.5	27.6±1.1 a 46.5±1.9	7.6±0.3 a 38.3±0.5	9.5±0.5 a 11.6±0.3	8.9±0.6 a 12.4±0.5
RGH	122.3±5.5 a 155.7±2.3	32±1 a 135.3±2.5	19.7±0.6 a 25.5±0.7	1.9±0.7 a 23.3±1	7.7±0.4 a 10.7±0.7	5.5±0 a 12.5±0.1

Cuadro 6.5: Análisis de regresión lineal simple donde se evaluó la correlación entre las características físicas de folíolos a través de los diferentes periodos de colecta, con el rendimiento de extracto obtenido por maceración metanólica. Apréciase que el valor de R^2 , es diferente para cada material de *Rubus*, indicando diferentes grados de correlación según la característica de los folíolos. S/D = sin datos.

Características de folíolos	Genotipo	Valor - P	Medida de tendencia central						
			Media			Mediana			
			CC	R^2	R^2 ajust.	Valor - P	CC	R^2	R^2 ajust.
Longitud	ROU	<0.01	0.77	0.6	0.56	<0.001	0.82	0.67	0.64
	RAU	>0.05	-0.52	0.28	0.2	>0.05	0.54	0.29	0.22
	RGU	>0.05	0.12	0.02	-0.08	>0.05	0.15	0.02	-0.08
	RGN	>0.05	0.55	0.3	0.23	<0.05	0.57	0.33	0.27
	RGN2	<0.05	0.67	0.45	0.4	<0.05	0.69	0.47	0.42
	RAN	>0.05	0.43	0.18	0.1	>0.05	0.4	0.16	0.08
	RPN	>0.05	0.57	0.32	0.26	<0.05	0.6	0.37	0.31
	RGH	>0.05	0.55	0.31	0.24	>0.05	0.57	0.32	0.26
Ancho	ROU	<0.05	-0.62	0.39	0.33	<0.01	-0.72	0.52	0.47
	RAU	<0.01	-0.71	0.51	0.46	<0.01	-0.73	0.54	0.49
	RGU	<0.05	0.63	0.4	0.34	>0.05	0.57	0.33	0.26
	RGN	>0.05	0.52	0.27	0.2	>0.05	0.52	0.27	0.2
	RGN2	>0.05	-0.52	0.27	0.19	>0.05	-0.57	0.32	0.25
	RAN	>0.05	0.45	0.2	0.12	>0.05	0.36	0.13	0.04
	RPN	<0.05	0.67	0.44	0.39	<0.05	0.69	0.47	0.42
	RGH	>0.05	0.41	0.17	0.08	>0.05	0.42	0.18	0.09
Coordenadas de color L*	ROU	<0.05	0.69	0.48	0.43	<0.05	0.69	0.48	0.43
	RAU	<0.05	0.69	0.48	0.42	<0.01	0.76	0.57	0.53
	RGU	>0.05	-0.12	0.01	-0.08	>0.05	0.16	0.03	-0.07
	RGN	>0.05	0.19	0.04	-0.06	>0.05	0.3	0.09	-0.03
	RGN2	>0.05	0.34	0.12	0.03	>0.05	0.43	0.18	0.1
	RAN	<0.01	-0.85	0.73	0.69	<0.01	-0.86	0.74	0.7
	RPN	<0.05	0.63	0.4	0.34	>0.05	0.55	0.3	0.23
	RGH	>0.05	-0.59	0.35	0.26	<0.05	-0.72	0.51	0.44
Coordenadas de color a*	ROU	<0.001	0.82	0.68	0.65	<0.001	-0.83	0.69	0.66
	RAU	<0.01	0.75	0.56	0.52	<0.05	0.7	0.49	0.44
	RGU	<0.05	0.58	0.33	0.27	>0.05	0.47	0.22	0.14
	RGN	>0.05	-0.47	0.22	0.14	>0.05	-0.45	0.2	0.12
	RGN2	>0.05	-0.23	0.05	-0.04	>0.05	-0.27	0.07	-0.02
	RAN	<0.05	0.79	0.63	0.58	<0.05	0.76	0.58	0.52
	RPN	<0.001	-0.87	0.76	0.73	<0.001	-0.87	0.75	0.73
	RGH	<0.01	0.82	0.68	0.63	<0.01	0.85	0.72	0.68
Coordenadas de color b*	ROU	<0.05	0.64	0.42	0.36	<0.01	0.74	0.55	0.5
	RAU	>0.05	0.36	0.13	0.05	>0.05	0.43	0.18	0.1
	RGU	>0.05	-0.28	0.08	-0.01	>0.05	-0.23	0.05	-0.04
	RGN	>0.05	0.55	0.3	0.23	>0.05	0.55	0.31	0.24
	RGN2	>0.05	0.42	0.17	0.09	>0.05	0.45	0.21	0.13
	RAN	<0.01	-0.83	0.69	0.65	<0.01	-0.83	0.7	0.65
	RPN	<0.01	0.81	0.65	0.61	<0.01	0.81	0.65	0.62
	RGH	<0.05	-0.68	0.47	0.39	<0.01	-0.8	0.65	0.6

Cuadro 6.7: Análisis de regresión lineal simple donde se evaluó la correlación entre las características físicas de folíolos a través de los diferentes periodos de colecta, con el rendimiento de polifenoles obtenido por maceración metanólica. Apréciase que el valor de R^2 , es diferente para cada material de *Rubus*, indicando diferentes grados de correlación según la característica de los folíolos. S/D = sin datos.

Características de folíolos	Genotipo	Valor - P	Medida de tendencia central						
			Media			Mediana			
			CC	R^2	R^2 ajust.	Valor - P	CC	R^2	R^2 ajust.
Longitud	ROU	>0.05	-0.57	0.32	0.25	<0.05	-0.62	0.38	0.32
	RAU	>0.05	0.15	0.02	-0.08	>0.05	0.17	0.03	-0.07
	RGU	>0.05	-0.13	0.02	-0.08	>0.05	-0.17	0.03	-0.07
	RGN	<0.01	-0.82	0.66	0.63	<0.001	0.84	0.7	0.67
	RGN2	>0.05	0.42	0.17	0.09	>0.05	0.22	0.05	-0.05
	RAN	>0.05	0.27	0.07	-0.02	>0.05	0.21	0.04	-0.05
	RPN	>0.05	0.11	0.01	-0.09	>0.05	0.18	0.03	-0.07
	RGH	>0.05	-0.64	0.41	0.32	>0.05	-0.62	0.39	0.3
Ancho	ROU	<0.05	0.62	0.38	0.32	<0.05	-0.7	0.49	0.44
	RAU	>0.05	-0.25	0.06	-0.03	>0.05	-0.02	0.04	-0.06
	RGU	<0.05	-0.65	0.42	0.36	<0.05	-0.63	0.39	0.33
	RGN	<0.01	-0.75	0.56	0.51	<0.01	0.76	0.58	0.54
	RGN2	<0.001	-0.98	0.96	0.96	<0.001	-0.93	0.86	0.85
	RAN	>0.05	0.27	0.08	-0.02	>0.05	0.13	0.02	-0.08
	RPN	>0.05	0.17	0.03	-0.07	>0.05	0.24	0.06	-0.03
	RGH	>0.05	0.03	0.00	-0.14	>0.05	0.01	0.00	-0.14
Coordenadas de color L*	ROU	<0.001	0.95	0.91	0.09	<0.001	0.9	0.81	0.79
	RAU	>0.05	0.26	0.07	-0.02	>0.05	0.13	0.02	-0.08
	RGU	>0.05	0.29	0.09	0.00	>0.05	0.3	0.09	0.00
	RGN	>0.05	0.12	0.01	-0.08	>0.05	0.00	0.00	-0.13
	RGN2	>0.05	0.3	0.09	0.00	>0.05	0.37	0.13	0.05
	RAN	>0.05	0.08	0.00	-0.13	>0.05	-0.1	0.01	-0.13
	RPN	>0.05	0.14	0.02	-0.07	>0.05	0.03	0.00	-0.09
	RGH	<0.01	0.87	0.76	0.73	<0.001	0.9	0.82	0.79
Coordenadas de color a*	ROU	<0.001	-0.85	0.72	0.69	<0.001	-0.83	0.68	0.65
	RAU	>0.05	0.57	0.33	0.26	<0.05	0.65	0.42	0.36
	RGU	>0.05	-0.43	0.18	0.1	>0.05	0.29	0.08	0.00
	RGN	>0.05	0.37	0.14	0.05	>0.05	0.35	0.12	0.03
	RGN2	>0.05	0.14	0.02	-0.08	>0.05	-0.19	0.04	-0.06
	RAN	>0.05	0.03	0.00	-0.14	>0.05	-0.08	0.00	-0.14
	RPN	<0.05	-0.63	0.4	0.34	<0.05	-0.58	0.34	0.28
	RGH	<0.01	-0.89	0.8	0.77	<0.01	-0.88	0.77	0.73
Coordenadas de color b*	ROU	<0.001	0.91	0.82	0.8	<0.001	0.95	0.9	0.89
	RAU	>0.05	0.12	0.02	-0.08	>0.05	-0.22	0.05	-0.05
	RGU	>0.05	0.41	0.17	0.09	>0.05	0.36	0.13	0.05
	RGN	>0.05	0.41	0.17	0.08	>0.05	-0.42	0.18	0.1
	RGN2	>0.05	0.28	0.08	-0.01	>0.05	0.27	0.08	-0.02
	RAN	>0.05	-0.04	0.00	-0.14	>0.05	-0.05	0.00	-0.14
	RPN	>0.05	0.42	0.17	0.09	>0.05	0.43	0.18	0.01
	RGH	<0.05	-0.68	0.47	0.39	<0.01	-0.8	0.65	0.6

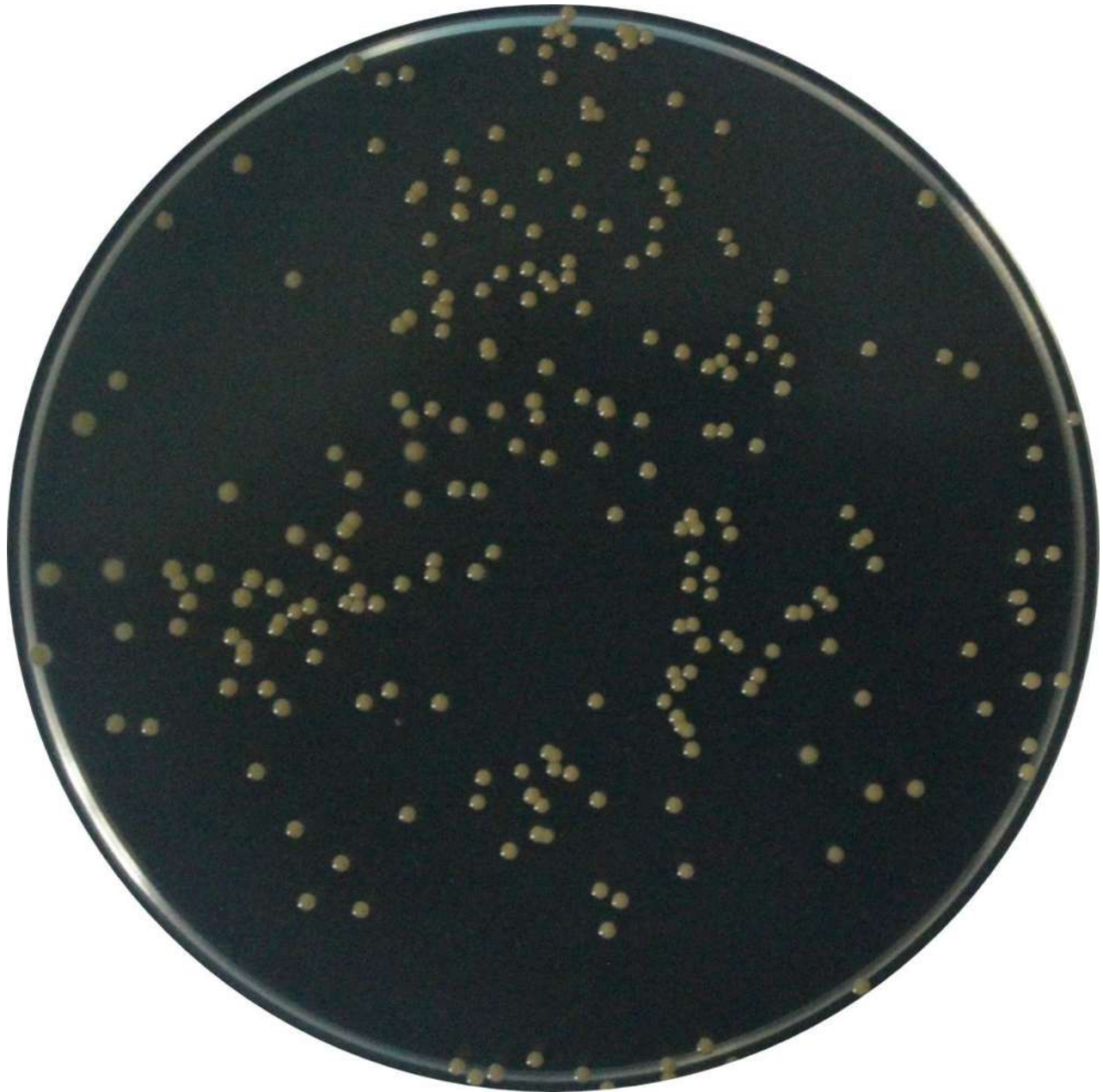


Figura 6.1: Crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subsp., *michiganensis* sobre medio PDA mediante la técnica de dilución seriada