INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL Y REGIONAL UNIDAD MICHOACÁN

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DE ANTOCIANINAS DE FRESA CONTRA BACTERIAS FITOPATÓGENAS

TESIS

para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable

Presenta:

JESÚS ARMANDO LUCAS BAUTISTA

Directoras de tesis:

Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante

Dra. María del Rocío Ramírez Jiménez

Jiquilpan de Juárez, Michoacán, México
OCTUBRE, 2017

SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Jiquilpan, Michoacán siendo las 12:00 horas del día 7 del mes de Septiembre del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR Unidad Michoacán para examinar la tesis titulada:

"Actividad antimicrobiana ***in vitro*** de antocianinas de fresa contra bacterias fitopatógenas"

Presentada por el alumno:

Lucas	Bautista	Jesús Armando
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre

Con registro: B 1 5 1 3 0 7

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron ***APROBAR LA TESIS***, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA
Directores de tesis

Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante

Dra. Ma. del Rocio Ramírez Jiménez

Dra. María Valentina Angoa Pérez

Dra. Dioselina Álvarez Bernal

Dr. Jorge Molina Torres

Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
Instituto Politécnico Nacional
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
CIIDIR - IPN - U-MICH

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Jiquilpan de Juárez, Michoacán, el día 24 del mes de Octubre del año 2017 el que suscribe Jesús Armando Lucas Bautista alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable, con número de registro B151307, adscrito al C.I.I.D.I.R. I.P.N Unidad Michoacán, manifiesto que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante y de la Dra. María del Rocío Ramírez Jiménez y cede los derechos del trabajo titulado "Actividad antimicrobiana *in vitro* de antocianinas de fresa contra bacterias fitopatógenas" al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones lukairo21@hotmail.com, hmena@ipn.mx, rramírez7744@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Jesús Armando Lucas Bautista

Agradecimientos

Agradezco al Instituto Politécnico Nacional por brindarme la oportunidad de continuar con mi carrera profesional en el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán, al que, a su vez, doy gracias por haberme otorgado una educación de calidad en sus instalaciones donde puede desarrollar y culminar mi proyecto con satisfacción. Asimismo, gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico durante la realización de este proyecto.

Doy gracias sinceramente a todos mis profesores que me compartieron de su conocimiento. Gracias a la doctora Rocío por su especial interés y dirección de que este trabajo fuera de calidad y por su ayuda en lo académico y administrativo; gracias a la doctora Dioselina por sus revisiones y por sus sugerencias en este proyecto; al doctor Molina por su disponibilidad y por sus conocimientos y asesorías para mejorar. Agradezco a mi maestra Vale, la doctora Valentina, por su apoyo incondicional desde el principio, gracias por su paciencia y cariño para enseñarme; gracias a la mi maestra Lupita por toda su ayuda en el laboratorio, por su compañía moral y por sus consejos no sólo académicos; gracias a mi maestro y padrino Ernesto por todo lo compartido en el trabajo rudo y por su asesoría y asistencia en innumerables ocasiones; de verdad, muchas gracias. Por último, doy gracias especialmente a mi maestra Tenchis, la doctora Hortencia, por aceptarme y dirigirme sabiamente en esta investigación, por todo el apoyo incondicional que me brindó, por animarme en los momentos complicados, por su incansable interés en mi formación académica y por haberme puesto en el mejor equipo de trabajo que pudiera tener. Dios les llene de bendiciones por todo el bien que me han hecho.

Gracias a todos mis compañeros y amigos con los que transitamos en este cachito de vida. Reconozco a Sam y a Ytzi por su ayuda en tantas horas de trabajo; gracias a Jeanette por compartirme de sus conocimientos; gracias a Viviana, Omar, Laura, Felipe, Victoria, Guillermo, Martha, Janette, Esteban, Yiruba, Natalia, Osvaldo, Giovancito y al Yovis por hacer este trayecto divertido.

Agradezco mi familia, a mis padres, Armando y Sara, por su apoyo incondicional en toda ocasión y decisión, por aceptarme en sus vidas y permitirme desarrollarme en su amor, por cargarme cuando estuve cansado y por no dejarme caer; gracias a mi hermano, el Brian, a quien admiro y quiero demasiado por ser la alegría del hogar y por aguantarme.

Por último y primero que todo, agradezco a Dios por el don de la vida, por permanecer siempre conmigo y sostenerme fuerte de su mano y no dejarme soltarlo, por ayudarme a tomar decisiones y por colocarme en el momento y lugar exactos para yo ser feliz e irradiarlo a los demás; gracias por permitirme continuar con mi formación académica y culminar esta etapa con gozo, por todo lo que me da sin merecerlo y por todo lo que se queda en mi corazón y lo sabe. Gracias a Él, a nuestra Madre, la virgen María y a todos mis ángeles por su cuidado y amor.

Mt. 14, 24-36.

Dedicatorias

Este trabajo lo dedico a mis padres y a Dios por ser el motor que me impulsa a continuar superándome y a tratar de ser mejor persona cada día.

--Kairo--

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras ..... **viiii**
Índice de tablas ..... **x**
Resumen ..... **xi**
Abstract ..... **xii**
I INTRODUCCIÓN **1**
II ANTECEDENTES **4**
2.1 Metabolismo secundario de las plantas **4**
2.1.1 Terpenos 5
2.1.2 Compuestos nitrogenados o alcaloides 5
2.1.3 Compuestos fenólicos 6
2.2 Antocianinas **9**
2.2.1 Propiedades bioactivas de las antocianinas 11
2.2.2 Fuentes de antocianinas 12
2.2.3 Actividad antimicrobiana de antocianinas 13
2.3 Generalidades de la fresa **14**
2.3.1 Variedades de fresa 16
2.3.2 Producción de fresa 18
2.3.3 Importancia económica en México 18
2.3.4 Propiedades nutricionales y medicinales 19
2.3.5 Antocianinas en fresa 20
2.4 Enfermedades causadas por fitopatógenos **20**
2.5 Bacterias **21**
2.5.1 *Pseudomonas syringae* 23
2.5.2 *Xanthomonas vesicatoria* 24
III OBJETIVOS **27**
3.1 Objetivo general **27**
3.2 Objetivos específicos **27**
IV HIPÓTESIS **27**
V MATERIALES Y MÉTODOS **28**
5.1 Material biológico **28**
5.2 Extracción y cuantificación de antocianinas totales **28**

5.3 Ensayos de inhibición *in vitro* **29**
5.4 Cromatografía líquida en capa fina de alta resolución de los extractos antociánicos **31**
5.5 Bioautografía directa de antocianinas contra *X. vesicatoria* y *P. syringae* **32**
5.6 Análisis estadístico **33**
VI RESULTADOS **34**
6.1 Contenido de antocianinas totales en frutos de fresa **34**
6.2 Ensayos de inhibición *in vitro* de bacterias fitopatógenas con extractos antociánicos de frutos de fresa **35**
6.2.1 Inhibición bacteriana de los extractos antociánicos contra *X. vesicatoria* 35
6.2.2 Porcentajes de inhibición bacteriana de los tratamientos contra *P. syringae* 41
6.2.3 Determinación de variedades con mayor poder inhibitorio 47
6.3 Separación de extractos antociánicos por HPTLC **48**
6.4 Bioautogramas de *X. vesicatoria* y *P. syringae* **51**
VII DISCUSIÓN **53**
VIII CONCLUSIONES **57**
IX BIBLIOGRAFÍA **58**

Índice de figuras

Figura 1	Estructura química básica de flavonoides…….…….	7
Figura 2	Ejemplos de flavonoides y su estructura……..……...	7
Figura 3	Estructura básica de antocianinas…….……..	9
Figura 4	Inhibición de *X. vesicatoria* por extractos antociánicos de frutos de *Fragaria* x *ananassa* Duch. variedad Albion……..…....	36
Figura 5	Inhibición de *X. vesicatoria* por extractos antociánicos de frutos de *Fragaria* x *ananassa* Duch. variedad Festival……..…..	37
Figura 6	Inhibición de *X. vesicatoria* por extractos antociánicos de frutos de *Fragaria* x *ananassa* Duch. variedad Camino Real……...	38
Figura 7	Inhibición de *X. vesicatoria* por extractos antociánicos de frutos de *Fragaria* x *ananassa* Duch. variedad San Andreas…….....	39
Figura 8	Inhibición de *X. vesicatoria* por extractos antociánicos de frutos de *Fragaria* x *ananassa* Duch. variedad Frontera……...	40
Figura 9	Inhibición de *X. vesicatoria* por extractos antociánicos de frutos de fresa de las variedades Albion, Festival, Camino real, San Andreas y Frontera a concentraciones de 500 y 1000 mg de cianidina 3-glucósido……..	41
Figura 10	Inhibición de *P. vesicatoria* por extractos antociánicos de frutos de *Fragaria* x *ananassa* Duch. variedad Albion……	42
Figura 11	Inhibición de *P. vesicatoria* por extractos antociánicos de frutos de *Fragaria* x *ananassa* Duch. variedad Festival ...……	43
Figura 12	Inhibición de *P. vesicatoria* por extractos antociánicos de frutos de *Fragaria* x *ananassa* Duch. variedad Camino Real……	44
Figura 13	Inhibición de *P. vesicatoria* por extractos antociánicos de frutos de *Fragaria* x *ananassa* Duch. variedad San Andreas……	45
Figura 14	Inhibición de *P. vesicatoria* por extractos antociánicos de frutos de *Fragaria* x *ananassa* Duch. variedad Frontera……...	46
Figura 15	Inhibición de *P. syringae* por extractos antociánicos de frutos de fresa de las variedades Albion, Festival, Camino real, San Andreas y Frontera a concentraciones de 500 y 1000 mg de cianidina 3-glucósido…….....	47
Figura 16	Cromatograma de HPTLC mostrando la separación de los componentes de cinco variedades de *Fragaria* x *ananassa* Duch.: Albion (pistas 1, 6 y 11), Festival (pistas 2, 7 y 12), Camino Real (3, 8, y 13), San Andreas (4, 9 y 14) y Frontera (5, 10 y 15); las pistas 16, 17 y 18 corresponden a extractos de la variedad Albion aplicados a 1, 3 y 5 µL, respectivamente…….	49
Figura 17a	Cromatograma de HPTLC mostrando la separación de antocianinas de los extractos de cinco variedades de *Fragaria* x *ananassa* Duch. obtenido siguiendo la metodología de Cretu & Morlock, (2014): Albion, Festival,	

Camino Real, San Andreas y Frontera (Pistas 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente)…….. 50
Figura 17b Mezcla de antocianinas estándar reportada por Cretu & Morlock, (2014). Se presentan la pelargonidina 3-glucósido y la cianidina 3-glucósido a R_f cercano a 5.2 y a 3.5, respectivamente……..... 50
Figura 18a Cromatograma de HPTLC mostrando la separación de antocianinas de los extractos de cinco variedades de *Fragaria* x *ananassa* Duch.: Albion, Festival, Camino Real, San Andreas y Frontera (Pistas 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente)… 51
Figura 18b Bioautograma de extractos antociánicos contra *X. vesicatoria*..…… 51
Figura 19a Cromatograma de HPTLC mostrando la separación de antocianinas de los extractos de cinco variedades de *Fragaria* x *ananassa* Duch: Albion, Festival, Camino Real, San Andreas y Frontera (Pistas 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente)……. 52
Figura 19b Bioautograma de extractos antociánicos contra *P. syringae* ……. 52

Índice de tablas

Tabla 1	Identificación estructural de antocianidinas……	10
Tabla 2	Taxonomía de la fresa……	15
Tabla 3	Composición química de las fresas por cada 100 g de fruto……..	19
Tabla 4	Tratamientos utilizados en los ensayos de inhibición *in vitro*……...	30
Tabla 5	Contenido de antocianinas totales de frutos de cinco variedades de *Fragaria* x *ananassa* Duch……...	34
Tabla 6	Concentración máxima de antocianinas totales de frutos de cinco variedades de *Fragaria* x *ananassa* Duch……	35
Tabla 7	Efecto de extractos antociánicos de *Fragaria* x *ananassa* Duch. conteniendo 1000 mg de cianidina 3-glucósido sobre el crecimiento *X. vesicatoria* a las 72 h…….	48
Tabla 8	Efecto de extractos antociánicos de *Fragaria* x *ananassa* Duch. conteniendo 1000 mg de cianidina 3-glucósido sobre el crecimiento *P. vesicatoria* a las 72 h……..	48

Resumen

Las plantas sintetizan metabolitos secundarios que les permiten relacionarse y defenderse del medio. Su empleo para el control de bacterias fitopatógenas en el marco de la agricultura sostenible, es una alternativa promisoria al uso de compuestos químicos sintéticos, debido a que son biodegradables, de elevada efectividad y no contaminan al medio ambiente.

Entre la gran diversidad de metabolitos secundarios, los flavonoides han mostrado actividad controladora de fitopatógenos. Las antocianinas son un grupo abundante de flavonoides responsables de otorgar los colores que van desde el rojo al morado en tallos, flores y frutos de algunas plantas, siendo el fruto de la fresa uno de los de más alto contenido.

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de antocianinas de fresa contra bacterias fitopatógenas. Para ello, se evaluaron extractos antociánicos de cinco variedades comerciales de fresa y se confrontaron con las bacterias por separado por el método de difusión en disco teniendo como controles antibióticos comerciales. Los extractos antociánicos de las cinco variedades de fresa mostraron poder inhibitorio contra ambas bacterias fitopatógenas superando al bactericida agrícola analizado.

Asimismo, los extractos antociánicos de fresa fueron separados por HPTCL y sometidos a Bioautografía directa para saber qué tipo de compuestos eran los causantes de la inhibición. Los resultados sugieren que las antocianinas pelargonidina-3 glucósido y cianidina-3 glucósido, además de otros compuestos presentes en los extractos antociánicos poseen actividad antimicrobiana contra las bacterias fitopatógenas ensayadas.

Abstract

Plants synthesize secondary metabolites that allow them to interact and defend themselves from the environment. Its use for the control of phytopathogenic bacteria in the framework of sustainable agriculture is a promising alternative to the use of synthetic chemical compounds, because it is biodegradable, highly effective and non-polluting to the environment.

Among the great diversity of secondary metabolites, flavonoids have shown phytopathogen controlling activity. Anthocyanins are an abundant group of flavonoids responsible for giving colors ranging from red to purple on stems, flowers and fruits of some plants, the fruit of the strawberry being one of the highest content.

The objective of this study was to evaluate the *in vitro* antimicrobial activity of strawberry anthocyanins against phytopathogenic bacteria. For this, anthocyanic extracts of five commercial strawberry varieties were evaluated and the bacteria were confronted separately by the disc diffusion method with commercial antibiotic controls as controls. The anthocyanic extracts of the five strawberry varieties showed inhibitory power against both phytopathogenic bacteria, overcoming the analyzed agricultural bactericide.

Also, anthocyanin strawberry extracts were separated by HPTCL and subjected to direct Bioautography to know what type of compounds were causing the inhibition. The results suggest that the anthocyanins pelargonidin-3 glucoside and cyanidin-3 glucoside, in addition to other compounds present in the anthocyanin extracts, have antimicrobial activity against the phytopathogenic bacteria tested.

I INTRODUCCIÓN

Las plantas, al ser organismos sésiles, destinan parte de su energía en la fabricación de compuestos químicos que les permiten relacionarse con el ambiente; dichos compuestos, denominados metabolitos secundarios, tienen diversas funciones como la comunicación con otros organismos, para repeler o atraer insectos o como protección ante ciertos efectos del ambiente e, incluso, para evitar la multiplicación y ataque de microorganismos fitopatógenos (Ortiz *et al*., 2014).

Desde un punto de vista antropocéntrico, las plantas son fuente de metabolitos secundarios que pueden emplearse para el control de plagas y enfermedades. Un ejemplo es el trabajo realizado por Ramírez-Reyes *et al.* (2015) quienes reportaron la inhibición del crecimiento de las bacterias fitopatógenas *Pectobacterium carotovorum* y *Pseudomonas cichorii*, responsables de la pudrición blanda *y* tizón bacteriano, respectivamente, por el extracto floral de magnolia (*Magnolia schiedeana*). Asimismo, Chirinos *et al.* (2013), evaluaron el efecto controlador de 16 extractos vegetales contra *Xanthomonas axonaphodi pv. manihotis* causante de bacteriosis en yuca, y *Xanthomonas* sp.; destacando los extractos de níspero (*Mespilus germanica*) y jambul (*Syzygium cumini*) que lograron inhibir el crecimiento de ambas bacterias.

Entre la gran variedad de metabolitos secundarios de las plantas destacan los compuestos fenólicos; a los cuáles, entre otras cosas, se les atribuye actividad antimicrobiana. Apolonio-Rodríguez *et al*. (2017), evaluaron extractos de hojas de vid silvestre (*Vitis* spp.) con alto contenido de compuestos fenólicos (19.9 mg/mL) confrontándolos contra el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, responsable de la enfermedad de moho gris, logrando la inhibición del crecimiento del hongo.

Dentro de la clasificación de los compuestos fenólicos, los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas; éstos, entre otras propiedades, presentan actividad antioxidante, antiinflamatoria, antialérgica, antiviral y anticancerígena, previniendo enfermedades cardiovasculares y la diabetes (Benavente-García & Castillo, 2008; Soto Vázquez, 2015). Aunado a esto, algunos flavonoides actúan también como antimicrobianos

tanto en humanos como en plantas mediante la destrucción total del patógeno o atenuando su actividad al inhibir la síntesis de peptidoglicanos y ribosomas (Xie *et al*., 2015).

Existen trabajos que avalan lo anterior. Por ejemplo, Díaz-Gómez *et al.* (2013), probaron el efecto antimicrobiano del flavonoide catequina y del ácido fenólico ácido gálico sobre *Helicobacter pylori* logrando su inhibición con ambos compuestos. De igual manera, Ammar *et al*. (2013), confrontaron cuatro flavonoides de *Tephrosia apollinea* L.: (isoglabratafrin, (+)-glabratafrin, tefroapolin-F y lanceolatin-A) contra los hongos fitopatógenos *Alternaria alternata*, *Helminthosporium* sp., *Colletotrichum acutatum* y *Pestalotiopsis* sp., mostrando actividad antifúngica sobre todos; siendo tefroapolin-F el más efectivo con un porcentaje de inhibición entre 32.8 y 58.3 %.

Las antocianinas forman parte del grupo de los flavonoides. Confieren las tonalidades que van desde el rojo hasta el morado en flores, tallos y frutos de algunas plantas (Castañeda-Ovando *et al*., 2009). Algunos estudios apuntan a las antocianinas como responsables de presentar actividad antimicrobiana. Burdulis *et al*. (2009), confrontaron extractos del fruto de arándano (*Vaccinium myrtillus* L.) y mora azul (*Vaccinium corymbosum* L.) sobre bacterias enteropatógenas Gram positivas (*Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Enterococcus faecalis* y *Bacillus subtilis*) y Gram negativas (*Salmonella typhimurium, Citrobacter freundii, Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), así como contra ocho levaduras: *Candida parapsilosis, Debaryomyces hansenii, Kluyveromyces marxianus* var. *lactis, Pichia kluyveri, Rhodotorula rubra, Saccharomyces cerevisiae, Trichosporon cutaneum* y *Torulaspora delbrueckii*. Las cepas más sensibles a los extractos fueron *C. freundii* y *E. faecalis;* mientras tanto, las levaduras mostraron resistencia. En este mismo estudio, los autores revelaron que la cianidina es la antocianina dominante en arándano y la malvidina en mora azul.

Česonienė *et al*. (2009), utilizaron extractos del fruto de arándano rojo europeo (*Vaccinium oxycoccos*) para confrontarlos con bacterias enteropatógenas Gram positivas y Gram negativas logrando un efecto antimicrobiano sobre estas, siendo más sensibles *Listeria monocytogenes* y *E. faecalis* con 20.35 y 19.71 mm de inhibición, respectivamente.

En los frutos de fresa, la pelargonidina y la cianidina son las antocianinas más abundantes (Lopes da Silva *et al*., 2007; Basu *et al*., 2010). La fresa ha sido motivo de investigación debido

a las propiedades medicinales que posee, pero recientemente, se está indagando sobre su potencial antimicrobiano. En este sentido, Huerta (2016), exploró el efecto antifúngico de antocianinas de fresa contra los hongos fitopatógenos de *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides*. Sin embargo, aún no se conoce su efecto inhibitorio contra bacterias fitopatógenas.

Los principales géneros de bacterias fitopatógenas que atacan a los cultivos son: *Pseudomonas, Ralstonia, Xanthomonas, Agrobacterium, Erwinia, Xyllela, Dickeya y Clavibacter* (Mansfield *et al*., 2012). Según datos de la Agenda Nacional de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología para el Desarrollo Rural Sustentable, en Michoacán, las bacterias fitopatógenas más comunes son *Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas vesicatoria* (SNITT, 2016).

Por todo lo anterior, en el presente trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de antocianinas de frutos de fresa contra las bacterias fitopatógenas de *Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas vesicatoria*.

II ANTECEDENTES

2.1 Metabolismo secundario de las plantas

El metabolismo es una serie de reacciones físicas y químicas que ocurren en un organismo por las que se sintetizan y modifican estructuralmente los diversos elementos que lo conforman. Al igual que todo organismo, las plantas tienen un metabolismo que incluye diversas reacciones químicas fundamentales para su supervivencia y reproducción denominado metabolismo basal, el cual está implicado en los procesos respiratorios y fotosintéticos, asimilación de nutrientes, síntesis de biomoléculas básicas o transporte de solutos, entre otros (Ávalos & Pérez-Urria, 2009).

Sin embargo, las plantas destinan parte del carbono asimilado y de la energía para la síntesis de una gran variedad de metabolitos que, aparentemente, no son esenciales, pero tienen funciones variadas, como la interacción con otros organismos para su supervivencia. Algunas de estas funciones tienen que ver con atraer o repeler organismos por medio de olores específicos; otras, generan pigmentos con un color determinado para atraerlos y lograr polinizar y dispersar sus semillas (Palacios-Rojas *et al*., 2008).

Así, pues, este tipo de compuestos denominados en otros tiempos metabolitos secundarios son productos de un gran número de rutas metabólicas secundarias, que actúan de diferentes formas como señales moleculares en la planta y a su alrededor para defenderse del medio; de esta manera, se puede inducir su producción a través de varios tipos de estrés y generar protección a las plantas (Lattanzio *et al.*, 2006).

Por otra parte, algunos de estos compuestos tienen un valor comercial y médico con aplicaciones en varios tipos de industrias, ya que se incluyen como ingredientes activos en la fabricación de medicamentos, insecticidas, herbicidas, colorantes y perfumes, entre otros (Fumagali *et al.* 2008).

Este tipo de metabolitos no se encuentran en todos los grupos de plantas ni en las mismas cantidades. Su síntesis, frecuentemente, es dependiente de la etapa de desarrollo de la planta y sus niveles aumentan como parte de la respuesta al estrés biótico o abiótico; asimismo, ocurren

en distintos lugares de la célula y pueden almacenarse en órganos y tejidos diferentes a los de su síntesis (Sepúlveda *et al*., 2003).

La variabilidad estructural que presenta este grupo de compuestos está dada por modificaciones químicas como hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación y glucosilación a una estructura básica. Actualmente, existen aproximadamente 100,000 estructuras de metabolitos secundarios en que la mayoría se pueden agrupar de acuerdo a su composición química básica en terpenos, alcaloides y compuestos fenólicos (Sepúlveda *et al*., 2003; Pérez-Alonso & Jiménez, 2011; Taiz & Zenger, 2010).

2.1.1 Terpenos

Es el grupo de metabolitos secundarios más numeroso con más de 40,000 moléculas distintas. Su función está dirigida al crecimiento vegetal y supervivencia de las plantas, forman parte de las membranas de las plantas sirviéndoles como repelentes de herbívoros. En este grupo se encuentran hormonas (ácido abscísico, giberelinas y citocininas), pigmentos carotenoides, clorofilas y plastoquinonas, ubiquinonas, esteroles, derivados de esteroles (glicósidos cardiacos) y aceites esenciales. Asimismo, entre los terpenos con actividad antiherbívoros se encuentran las saponinas (con propiedades detergentes) y los cardenólidos, compuestos que iniciaron la industria farmacéutica. Los terpenos se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que contiene, pues se derivan de la unión de unidades de este. Se sintetizan a partir de metabolitos primarios mediante las rutas de ácido mevalónico y metileritritol fosfato. Son de interés comercial por sus aromas y fragancias en industrias alimentaria y cosmética (Ávalos & Pérez-Urria, 2009).

2.1.2 Compuestos nitrogenados o alcaloides

Es un grupo de metabolitos secundarios presentes en el 20% de las plantas vasculares, aproximadamente; la mayoría dicotiledóneas herbáceas. Tienen valor terapéutico en humanos, pues originan respuestas psicológicas y fisiológicas como consecuencia de su interacción con neurotransmisores; sin embargo, a elevadas dosis, pueden ser muy tóxicos, pero en dosis bajas son aprovechados por la industria médica como tranquilizantes, relajantes musculares, analgésicos o antitusivos. En este grupo se encuentra la morfina, codeína, heroína, vinblastina,

cocaína, citicina y nicotina, entre otros. La mayoría de los compuestos nitrogenados se sintetizan en la ruta de ácido shikímico a partir de aminoácidos aromáticos y alifáticos formados en el ciclo de Krebs (Sepúlveda *et al*., 2003; Ávalos & Pérez-Urria, 2009).

2.1.3 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son un grupo muy variado de metabolitos secundarios de las plantas, también conocidos como polifenoles o fenilpropanoides. Tienen, como principal característica, un anillo aromático con un grupo hidroxilo. Su síntesis se realiza a partir de los aminoácidos aromáticos formados en la ruta del ácido shikímico y a partir de la ruta del ácido mevalónico teniendo como precursores biosintéticos a un pequeño número de moléculas de piruvato, fosfoenolpiruvato, acetato, acetil-CoA y malonil-CoA. Debido a su alta fitotoxicidad, son almacenados en su forma glucosilada en vacuolas de la planta (Taiz & Zeiger, 2010).

Las funciones de los compuestos fenólicos en las plantas son: la defensa contra herbívoros y fitopatógenos; la protección de rayos UV; la atracción de polinizadores o pigmentos en las plantas, flores y frutos (flavonoides); y como mecanismo de soporte y reguladores de crecimiento (fenilpropanoides simples y derivados del ácido benzoico). Por otro lado, ya en los alimentos, contribuyen a su coloración, sabor y propiedades antioxidantes (Taiz & Zeiger, 2010).

Su clasificación es muy variada debido a lo diversificado de sus estructuras y, según ésta, hay dos grupos: no flavonoides que, a su vez, tiene dos subgrupos que son los fenoles no carboxílicos y los ácidos fenólicos, derivados del ácido cinámico y del ácido benzoico; y los flavonoides. Su distribución está determinada por factores endógenos y exógenos como la temperatura, la luz o la interacción con agentes bióticos (Gimeno Creus, 2004).

2.1.3.1 Flavonoides

Los flavonoides son los compuestos fenólicos que se hallan ampliamente distribuidos en las plantas. Los pigmentos que confieren color a las flores, frutos y semillas, son flavonoides (Falcone *et al.*, 2012).

Su estructura química (Figura 1) consiste de un esqueleto carbonado que contiene 15 carbonos acomodados en dos anillos aromáticos (A y B) ligados mediante un anillo pirano (C) en un

puente de tres carbonos. Se biosintetizan por la condensación de una molécula de p-cumaril-CoA con tres moléculas de malonil-CoA. Dicha reacción se cataliza gracias a la chalcona sintasa obteniéndose naringerina chalcona, precursor de los flavonoles y antocianinas (Ávalos & Pérez-Urria, 2009).

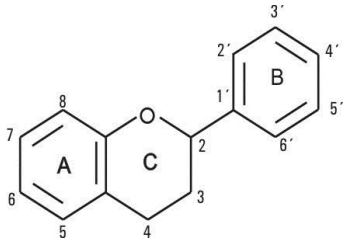
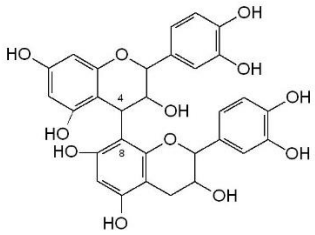


Figura 1. Estructura química básica de flavonoides (Pérez Trueba, 2003).

Su clasificación depende del grado de oxidación del puente de tres carbonos, resultando tres subgrupos principales: antocianinas; flavanonas, flavonas, flavanonoles y flavonoles; y taninos condensados y lignanos (Figura 2) (Gimeno Creus, 2004; Taiz & Zeiger, 2010).

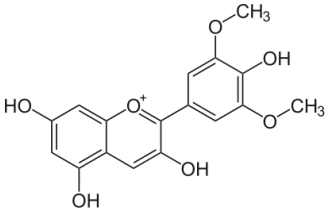
Tanino condesado

Procianidina



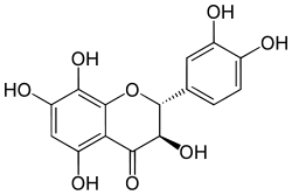
Antocianina

Malvidina



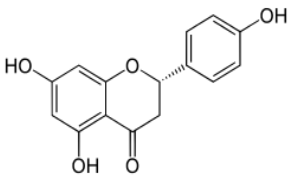
Flavanonol

Aromadendrina



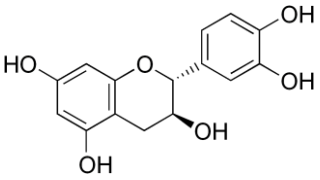
Flavanona

Naringenina



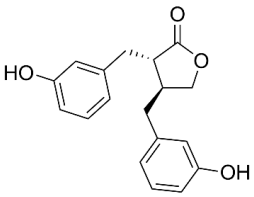
Flavonol

Catequina



Lignano

Enterolactona



Flavona

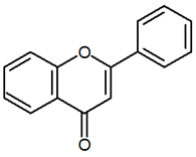


Figura 2. Ejemplos de flavonoides y su estructura.

Se han identificado más de 6,000 flavonoides, cuyas funciones principales son: la protección contra la radiación ultravioleta y contra fitopatógenos, el transporte de auxinas, la atracción de polinizadores a través de la coloración de flores y la señalización durante la nodulación. Son responsables del cambio de coloración de las hojas de muchas plantas durante la senescencia para evitar daños a sus células por foto-oxidación y aumentar la eficacia de la recuperación de nutrientes durante esta etapa (Falcone *et al.*, 2012).

Las funciones biológicas de los flavonoides están relacionadas con su potencial citotóxico y con la interacción que tienen con enzimas a través del complejo proteico. Se sabe que su actividad antioxidante se debe a la estimulación de enzimas como la catalasa y la superóxido dismutasa, reconocidas por su capacidad antioxidante; mientras que inhiben otras como la fosfolipasa y la oxidasa, las cuáles están relacionadas con los procesos oxidativos (Ciappini *et al*. 2013).

Asimismo, la señalización se manifiesta por parte de las flavonas y los flavonoles que son secretados por las leguminosas en el suelo a través de sus raíces para interactuar con los microorganismos simbiontes fijadores de nitrógeno (Taiz & Zeiger, 2010).

Por otro lado, a los flavonoides se les atribuye actividad antimicrobiana. Díaz-Solares *et al.* (2017), comprobaron la acción inhibitoria de flavonoides aislados de morera (*Morus alba* L.) sobre las bacterias enteropatógenas *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonasa eruginosa, Klebsiella pneumoniae* y *Streptococcus ahemolítico*.

Asimismo, Miceli *et al*. (2009), determinaron la composición de flavonoides de los extractos de las frutillas de dos especies de enebro común: *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* y *Juniperus communis* L. var. *communis,* encontrando 16 flavonoides en el primero, siendo los de mayor presencia hypolaetin-7-pentosido y quercetin-hexosido; y, ocho en el segundo, siendo los compuestos más abundantes el quercetin-hexosido y la isoscutellareina-8-O-hexosido. Posteriormente, los confrontaron contra bacterias enteropatógenas logrando inhibición del crecimiento de *Bacillus subtilis, Enterococcus hirae, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis*.

Por otro lado, Ammar *et al.* (2013), aislaron cuatro flavonoides de *Tephrosia apollinea* L. (Isoglabratefrina, (+)-glabratefrina, tefroapolin-F y lanceolatina-A) mostrando un efecto

inhibitorio contra los hongos fitopatógenos: *Alternaria alternata*, *Helminthosporium* sp., *Colletotrichum acutatum* y *Pestalotiopsis* sp.

2.2 Antocianinas

Dentro de la categoría de los flavonoides, las antocianinas son un grupo de pigmentos hidrosolubles de coloración rosa, naranja, roja, azul y violeta distribuidos en el reino vegetal (Taiz & Zeiger, 2010). Gracias a la pigmentación que les confieren a las plantas, las antocianinas poseen funciones de atracción de polinizadores para la posterior dispersión de semillas y les atribuye protección contra los efectos de la radiación ultravioleta (Garzón, 2008).

Las antocianinas se encuentran distribuidas en los órganos de las plantas como frutos, flores, tallos, hojas y raíces. Se sintetizan en el retículo endoplásmico en las rutas del ácido malónico (anillo A) y shikímico (anillo B) para establecerse en vacuolas de las células epidérmicas y, en algunas plantas, en los antocianoplastos (Garzón, 2008; Aguilera-Ortíz *et al*., 2011; Ciowasca *et al.*, 2011).

Químicamente, son glucósidos polihidroxilados o acilglicósidos polihidroxilados de antocianidinas derivados del ión flavilio (2-fenil-benzopirilio) que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B) (Figura 3); distinguiéndose, pues, de otros flavonoides debido a su capacidad para formar cationes flavilio. En otras palabras, se constituyen por una molécula de antocianidina (aglicona) (Tabla 1) unida a un azúcar a través de un enlace β-glucosídico, siendo los más distribuidos en la naturaleza los 3-monósidos, 3-biósidos, 3-5 y 3-7 diglucósidos y 3-glucósido; este último es el más frecuente (Castañeda-Ovaldo *et al*., 2009; Aguilera-Ortíz *et al*., 2011).

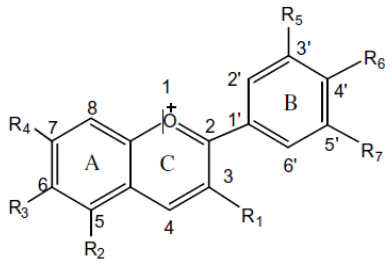


Figura 3. Estructura básica de antocianinas (Castañeda-Ovaldo *et al*., 2009).

Tabla 1. Identificación estructural de antocianidinas

NOMBRE	ABREVIACIÓN	SUSTITUCIÓN						
		R1	**R2**	**R3**	**R4**	**R5**	**R6**	**R7**
Apigeninidina	Ap	H	OH	H	OH	H	OH	H
Arrabidina	Ab	H	H	OH	OH	H	OH	OMe
Aurantinidina	Au	OH	OH	OH	OH	H	OH	H
Capensinidina	Cp	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe
Carajurina	Cj	H	H	OH	OH	H	OMe	OMe
Cianidina	Cy	OH	OH	H	OH	OH	OH	H
Delfinidina	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH
Europinidina	Eu	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH
Hirsutidina	Hs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe
3´-HidroxyAb	3’ OHAb	H	H	OH	OH	OH	OH	OMe
6-HidroxyCy	6OHCy	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH
6-HidroxyDp	6OHDp	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH
6-HidroxyPg	6OHPg	OH	OH	OH	OH	H	OH	H
Luteolina	Lt	H	OH	H	OH	OH	OH	H
Malvidina	Mv	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe
5-MethylCy	5-MCy	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H
Pelargonidina	Pg	OH	OH	H	OH	H	OH	H
Peonidina	Pn	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H
Petunidina	Pt	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH
Pulchellidina	Pl	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH
Riccionidina A	RiA	OH	H	OH	OH	H	OH	H
Rosinidina	Rs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H
Tricetinidina	Tr	H	OH	H	OH	OH	OH	OH

Fuente: Castañeda-Ovaldo *et al*., 2009

En la actualidad, se conocen aproximadamente 30 antocianidinas, siendo las más usuales en plantas vasculares la cianidina (50%), pelargonidina (12%), delfinidina (12%), peonidina

(12%), petunidina (7%) y malvidina (7%); las tres primeras son más comunes en frutos y el resto en flores (Castañeda-Ovaldo *et al*., 2009; Cretu & Morlock, 2014).

Así, pues, con la combinación de cada una de las antocianidinas con los diferentes azúcares como la glucosa, ramnosa, galactosa, xilosa, arabinosa, gentobiosa, rutinosa y soforosa, se han identificado aproximadamente 600 antocianinas, cuyas variaciones se pueden encontrar también en el esqueleto básico de la antocianidina, es decir, en el número y la posición de los sustituyentes metoxilo e hidroxilo. La antocianina más usual en plantas vasculares es la cianidina 3-glucósido (Castañeda-Ovaldo *et al*., 2009; Aguilera-Ortíz *et al*., 2011; Krüger *et al*., 2013).

El pH juega un papel importante en las antocianinas, pues de este depende la forma en que se encuentran (protonadas, desprotonadas, hidratadas e isómeras) y el color que presentan: rojo (pH de 1-3), amarillo (pH de 4-5) azúl-púrpura (pH de 6-7) (Cisowska *et al*. 2011). De igual manera, el color es regido por el número de grupos metoxilo e hidroxilo en el anillo B y por la influencia del patrón de glicosilación, el grado y la naturaleza de esterificación de los azúcares con ácidos alifáticos o aromáticos, la temperatura, el tipo de disolvente y la presencia de copigmentos. Como ejemplos se tiene cianidina (rojo púrpura), pelargonidina (rojo-naranja) y delfinidina (azul púrpura) (Ávalos & Pérez-Urria, 2009).

Por otro lado, las antocianinas son inestables y propensas a la degradación por diferentes factores como: temperatura, luz, oxígeno, pH, estructura química, concentración, solventes, actividad de enzimas, otros flavonoides, proteínas, iones metálicos y a asociaciones intra e intermolecular con otros compuestos (Castañeda-Ovaldo *et al*., 2009; Krüger, 2013).

Por otro lado, las industrias alimenticias y cosméticas que requieren de pigmentos para mejorar las características sensoriales de sus productos de manera natural, han aprovechado la propiedad de las antocianinas de impartir colores atractivos y aplicarlos a sus productos (Garzón, 2008; Aguilera-Ortíz *et al*., 2011).

2.2.1 Propiedades bioactivas de las antocianinas

Recientemente, el interés por los pigmentos antociánicos ha aumentado gracias a sus propiedades terapéuticas y farmacológicas; cuando son consumidas, son incorporadas al torrente

sanguíneo permaneciendo intacta su forma glucosilada, confiriendo efectos benéficos para la salud (Garzón, 2008).

Diversos estudios han confirmado su actividad antioxidante, pues neutralizan radicales libres en sistemas biológicos y previenen enfermedades cardiovasculares y crónico degenerativas como el cáncer y la diabetes (Arrazola *et al.*, 2014; Cosavalente-Burgos *et al*., 2016).

En este sentido, Basu *et al*. (2010), según datos del Estudio de Factores de Riesgo de la Enfermedad Cardiaca Isquémica en Kuopio (KIHD) revelaron que la ingesta de antocianinas presentes en bayas disminuyó el riesgo de muerte por enfermedades cardiovasculares en 1950 en hombres evaluados durante un seguimiento medio de 12.5 años. Asimismo, Tsuda *et al*. (2013), reportaron que el extracto de *Vaccinium oldhamii* Miq., el cual es rico en antocianinas, disminuyó el crecimiento de células HL-60, causantes de la leucemia.

También se les atribuyen propiedades antiinflamatorias, tal es el caso de Vuorela *et al*. (2005), quienes descubrieron que dichos compuestos contenidos en frambuesa suprimían a la prostaglandina EG_2, responsable de inflamaciones.

2.2.2 Fuentes de antocianinas

Las antocianinas se encuentran considerablemente distribuidas en gran variedad de plantas como en los pigmentos de rábanos, col morada, berenjenas, manzanas, tulipanes, rosas y orquídeas, entre otras; pero la principal fuente de antocianinas son los frutos de bayas como los arándanos, frambuesas, zarzamoras, cerezas y fresas, entre otros (Castañeda-Ovaldo *et al*. 2009; Cisowska *et al.*, 2011).

Ante este escenario, Kim *et al*. (2005), reportaron entre 30.5 y 49.1 mg de antocianinas por 100 g de fruto de cereza (*Prunus cerasus* L.). Peña-Varela *et al*. (2006), obtuvieron entre 28.7 a 55.6 mg por 100 g de fruto de frambuesa (*Rubus idaeus* L.); mientras que, Moldovan *et al*. (2012), encontraron 35.6 mg por 100 g de fruto de arándanos (*Vaccinium myrtillus* L.).

Entre las frutillas, la fresa es una de las que más alto contenido de antocianinas tiene, siendo la pelargonidina 3-glucósido y cianidina 3-glucósido las que mayormente se encuentran en el fruto (Musilová *et al*., 2013). En este sentido, Debnath & Ricard (2009), encontraron entre 16.1 a 35.1 mg de cianidina 3-glucósido por 100 g de fruto fresco de fresa.

2.2.3 Actividad antimicrobiana de antocianinas

Además de los beneficios a la salud que confieren las antocianinas, estudios recientes han reportado actividad antimicrobiana por parte de estas. Este hecho ha conducido a investigadores a probar extractos antociánicos para combatir patógenos humanos y agrícolas.

Lacombe *et al*. (2010), probaron componentes del arándano rojo americano (*Vaccinium macrocarpon*), entre ellos el extracto de antocianinas totales presentes en el fruto, contra *Escherichia coli* O157:H7, que mostró inhibición con la desintegración de la membrana externa.

Asimismo, Naz *et al*. (2007), confrontaron compuestos del fruto de granada (*Punica granatum*), entre ellos la pelargonidina-3-galactósido y cianidina-3-glucósido, contra bacterias enteropatógenas Gram positivas: *Bacillus subtilis*, *Micrococcus lysodiecticus, Corynebacterium diphtheriae, C. diphtheriticum, Staphylococcus aureus, S.* s*aprophyticus*, *S. epidermidis, Enterococcus faecium, E. faecalis*, *Streptococcus pneumoniae* y *S. pyogenes* ; y Gram negativas: *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa, Salmonella typhi*, *S. paratyphi* A y B, *Shigella dysenteriae, S.vsonneie* y *S. flexneriae*; causando inhibición sobre todas las cepas, provocando casi el doble de efecto contra las Gram positivas.

En un estudio elaborado por Burdulis *et al*. (2009), se confrontaron extractos del fruto de arándano (*Vaccinium myrtillus* L.) y mora azul (*Vaccinium corymbosum* L.) contra bacterias enteropatógenas Gram positivas: *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* y *Bacillus subtilis*; y Gram negativas: *Salmonella typhimurium, Citrobacter freundii, Escherichia coli y Pseudomonas aeruginosa*; así como contra ocho levaduras: *Candida parapsilosis, Debaryomyces hansenii, Kluyveromyces marxianus var. lactis, Pichia kluyveri, Rhodotorula rubra, Sacharomyces cerevisiae, Trichosporon cutaneum y Torulaspora delbrueckii*. Las cepas más sensibles a los extractos fueron *C. freundii* y *E. faecalis;* mientras tanto, todas las levaduras mostraron resistencia. En este mismo estudio, se reportó que la cianidina es la antocianina dominante en arándano y la malvidina en mora azul.

De igual manera, Česonienė *et al*., (2009) utilizaron extractos de arándano rojo europeo (*Vaccinium oxycoccos*) para controlar el crecimiento de bacterias patógenas Gram positivas: *Enterococcus faecalis, Listeriay monocytogenes, Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*; y Gram negativas: *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*; logrando inhibición sobre estas,

siendo las más sensibles *L. monocytogenes* y *E. faecalis* con 20.35 y 19.71 mm de inhibición, respectivamente.

Recientemente, Gopu *et al*. (2015), investigaron la actividad inhibitoria del "*quorum sensing*" de *Syzygium cumini* contra *Klebsiella pneumoniae,* atribuyendo la inhibición observada a la malvidina.

No se tiene mucha evidencia sobre la actividad antimicrobiana de las antocianinas obtenidas de frutos de fresa; sin embargo, Cárdenas (2016), comprobó el efecto antimicrobiano de antocianinas de fresa sobre los patógenos humanos gastrointestinales *E. coli*, *Salmolella choleraesuis* y *Shigella flexneri.*

En relación con la actividad antimicrobiana de antocianinas de fresa contra fitopatógenos, no se conoce mucho de su efecto; de hecho, se ignora, en general, hasta el momento, de alguna evidencia de antocianinas provenientes de plantas contra organismos fitopatógenos; a excepción del trabajo de Huerta (2016), quien comprobó el efecto antifúngico de antocianinas de fresa contra los hongos fitopatógenos de *Botrytis cinerea* y *Colletotruchum gloeosporioides*.

En este sentido, no se tienen registros de que las antocianinas tengan efecto inhibitorio sobre fitopatógenos bacterianos.

2.3 Generalidades de la fresa

Debido a su gran sabor y aroma, la fresa es un fruto que se consume a nivel mundial, tanto en fresco como procesado en un gran número de productos. Desde la antigüedad, el hombre ha utilizado la fresa silvestre como alimento. Fue en Europa donde se realizaron cruzas de fresa a partir de la proveniente de América introducida por los primeros colonos de Virginia, Estados Unidos, obteniendo así nuevas variedades. Hoy en día, la presencia de fresa en el mercado se mantiene todo el año gracias a invernaderos que ayudan a que su cultivo sea intensivo (González, 2005; Khoshnevisan *et al*., 2013).

Taxonómicamente (Tabla 2), la fresa pertenece la Familia Rosaceae, Subfamilia Rosoideae y género *Fragaria*, que contiene alrededor de 23 especies distribuidas en las zonas templadas del planeta. Cada especie posee frutos con tamaño, color, firmeza, aroma y forma característicos; esto se debe a que presentan poliploidía, es decir, varían en cuanto a su número de cromosomas.

Los cultivos de fresas comerciales presentan poliploidía de hasta 8 copias de genoma (Amil-Ruiz *et al*., 2011).

Tabla 2. Taxonomía de la fresa

Reino	Plantae
Subreino	Embryobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Rosidae
Subclase	Rosonae
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Subfamilia	Rosoideae
Tribu	Potentilleae
Subtribu	Fragariinae
Género	*Fragaria*

Fuente: Vivas, 2012

La planta de fresa (*Fragaria* x *ananassa* Duch.) es dicotiledónea, herbácea, rastrera y perenne que produce brotes nuevos cada año y la temperatura óptima para su cultivo oscila entre 10 y 26 °C (Kessel-Dominí, 2012; Ledesma *et al*., 2008).

Su composición radicular se basa en raíces primarias y secundarias de aspecto fibroso que surgen de la corona, donde se fijan al suelo e incorporan agua y minerales esenciales. Su profundidad depende de las condiciones del suelo y de la presencia de microorganismos patógenos; por lo general, alcanzan de 30 a 40 cm de profundidad, concentrándose la mayor cantidad en los primeros 25 cm del suelo (Álvarez, 2012).

El tallo está acortado y es comúnmente llamado corona, presenta tejido vascular y de él surgen las hojas e inflorescencias; puede llegar a formar coronas secundarias o brotes con raíces llamados estolones. Éstos se forman a partir de yemas auxiliares de las hojas que se encuentran en la base de la corona; son rastreros, delgados, largos llegando a medir hasta 20 cm de longitud y pueden ser usados fácilmente para su propagación (Rosli, 2007; Kessel-Dominí, 2012).

Las hojas son trifoliadas ovaladas y dentadas, de color verde brillante del haz y blancas por el envés con vellosidad. Poseen una nervadura central muy prominente. Tienen una gran cantidad de estomas (300-400 estomas/mm^2), por lo que presentan una elevada tasa de transpiración (Álvarez, 2012).

Las flores aparecen en el ápice y son de color blanco con cinco o seis pétalos y numerosos estambres. Pueden ser perfectas con órganos femeninos (pistilos) y masculinos (estambres) o imperfectas, con solo un tipo de órgano reproductor. Las inflorescencias se encuentran formadas con una flor al extremo de cada eje de manera basal o distal. La diferencia estriba en su número y tamaño; siendo basales cuando hay algunas flores de porte similar, mientras que en las distales hay una sola flor terminal y otras laterales más pequeñas (Álvarez, 2012).

El fruto, caracterizado por su intenso aroma y denominado botánicamente "eterio", es un falso fruto de forma ovoide o subglobosos, jugoso, dulce y con un color rojo brillante, aunque con variaciones que van desde el rosa a naranja y que es comestible; está formado por un engrosamiento del receptáculo floral, siendo los aquenios o semillas, de color amarillo sobre el receptáculo el verdadero fruto. Un fruto mediano puede tener entre 150 y 200 aquenios, pudiendo llegar a poseer hasta 400, en el caso de un fruto de gran tamaño (Rosli, 2007).

2.3.1 Variedades de fresa

Debido a la gran hibridación de la especie, existen más de 1000 variedades en el mundo; cada una con sus características propias como el fotoperiodo, época del año de siembra, producción, morfología, resistencia a plagas y enfermedades, etc. (SAGARPA, 2009; Santoyo & Martínez, 2009). Asimismo, los factores ambientales y genéticos intervienen en la calidad del fruto y en el crecimiento de la planta; la cantidad de agua, luz y las diferencias de temperatura, intervienen en su tamaño. De igual manera, la altitud está relacionada con la cantidad y tamaño de coronas y con el contenido de almidón; este último, siendo almacenado en las raíces y coronas, influye en la propagación de la planta, su almacenamiento y el rendimiento de los frutos (Rodríguez-Bautista *et al.* 2012).

Las variedades de fresa se clasifican en variedades de día corto y en variedades neutrales. En las primeras, los brotes aparecen en invierno, debido a que los días son cortos y las temperaturas descienden, floreciendo en primavera y generando su fruto en dicha estación. Mientras tanto, en

las variedades neutrales no influye tanto la duración del día y producen fruto en las temporadas donde la temperatura se encuentra a 15.5°C de noche (Santoyo & Martínez, 2009).

En México, las variedades más cultivadas son resultado de la reproducción en viveros de la planta madre importada de Estados Unidos; siendo las variedades desarrolladas en la Universidad de Florida (Festival, Sweet Charlie y Galexia) y en la Universidad de California (Camarosa, Albion, Camino Real, San Andreas, Frontera, Diamante, Aromas y Ventana) de las más sembradas debido a su rendimiento y al mercado al que están destinadas (Rodríguez-Ledesma *et al*., 2016).

En Michoacán, las variedades más utilizadas son: Festival, Albion, Camino Real, San Andreas y Frontera (SAGARPA, 2013).

A continuación, se muestran las principales características de las variedades más utilizadas en el estado de Michoacán (Eurosemillas, 2017; Moposita, 2011):

- La variedad Festival es de día corto con frutos de calidad y de buen rendimiento. Su planta tiene buena polinización debido a que sus peciolos son largos; su fruto es de forma cónica con un color externo rojo oscuro y el interno rojo brillante con un tamaño que va de mediano a grande durante la producción.
- La variedad Albion es de día neutro produciendo frutos durante toda la temporada y son de fácil recolección y con excelente vida de anaquel; son simétricos, cónicos, firmes y de color rojo oscuro.
- La variedad Camino Real es de día corto; sus plantas son pequeñas, compactas y fáciles de manejar. Su fruto es grande y de color rojo intenso.
- La variedad San Andreas es de día neutro con poca necesidad de frío en verano y se adapta a cualquier temporada de siembra. Su fruto es muy firme de color rojo medio brillante.
- La variedad Frontera es de día corto; sus plantas son grandes y vigorosas y su fruto es de alta calidad gustativa con color rojo intenso brillante.

La Norma Mexicana NMX-FF-062-1987, describe la calidad de fruto de fresa, los factores que la determinan se definen por el contenido de azúcar y acidez en los frutos, apariencia, sabor,

brillo, grado de madurez y ausencia de daños; así como el color, tamaño y firmeza del fruto, siendo éstos los más importantes (Martínez-Bolaños *et al*., 2008).

2.3.2 Producción de fresa

La fresa es uno de los frutos más distribuidos y preferidos en el planeta por su sabor y propiedades, aprovechándose industrialmente para la fabricación de distintos productos. De esta manera, se cultiva en grandes cantidades con el fin de su comercialización, haciéndose presente en prácticamente todo el mundo, con remesas importantes. Su difusión mundial se debe al gran número de variedades existentes que se adaptan al medio y a las novedosas técnicas para su cultivo y manejo, por lo que se produce desde las zonas tropicales y subtropicales hasta zonas frías (González, 2005; Khoshnevisan *et al*., 2013).

En el año 2014, el principal productor de fresa fue China con 3,113,000 Ton, seguidos por Estados Unidos y México con 1,371,573 Ton y 458,972 Ton, respectivamente (FAOSTAT, 2014).

2.3.3 Importancia económica en México

La producción de fresa en México ha ido creciendo en los últimas cuatro décadas en México (León-López *et al*., 2014), generando 15,000 empleos directos y 4,500 indirectos a lo largo de la cadena agroindustrial. El país aumentó su producción anual en un 12.7% entre 2008 y 2013 debido a que la superficie dedicada a la fresa creció en ese periodo 40%. Asimismo, se han incrementado las exportaciones en 10.5% anual llegando a 16 países del mundo, correspondiendo el 63% de las exportaciones a fresa fresca, el 35% a fresa congelada y el 2% a conservas y preparados; siendo el primer destinatario Estados Unidos con un 96% de la producción a exportar, seguido por Canadá con el 2%, sobre todo en el periodo invernal. Del mismo modo, México importa cerca de 20,000 Ton de Estados Unidos (FND, 2015).

El principal productor de fresa en México en el 2015 fue el estado de Michoacán con 253,536.55 Ton, correspondiendo cerca del 70% de la producción nacional en 2015; los siguientes Estados productores son Baja California y Guanajuato con 82,607.73 y 28,568.20 Ton, respectivamente (SIAP, 2015).

El producto fresa en Michoacán, resulta de gran importancia a nivel nacional no sólo por su volumen de producción sino también por la generación de empleos y divisas por concepto de exportación. En Michoacán, los municipios de Zamora, Tangancícuaro y Jacona fueron los principales productores de fresa en el año 2015 con 74,925 Ton, 57,820 Ton y 38,080 Ton, respectivamente (SIAP, 2015).

Regiones como el Valle de Zamora y Baja California se han especializado en el mercado de exportación, mientras que Irapuato y parte de Jalisco venden casi toda su producción en el mercado nacional (ImagenAgropecuaria, 2014).

2.3.4 Propiedades nutricionales y medicinales

Los frutos de fresa poseen poder antioxidante por su contenido de ácidos orgánicos como oxálico, málico, ácido cítrico y salicílico; son ricos en minerales como fósforo, calcio, hierro y potasio, favoreciendo la transmisión y generación de impulsos nerviosos; contienen fibra y fructosa que mejoran el tránsito intestinal y regulan la digestión; destacan por su alto contenido de vitamina C que favorece las defensas del organismo y participa en la formación de huesos, dientes, colágeno y glóbulos rojos, facilitando la absorción del hierro de los alimentos (Tabla 3) (Kessel-Dominí, 2012).

Tabla 3. Composición química de frutos de fresas por cada 100 g

Valor energético	40 Kcal
Proteínas	0.9 gr
Grasas	0.5 gr
Carbohidratos	13 gr
Calcio	21 mg
Fósforo	21 mg
Potasio	164 mg
Ácido fólico	0.07 mg
Sodio	1 mg
Hierro	1 mg
Vitamina A	100 U. I.

Vitamina B1	0.03 mg
Vitamina B2	0.97 mg
Vitamina B5	0.9 mg
Vitamina C	90 mg

Fuente: Vivas, 2012.

2.3.5 Antocianinas en fresa

Los compuestos bioactivos contenidos en las fresas están principalmente relacionados con los flavonoides, siendo las antocianinas las más abundantes. Se ha reportado que su contenido de antocianinas totales va desde los 150 a 800 mg de cianidina 3-glucósido Kg^{-1} de fruto fresco. Alrededor de 25 antocianinas en fresas de diferentes variedades han sido identificadas, siendo las más comunes la pelargonidina-3-glucósido y la cianidina-3-glucósido. Asimismo, la glucosa es el azúcar más común presente en las antocianinas de fresa, aunque, también se encuentra la rutinosa, arabinosa, ramnosa y conjugados (Giampieri *et al.*, 2012).

2.4 Enfermedades causadas por fitopatógenos

La agricultura actual se ve afectada por distintas plagas y enfermedades que atacan a los cultivos en su estado de pre y post-cosecha con consecuencias en su producción y costo (Serrano & Galindo, 2007). Asimismo, en lugares donde escasea el alimento, las enfermedades en las plantas repercuten en la nutrición de las personas y en su economía, pues, al haber poco alimento, aumenta su costo y menor es la cantidad consumida por la población más vulnerable provocando daños a la salud (Agrios, 2005).

Existen múltiples factores que provocan enfermedades en las plantas. Pueden generarse debido a agentes no infecciosos como el estrés ambiental, la falta de nutrimentos y la toxicidad química, o por microorganismos fitopatógenos como los hongos, virus, nematodos, micoplasmas y bacterias. Éstos pueden alterar el metabolismo en las células vegetales para la absorción de sus nutrientes e, incluso, algunos llegan a bloquear el paso de nutrimentos a toda la planta debido a su multiplicación en los tejidos del floema y xilema ocasionando la muerte (Agrios, 2005).

2.5 Bacterias

Son microorganismos unicelulares que miden regularmente desde 0.5 a 2 µm, pero hay algunas que llegan a medir hasta 10 µm. Pertenecen al reino de los procariotas, es decir, carecen de un núcleo definido; su forma la define la pared celular que puede ser de una sola capa o dos capas; está compuesta por peptidoglicanos y envuelta por un glicocalix que la protege del medio. De acuerdo a su forma, se clasifican en cocos, bacilos y espirilos (Pírez & Mota, 2006).

Otra manera de clasificarlas es por su coloración luego de aplicar la tinción Gram que las clasifica en Gram positivas y Gram negativas, tiñéndose de color azul y de color rosa, respectivamente. La distinta coloración se debe a la composición de la pared celular, pues las Gram positivas contienen ácido teicoico y una sola membrana, mientras que las Gram negativas contienen lipoproteínas y doble membrana. Gran parte del grupo de bacterias fitopatógenas son Gram negativas, cuya clasificación está en el Phylum *Proteobacteria*; mientras que, las Gram positivas, pertenecen al Phylum *Actinobacteria* (Pírez & Mota, 2006).

Algunas bacterias cuentan con ápices como flagelo, fimbrias y pilis cuya función es de movilidad o estancamiento. Poseen una membrana citoplasmática compuesta por una bicapa de fosfolípidos, proteínas y haponoides que protegen o intercambian sustancias. En su protoplasma se encuentran un citoplasma soluble, ribosomas, mesosomas, vacuolas y un nucleoide donde se está el ADN en un cromosoma de forma circular y cerrado al momento de la reproducción. Dicho proceso se ejerce por fisión binaria, siendo exponencial su crecimiento y logrando mantener el material genético de la primer célula (Molina & Uribarren, 2015).

Las bacterias son los organismos más abundantes en el mundo. Se distribuyen en todo hábitat logrando sobrevivir en condiciones extremas. Según Vinuesa (2010), se estima que hay 40 millones de individuos bacterianos en un gramo de suelo y un millón en un mililitro de agua dulce. En total, se calcula que hay 5×10^{30} bacterias en el mundo, aproximadamente.

Algunas bacterias son de vital importancia para los ciclos biogeoquímicos participando como descomponedoras de materia orgánica y reciclaje de elementos. Las bacterias que se encuentran habitando un organismo pueden ser inofensivas para el mismo e, incluso, en muchos casos, beneficiosas; sin embargo, existen otras que son patógenas, las cuáles causan diversas

enfermedades infecciosas y hasta mortales cuando su población aumenta considerablemente en dicho organismo (Vinuesa, 2010).

En específico, las bacterias fitopatógenas, colonizan a las plantas conforme éstas van madurando. Las poblaciones grandes pueden verse a simple vista como gotas, películas o suspensiones viscosas que tapan los vasos de las plantas. Su crecimiento poblacional depende de que el hospedero contenga los nutrimentos necesarios para su reproducción, ya que no pueden producir su energía (Agrios, 2005).

Las bacterias tienen distintos mecanismos de acción patógena sobre las plantas como lo son la producción de fitohormonas, fitotoxinas, exoenzimas, sideróforos, proteínas nucleadoras de hierro y exopolisacáridos, entre otros (Jacas *et al.*, 2005). Por lo general, la infección es pasiva, es decir, accidental. Pueden entrar a través de los estomas, lenticelas o hidatodos, pero también lo hacen por aberturas de heridas en tallos, hojas o raíces o a través de insectos fitófagos; igualmente, pueden diseminarse en las semillas y en materiales de propagación (Vidaver & Lambrecht, 2004).

Las funciones de virulencia de la bacteria sólo se activan cuando las bacterias alcanzan un umbral de población determinado que se detecta por medio de unas señales químicas denominadas autoinductores. De esta manera, los genes responsables de la activación de factores de virulencia están regulados por el tamaño de la población (Jacas *et al*., 2005). Dichos factores son muy importantes antes de que la planta tenga una respuesta que limite el crecimiento de las bacterias; por ello, el éxito o fracaso de colonización de la bacteria depende de las condiciones del medio en que se encuentra (Ventura, 2007).

Los síntomas en las plantas por la infección de fitopatógenos depende de su interacción y del estado fenológico y fisiológico de la planta. Se pueden agrupar de manera general, en agallas, roñas o costras, marchitamiento, manchas foliares o en frutos, chancros y podredumbres blandas (Bajpai *et al*., 2011).

Los géneros principales de bacterias fitopatógenas que atacan a los cultivos son: *Pseudomonas, Ralstonia, Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Erwinia, Xyllela, Dickeya y Clavibacter* (Mansfield *et al*., 2012). Según datos de la Agenda Nacional de Investigación, Innovación y Transferencia

de Tecnología para el Desarrollo Rural Sustentable, los géneros de *Pseudomonas* y *Xanthomonas* son los más comunes que atacan a los cultivos en Michoacán (SNITT, 2016).

2.5.1 *Pseudomonas syringae*

Importancia y distribución

El género *Pseudomonas* es el grupo de bacterias más diverso del planeta, encontrándose en gran variedad de ambientes y sustratos, presentando gran adaptabilidad genética y fisiológica. Esta capacidad provoca que se presenten diferencias dentro de la misma especie llegando a manifestar patogenicidad, muchas conocidas como patovares. La mayoría de las bacterias de este género infectan a plantas, aunque también pueden infectar animales y humanos como patógenos oportunistas (Slabbinck *et al*., 2010).

Pseudomonas syringae es una de las bacterias de este género que contiene 60 patovares específicos que causan daños económicos importantes en una amplia gama de cultivos como el tomate, tabaco, frijol, pepino, cebolla y papa, por mencionar algunos ejemplos (Young, 2010).

Características morfológicas y taxonomía

Las *Pseudomonas syringae* son bacterias Gram negativas con forma de bastoncillo, aeróbicas, no forman esporas, móviles con uno o dos flagelos polares. Miden entre 0.5 y 5 µm de diámetro por 1.5 y 5 µm de longitud (Oyoque, 2008).

La clasificación taxonómica de *Pseudomonas syringae*, de acuerdo a Slabbinck *et al.* (2010), se describe a continuación:

Dominio: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Pseudomonadales

Familia: *Pseudomonaceae*

Género: *Pseudomonas*

Especie: *Pseudomonas syringae*

Ciclo de la enfermedad y síntomas

La bacteria puede estar en las raíces o en el follaje de plantas cultivadas o de malezas, entrando por los estomas o heridas de la planta; las semillas infectadas también pueden ser fuente de contaminación que se disemina por el riego. Su desarrollo se ve favorecido por temperaturas alrededor de 20°C y por ambientes húmedos entre el 80-90%. De presentarse dichas condiciones, la bacteria es altamente contagiosa pudiéndose desarrollar a 24 horas. Puede sobrevivir en restos de plantas infectadas luego de la cosecha, hasta que encuentra un nuevo hospedero que presente los medios necesarios para su multiplicación (Fanelli *et al*., 2007). Ocasiona la enfermedad llamada peca bacteriana. Sus síntomas pueden estar sujetos a mecanismos por los cuales el patógeno interfiere en el metabolismo, morfología y fisiología de la planta. De igual manera, los síntomas son variados dependiendo de la subespecie de que se trate; sin embargo, por lo general, se presenta marchitamiento, clorosis y necrosis (Bultreys & Kaluzna, 2010).

Puede afectar cualquier parte de la planta, pero es más evidente en follaje, tallo y frutos. En su etapa inicial aparecen manchas acuosas y pequeñas con halo amarillo que pronto se expanden y se vuelven necróticas juntándose con otras formando lesiones más grandes. Sobre los tallos las lesiones son de color café pero sin halo amarillo; mientras que en los frutos sí presentan halo y, además, hundimiento. Esto provoca que el fruto sea inadecuado para el mercado (Fanelli *et al*., 2007).

2.5.2 *Xanthomonas vesicatoria*

Importancia y distribución

El género *Xanthomonas* es un grupo de bacterias que ataca a una gran variedad de cultivos de importancia económica como el arroz, algodón, tomate, pimiento, frijol y cítricos, entre otros, presentando gran especificidad en sus huéspedes (Bajpai *et al*., 2011). Dentro de este género, la especie de *Xanthomonas vesicatoria* afecta a hortalizas como el pimiento y el tomate, manifestándose tanto en plántulas como en plantas adultas, provocando la enfermedad

denominada como la mancha bacteriana ocasionando grandes pérdidas de producción (Abd-Alla & Bashandy, 2008).

Las condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad se presentan en zonas de clima frío con temperaturas entre 17 y 24 ºC con humedad relativa alta. Asimismo, la bacteria puede sobrevivir en las semillas hasta por diez años (FAO, 2003).

Características morfológicas y taxonomía

Es una bacteria Gram negativa con forma de bacilo cuya medida es de 0.6 x 1.0-1.5 µm; tiene un flagelo polar y es aerobia obligada. Las colonias bacterianas son de color amarillo en medio artificial debido un pigmento que las protege contra la oxidación llamado xanthomonadina (Francisco-Francisco *et al*., 2013).

La clasificación taxonómica de *Xanthomonas vesicatoria* es la siguiente (Francisco-Francisco *et al*., 2013):

Dominio: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Xanthomonadales

Familia: *Xanthomonadaceae*

Género: *Xanthomonas*

Especie: *Xanthomonas vesicatoria*, (Doidge) Dowson

Ciclo de la enfermedad y síntomas

La enfermedad es transmitida desde las semillas que están infectadas. Los síntomas que causa en las plántulas son manchas negras y húmedas en hojas. Cuando la planta logra desarrollarse, los síntomas se encuentran en el tallo, hojas y frutos, siendo el follaje más infectado a comparación del tallo (FAO, 2003).

Por el haz de las hojas se manifiestan manchas necróticas irregulares rodeadas por un halo amarillento grasiento y, por el envés, tienen apariencia húmeda. Las lesiones son más numerosas en la punta de las hojas y suelen ser más severas cuando hay condiciones de humedad constante, provocando que caigan prematuramente (Martínez-González, 2006).

Cuando la enfermedad llega a los verticilos florales, causa desprendimiento de las inflorescencias (Carrillo-Fasio *et al.*, 2001a). Mientras tanto, en los frutos que logran desarrollarse, aparecen halos cloróticos en la región adyacente al pedúnculo. Los frutos verdes quedan inutilizables para el consumo debido a la deformación de éstos al presentarse pequeñas pústulas que lo agrietan, dejándolo expuesto a la entrada de otros fitopatógenos (Ritchie, 2000).

Por todo lo anterior, se propone a las antocianinas de frutos de fresa como una posible alternativa para el biocontrol de las bacterias fitopatógenas P*seudomonas syringae* y *Xanthomonas vesicatoria.*

III OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de antocianinas de fresa contra bacterias fitopatógenas.

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar *in vitro* los extractos totales de antocianinas de cinco variedades de fresa contra *Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas vesicatoria.*
- Separar los compuestos antociánicos de los extractos por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC).
- Detectar los compuestos activos de mayor actividad por bioautografía.

IV HIPÓTESIS

Las antocianinas de fresa controlan el crecimiento *in vitro* de *Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas vesicatoria.*

V MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

Para la obtención de los extractos antociánicos, se utilizaron frutos de fresa de las variedades Albion, Festival, Camino Real, San Andreas y Frontera cultivados en un invernadero de Zamora, Michoacán. Los frutos se cosecharon en un grado de maduración 5 según la Norma Mexicana NMX-FF-062-SCFI-2002.

Las bacterias fitopatógenas evaluadas fueron: una cepa de *Pseudomonas syringae* perteneciente al cepario del CIIDIR IPN Unidad Michoacán, y *Xanthomonas vesicatoria* perteneciente al cepario del Laboratorio del CUCBA, Guadalajara. Las cepas se mantuvieron en agar B de King (KB) (anexo 1) y en agar nutritivo (BIOXON, Nueva Jersey, EUA) (anexo 2), respectivamente, a 24 °C bajo resiembras continuas de 30 días.

5.2 Extracción y cuantificación de antocianinas totales

La extracción y cuantificación de antocianinas totales a partir de fruto fresco de fresa se realizó siguiendo la técnica descrita por Abdel-Aal & Hucl (1999), la cual consistió en tomar 1 g de muestra y 5 mL de etanol acidificado (etanol (MEYER, CDMX, México) y HCl (Fermont, Monterrey, México) 1N; 85:15 v/v) para su posterior maceración en un mortero. Se agitaron las soluciones vigorosamente en un vórtex (Scientific Industries, Nueva York, EUA, modelo Vortex-Genie 2) y se ajustó el pH a 1 con ácido clorhídrico al 1N utilizando un potenciómetro (HANNA Instruments, Guadalajara, México, modelo HI 2211 pH/ORP meter) y se continuó la extracción en un agitador orbital digital (Sea Star, Navarra, España, modelo HS) a 250 rpm durante 16 h a 16 °C. Transcurrido este tiempo, los extractos se centrifugaron a 6,000 rpm por 15 min en una centrífuga (Thermo Cientific, Massachusetts, EUA, modelo Haraeus Mefague 8) para recuperar el sobrenadante, el cual fue filtrado al vacío utilizando papel Whatman grado 1.

Para determinar la concentración de antocianinas totales en los extractos, se leyó su absorbancia a 535 nm en el espectrofotómetro UV/VIS (Perkin Elmer, Massachusetts, EUA, modelo Lamda 2) utilizando como blanco etanol acidificado.

Finalmente, se eliminó el disolvente de la muestra usando un evaporador (Biotage, North Carolina, USA, modelo TurboVap LV). Para ello, se colocaron, por cada variedad, 5 tubos de vidrio con 10 mL del extracto correspondiente a una presión de 15 mbar y a una temperatura de 45 °C durante 60 min.

Para la cuantificación se utilizó cianidina 3-glucósido como estándar. La concentración de antocianinas totales se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\mathbf{C = (A/E) \times (vol/1{,}000) \times MW \times (1/peso\ de\ la\ muestra) \times 10^6}$$

Dónde:

C= concentración total de antocianinas (mg de cianidina 3-glucósido Kg^{-1} de fruto fresco)

A= absorbancia a 535 nm

ε= absortividad molar de la cianidina 3-glucósido = 25,965 cm^{-1} M^{-1}

Vol= volumen total del extracto de antocianinas en mL

MW= peso molecular de la cianidina 3-glucósido = 449 uam

5.3 Ensayos de inhibición *in vitro*

Los ensayos de inhibición *in vitro* de bacterias fitopatógenas por antocianinas totales de frutos de fresa se realizaron siguiendo el método de difusión en disco para pruebas de sensibilidad a antimicrobianos, descrito por Hafidh *et al*., (2011) bajo condiciones estériles en una campana de flujo laminar.

Como tratamientos (Tabla 4) se utilizaron concentraciones de 500, 1000 y la concentración máxima de extracción lograda (mg de cianidina 3-glucósido Kg^{-1} de fruto freso) de cada una de las variedades disueltas en agua bidestilada estéril. Cabe señalar que los tratamientos de concentración máxima de extracción fueron considerados debido a que no se contó con más material biológico para ajustar dosis más altas en los ensayos. Asimismo, se tuvieron como controles agua y etanol acidificado (etanol y HCl 1N; 85:15 v/v). De igual manera, se utilizó el bactericida agrícola comercial Cuprimicin 17 (Adama; CDMX., México) cuyo ingrediente activo es sulfato de estreptomicina (0.085 mg 100 mL^{-1}). Cabe aclarar que, para la prueba, se

aplicó una dosis 10 veces superior a la recomendada por el fabricante, es decir, 0.85 mg 100 mL^{-1}, debido a que, en pruebas previas, no se tenía una inhibición significativa para comparar con el resto de los tratamientos. Adicionalmente, se utilizó gentamicina en solución (160 mg 2 mL^{-1}) Genrex I.U., (RAYERE; CDMX, México) como control positivo. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

Tabla 4. Tratamientos utilizados en los ensayos de inhibición *in vitro*.

Tratamiento	**Clave**
Agua destilada estéril	Agua
Etanol acidificado (etanol y HCl 1N; 85:15 v/v)	Etanol acidificado
Bactericida agrícola Estreptomicina (0.85 mg 100 mL^{-1})	Estreptomicina
Gentamicina en solución inyectable (160 mg 2 mL^{-1})	Gentamicina
Extracto de variedad Albion a una concentración de 500, 1000 y la concentración máxima de extracción lograda (cianidina 3-glucósido Kg^{-1} de fruto fresco)	Albion 500, Albion 1000, Albion Máxima Concentración
Extracto de variedad Festival a una concentración de 500, 1000 y la concentración máxima de extracción lograda (cianidina 3-glucósido Kg^{-1} de fruto fresco)	Festival 500, Festival 1000, Festival Máxima Concentración
Extracto de variedad Camino Real a una concentración de 500, 1000 y la concentración máxima de extracción lograda (cianidina 3-glucósido Kg^{-1} de fruto fresco)	Camino 500, Camino 1000, Camino Máxima Concentración
Extracto de variedad San Andreas a una concentración de 500, 1000 y la concentración máxima de extracción lograda (cianidina 3-glucósido Kg^{-1} de fruto fresco)	San Andreas 500, San Andreas 1000, San Andreas Máxima Concentración
Extracto de variedad Frontera a una concentración de 500, 1000 y la concentración máxima de extracción lograda (cianidina 3-glucósido Kg^{-1} de fruto fresco)	Frontera 500, Frontera 1000, Frontera Máxima Concentración

En la prueba de difusión en disco, utilizando una varilla de vidrio estéril, se distribuyeron uniformemente 100 µL de cada suspensión bacteriana a una densidad de $1x10^8$ UFC sobre la superficie de una caja Petri de 5 cm de diámetro con agar nutritivo para *X. vesicatoria*

(BIOXON, Nueva Jersey, EUA) o agar KB para *P. syringae*. Posteriormente, se colocó en el centro de la superficie de la placa un disco estéril de 10 mm de diámetro de papel Whatman grado 1, al cual se le agregaron 70 µL del tratamiento correspondiente.

Las placas se dejaron en incubación durante 72 h a 24 °C. Transcurrido el tiempo, con ayuda de un vernier digital (Stainless hardened), se midió el diámetro del halo de inhibición de los tratamientos.

El porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente fórmula:

% de inhibición = (DI/DC)*100

Donde:

DI = Diámetro de inhibición

DC = Diámetro de la caja

5.4 Cromatografía líquida en capa fina de alta resolución de los extractos antociánicos

La separación de los compuestos presentes en los extractos antociánicos totales se llevó a cabo por la técnica de cromatografía líquida en capa fina de alta resolución (HPTLC) en un equipo automatizado CAMAG con el software VisionCats en su versión 2.1, siguiendo la técnica de Cretu & Morlock (2014). Para ello, se utilizaron placas de HPTLC de sílice G 60 F_{254} de 20x10 cm (Merck, Misuri, EUA); éstas fueron prelavadas con metanol (grado ACS, Fermont, Monterrey, México) y secadas en un calentador de placas de TLC (CAMAG, Muttenz, Switzerland) a 120 °C durante 15 min. Luego de esto, las placas se cubrieron con papel aluminio y se dejaron enfriar a temperatura ambiente dentro de un desecador con peróxido de fósforo (≥99%, Sigma–Aldrich).

Se colocaron 2 mL de cada uno de los extractos antociánicos concentrados a 1,000 mg de cianidina 3-glucósido Kg^{-1} de fruto fresco en viales color ámbar, respectivamente (un vial por cada variedad), los cuales fueron rociados en la placa a modo de banda de 8 mm de longitud con una jeringa de 25 µL usando el automatic TLC Sampler 4 (ATS 4, CAMAG, Muttenz Switzerland) a una velocidad de 150 nL s^{-1}. Se aplicaron 18 pistas en la placa de HPTLC de

20x10 cm a una distancia de 10 mm entre cada pista; la distancia desde el borde inferior fue de 8 mm y desde el lado izquierdo de la placa fue de 15 mm.

El desarrollo se realizó en el Automated Developing Chamber 2 (ADC 2, CAMAG) con una mezcla de acetato de etilo (Merck), 2-butanone (Baker Analyzed), agua bidestilada (producida por el sistema de purificación de agua por ósmosis inversa MILLPORE, modelo ELIX) y ácido fórmico (Baker Analyzed) (7:3:0.8:1.2, v/v/v/v) para la separación de antocianinas.

La actividad de la placa se ajustó una humedad relativa de 47 ± 2% por 5 min usando una solución saturada de tiocianato de potasio (260 g 100 g^{-1} de agua) en la unidad de control de humedad. La distancia de migración fue de 70 mm desde el borde inferior de la placa. Luego del desarrollo, la placa fue secada automáticamente en una corriente de aire frío durante 5 min.

Por último, las imágenes fueron registradas de forma digital usando el sistema de documentación Visualizer equipado con una cámara digital CCD de 12 bits de alta resolución (CAMAG).

5.5 Bioautografía directa de antocianinas contra *X. vesicatoria* y *P. syringae*

Para determinar los compuestos responsables de la inhibición, se realizó una bioautografía directa sobre la placa desarrollada para la bacteria correspondiente por medio de la técnica de Jesionek *et al*. (2015) modificada. Para ello, se separaron los compuestos presentes en los extractos antociánicos de cada una de las variedades por el método de HPTLC siguiendo la técnica anteriormente descrita bajo las mismas condiciones y sistema de solventes omitiendo el prelavado.

Se desarrollaron dos placas HPTLC de sílice G 60 F_{254} de 10x10 cm (Merck, Misuri, EUA) aplicando 5 pistas de 8 mm de longitud separadas a una distancia de 17 mm entre cada pista; la distancia desde el borde inferior fue de 8 mm y desde el lado izquierdo de la placa fue de 16 mm. Las placas se dejaron secar en un horno de secado marca (Terlab, Guadalajara, México) a 37 °C durante 7 d con el fin de eliminar el solvente.

Transcurrido el tiempo y bajo condiciones estériles, las placas se sumergieron por 10 seg en 200 mL de suspensión bacteriana (caldo nutritivo para *X. vesicatoria* y caldo KB para *P. syringae*) a una concentración de $1x10^{10}$ UFC mL^{-1} para luego ser colocadas en cajas de plástico estériles

de 20x20x10 cm a las cuáles se les puso, previamente, algodón húmedo en la base. Las cajas se taparon cuidadosamente incubándolas en un horno de secado (Terlab, Guadalajara, México) a 37 °C durante 24 h.

Posteriormente, las placas fueron asperjadas con una solución acuosa de 2-Aminoetil difenilborinato (MTT) (Merck, Misuri, EUA) (0.05 g 90 mL^{-1}) dejándolas incubar a 37 °C durante 2 h en un horno de secado (Terlab, Guadalajara, México).

Los bioautogramas fueron documentados inmediatamente después de la incubación y aplicación del MTT empleando el sistema Visualizer (CAMAG). La prueba de bioautografía directa se realizó por triplicado.

5.6 Análisis estadístico

A los resultados obtenidos de los porcentajes de inhibición bacteriana, cuantificación de antocianinas y bioautogramas se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para la separación de medias, utilizando el programa SAS® versión 9.0.

VI RESULTADOS

6.1 Contenido de antocianinas totales en frutos de fresa

El contenido de antocianinas totales en frutos de las cinco variedades de fresa estudiadas, se muestran en la Tabla 5, destacándose la variedad Frontera como la que posee una mayor cantidad de antocianinas totales (mg como cianidina 3-glucósido), seguida por Albion, Camino Real, Festival y San Andreas.

Tabla 5. Contenido de antocianinas totales de frutos de cinco variedades de *Fragaria* x *ananassa* Duch.

VARIEDAD	CONCENTRACIÓN (mg como cianidina 3-glucósido Kg^{-1} de fruto fresco)	
Albion	321.64±1.90	B
Festival	204.05±1.56	D
Camino Real	287.05±1.55	C
San Andreas	190.21±2.42	E
Frontera	366.61±1.73	A

Se presentan las medias seguidas de la desviación estándar. Letras diferentes dentro de la columna indican diferencias significativas basadas en la prueba de Tukey ($P<0.05$, $N=3$).

Luego de concentrar los extractos antociánicos, se obtuvieron 15 mL de cada una de las variedades evaluadas y, se procedió a determinar su concentración nuevamente. Los resultados obtenidos de la concentración máxima lograda de antocianinas totales (mg como cianidina 3-glucósido) se encuentran en la Tabla 6, donde la variedad que mayor contenido obtuvo fue Festival, seguido de Frontera, Camino Real, Albion y San Andreas.

Tabla 6. Concentración máxima de antocianinas totales de frutos de cinco variedades de *Fragaria* x *ananassa* Duch.

VARIEDAD	CONCENTRACIÓN (mg como cianidina 3-glucósido Kg^{-1} de fruto fresco)	
Albion	1627.59±2.52	D
Festival	2412.30±4.5	A
Camino Real	1720.60±3.11	C
San Andreas	1193.18±4.15	E
Frontera	2282.61±2.42	B

Se presentan las medias seguidas de la desviación estándar. Letras diferentes dentro de la columna indican diferencias significativas basadas en la prueba de Tukey ($P<0.05$, $N=3$).

6.2 Ensayos de inhibición *in vitro* de bacterias fitopatógenas con extractos antociánicos de frutos de fresa

A continuación, se presentan las gráficas de los resultados del efecto de los tratamientos aplicados sobre el crecimiento de las bacterias fitopatógenas *X. vesicatoria* y *P. syringae*.

6.2.1 Inhibición bacteriana de los extractos antociánicos contra *X. vesicatoria*

En relación a la inhibición de *X. vesicatoria* por la variedad Albion (Figura 4), se observó que el tratamiento de Albion 500 logró igualar la inhibición conseguida por Estreptomicina, mientras que el tratamiento de Albion 1000 la superó significativamente en >15 %. Asimismo, el tratamiento Gentamicina superó significativamente a Albion 1000 en >16 %; sin embargo, su efecto fue igualado por la máxima dosis de antocianinas lograda 1627.59 mg al concentrar el extracto antociánico disponible.

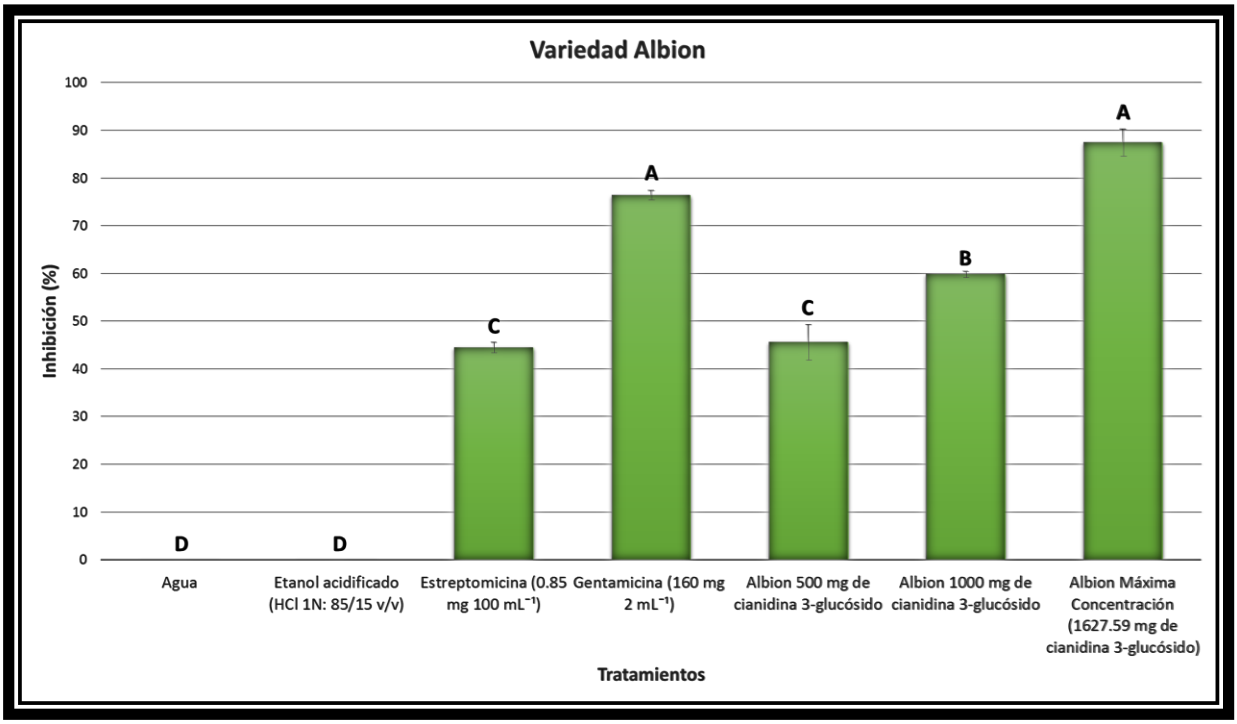


Figura 4. Inhibición de *X. vesicatoria* por extractos antociánicos de frutos de *Fragaria* x *ananassa* Duch. variedad Albion.

Por otro lado, los tratamientos Festival 500 y Festival 1000 igualaron el porcentaje de inhibición obtenido con Estreptomicina, pero ésta última fue superada significativamente (>47 %) por el tratamiento de Festival Máxima Concentración (Figura 5).

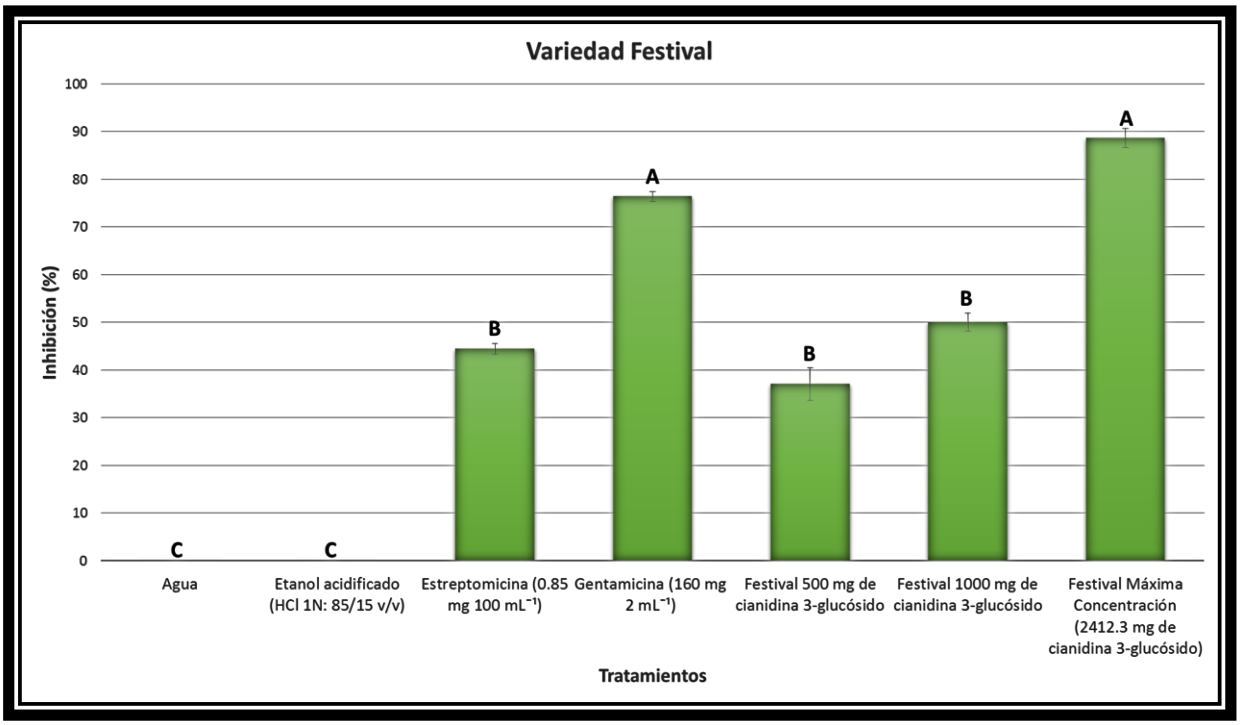


Figura 5. Inhibición de *X. vesicatoria* por extractos antociánicos de frutos de *Fragaria* x *ananassa* Duch. variedad Festival.

Los tratamientos Camino 500 y Camino 1000 siguieron el mismo comportamiento que los correspondientes a la variedad Festival, igualando el porcentaje de inhibición de *X. vesicatoria* obtenido con Estreptomicina, mientras que el tratamiento con Camino Máxima Concentración fue significativamente superior a este (>20 %) y tuvo el mismo efecto inhibitorio que la Gentamicina (Figura 6).

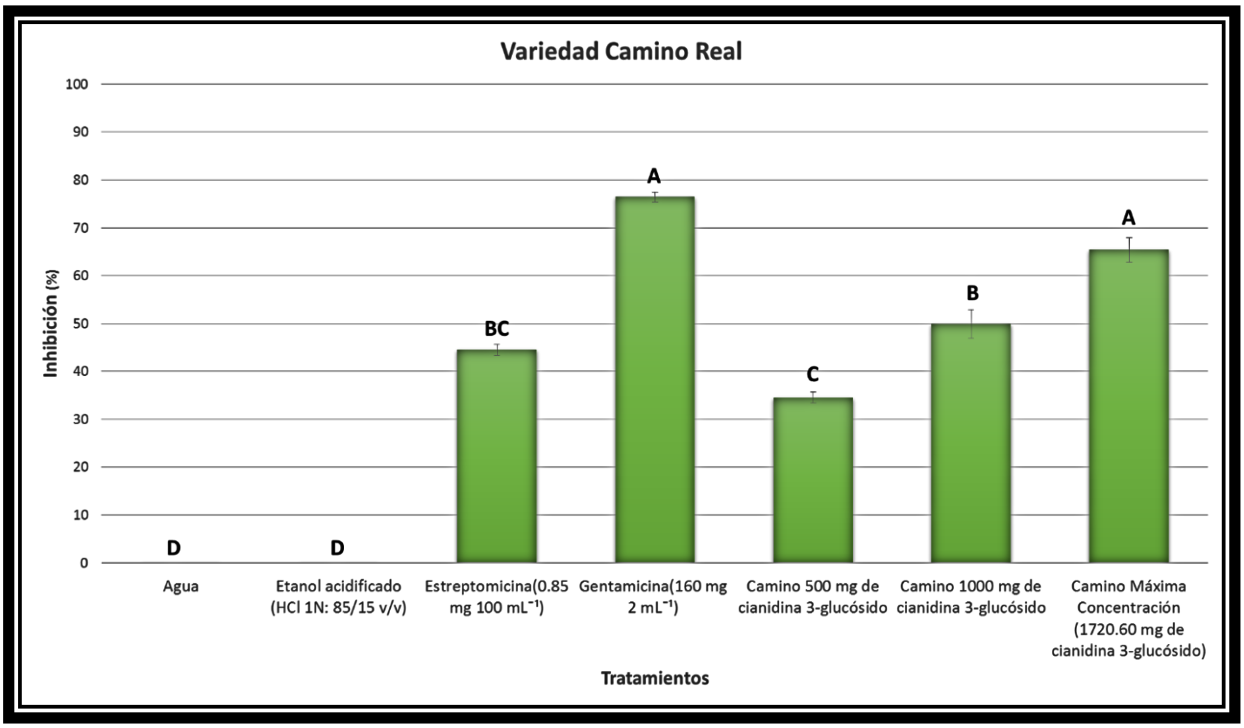


Figura 6. Inhibición de *X. vesicatoria* por extractos antociánicos de frutos de *Fragaria* x *ananassa* Duch. variedad Camino Real.

Los resultados de inhibición de *X. vesicatoria* por los extractos de variedad San Andreas se muestran en la Figura 7. El tratamiento San Andreas 500 igualó el porcentaje de inhibición de logrado por Estreptomicina. Mientras que los tratamientos San Andreas 1000 y San Andreas Máxima Concentración fueron significativamente mayores que el de Estreptomicina, entre 17 y 18 %, respectivamente; por su parte, el tratamiento con Gentamicina superó significativamente, entre 13 y 14 %, a estos últimos.

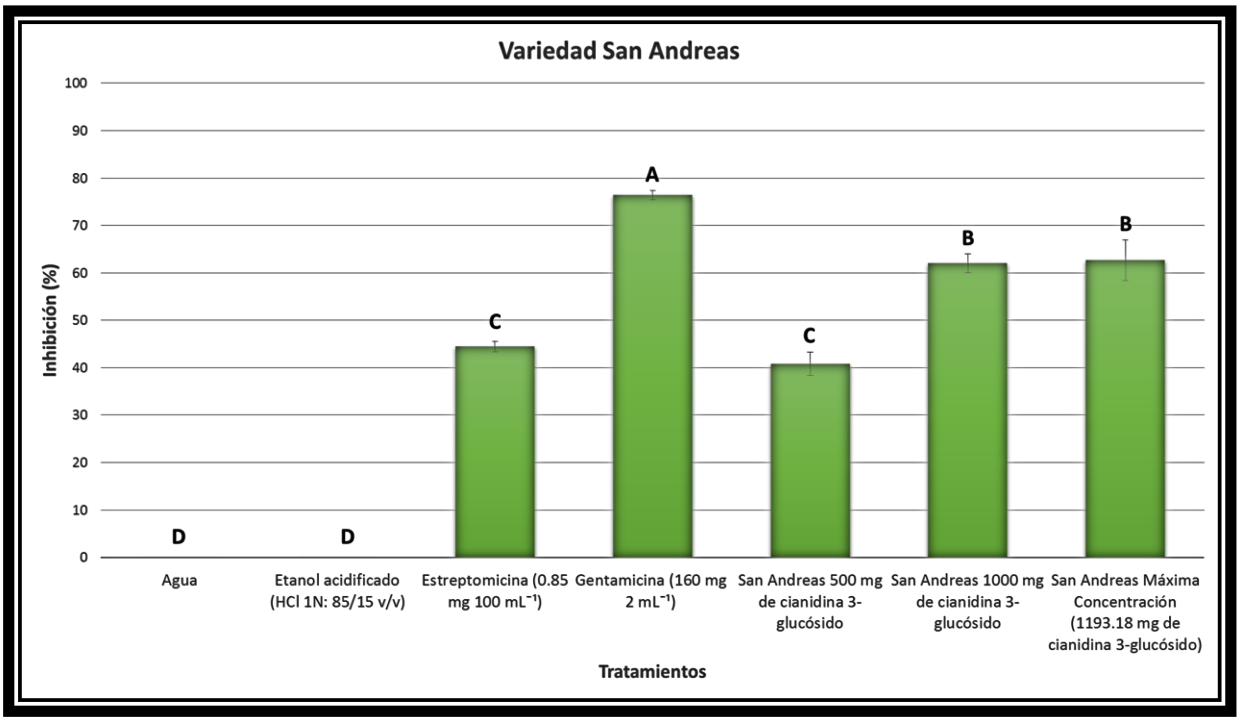


Figura 7. Inhibición de *X. vesicatoria* por extractos antociánicos de frutos de *Fragaria* x *ananassa* Duch. variedad San Andreas.

Los tratamientos Frontera 500 y Frontera 1000, tuvieron el mismo efecto sobre el porcentaje de inhibición de *X. vesicatoria* que la Estreptomicina, mientras que el tratamiento con Frontera Máxima Concentración fue significativamente mayor que el de la Estreptomicina y Gentamicina (>49 % y >17 %, respectivamente) (Figura 8).

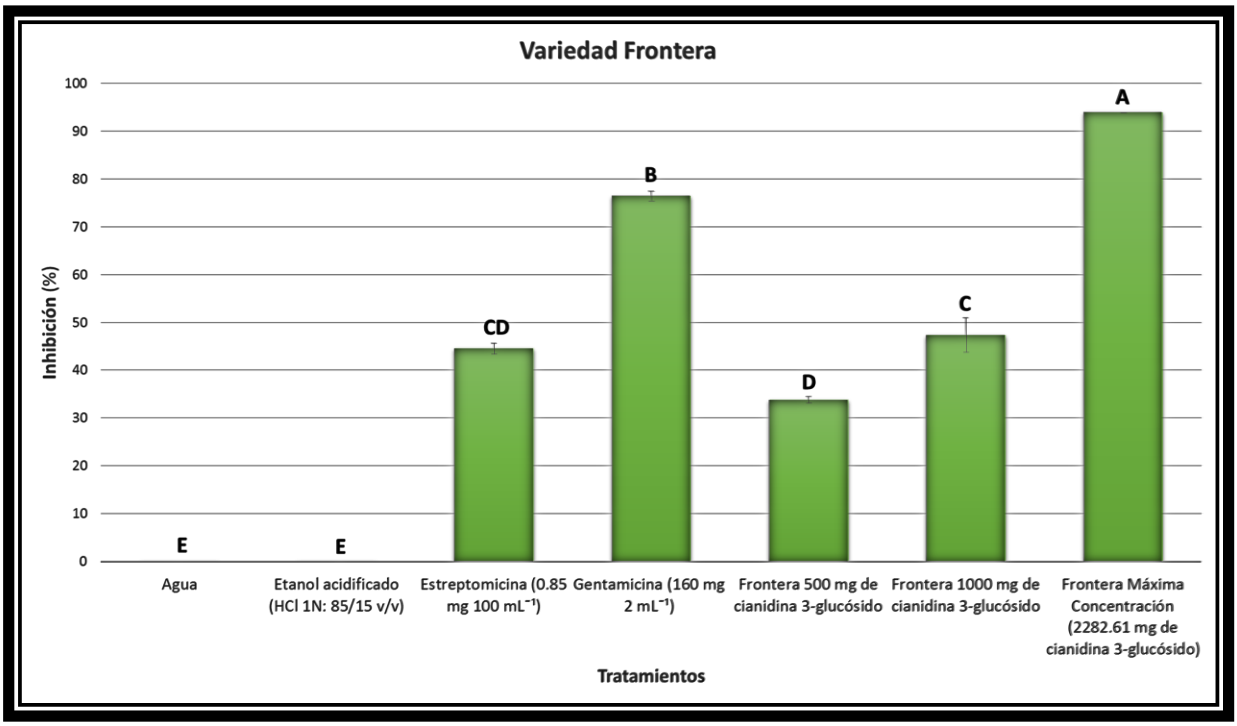


Figura 8. Inhibición de *X. vesicatoria* por extractos antociánicos de frutos de *Fragaria* x *ananassa* Duch. variedad Frontera.

Las antocianinas totales de todas las variedades estudiadas, aplicadas en una cantidad de 500 mg, lograron inhibir a *X. vesicatoria* en la misma medida que el bactericida comercial a base de estreptomicina (Figura 9). Interesantemente, la dosis de 1000 mg de antocianinas de las variedades Albion y San Andreas, superaron el efecto inhibitorio del bactericida comercial en un 15 y 17 %, respectivamente.

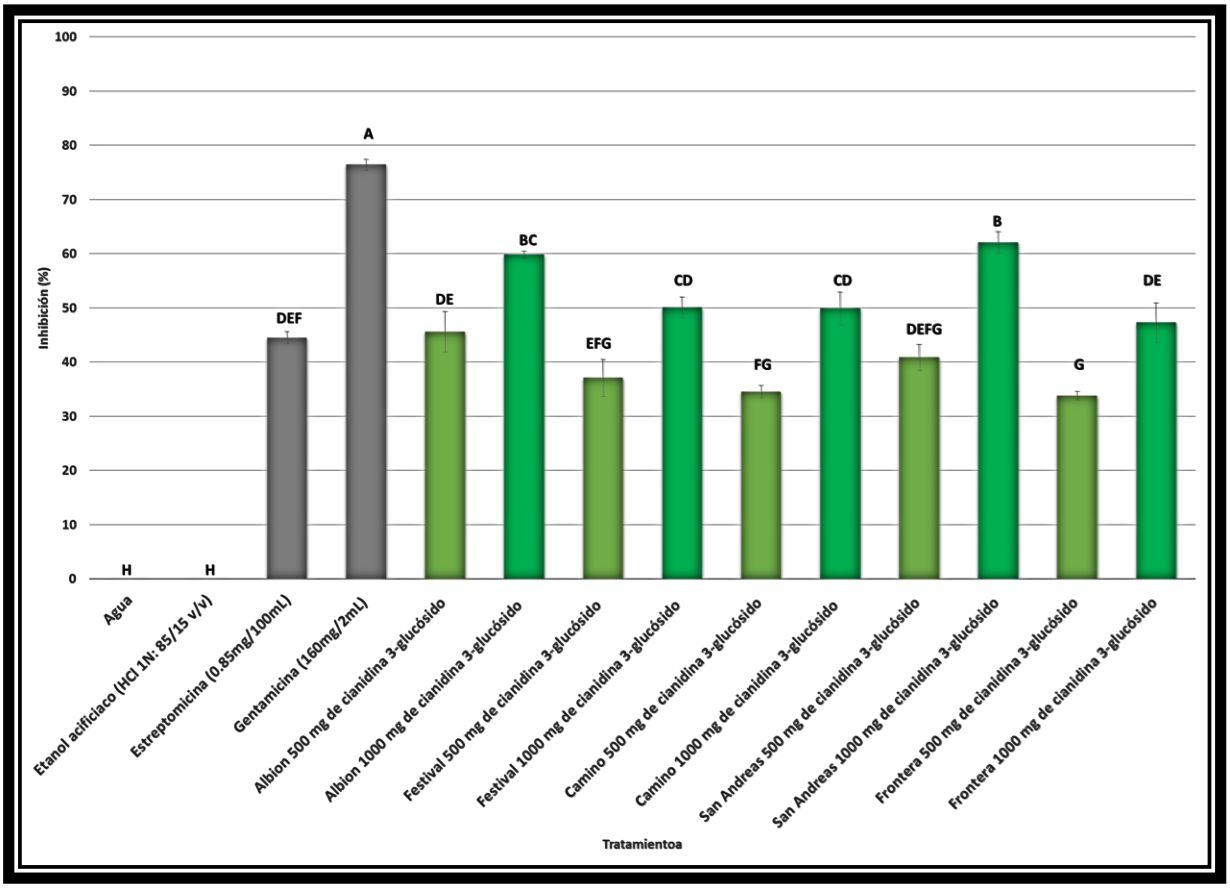


Figura 9. Inhibición de *X. vesicatoria* por extractos antociánicos de frutos de fresa de las variedades Albion, Festival, Camino real, San Andreas y Frontera a concentraciones de 500 y 1000 mg como cianidina 3-glucósido.

6.2.2 Porcentajes de inhibición bacteriana de los tratamientos contra *P. syringae*

Los tratamientos antociánicos de Albion mostraron poder inhibitorio sobre *P. syringae*, siendo Albion Máxima Concentración superior a Albion 1000 y Albion 500 con >6 y >32 %, respectivamente; asimismo, Albion 1000 tuvo mayor inhibición que Albion 500 (>25 %); también se observó que el control con estreptomicina no pudo inhibir el crecimiento de la bacteria a las 72 h de incubación (Figura 10).

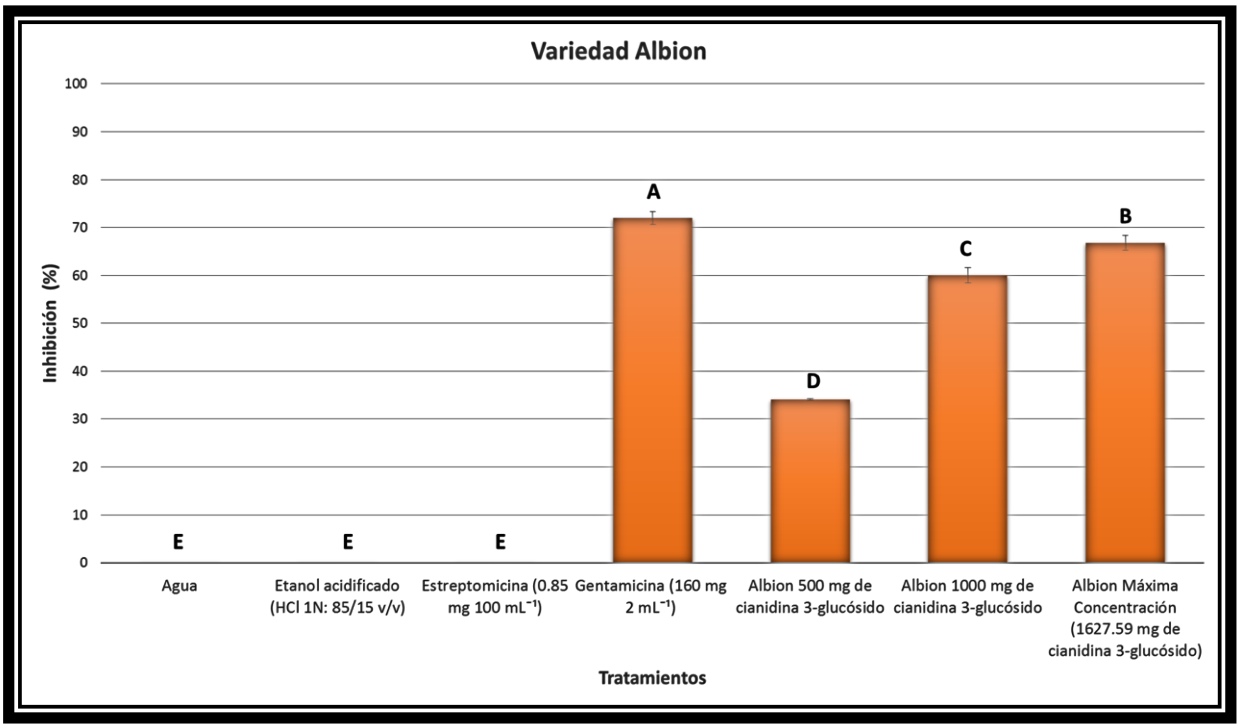


Figura 10. Inhibición de *P. vesicatoria* por extractos antociánicos de frutos de *Fragaria* x *ananassa* Duch. variedad Albion.

El comportamiento de los tratamientos de Festival fue similar a los de Albion, resultando Festival Máxima Concentración superior a Festival 1000 y Festival 500 con porcentajes mayores al 20 y 33 %, respectivamente, y Festival 1000 fue superior a Festival 500 en más del 12%. Nuevamente no se observó inhibición por parte de los tratamientos de Agua, Etanol acidificado y Estreptomicina (Figura 11).

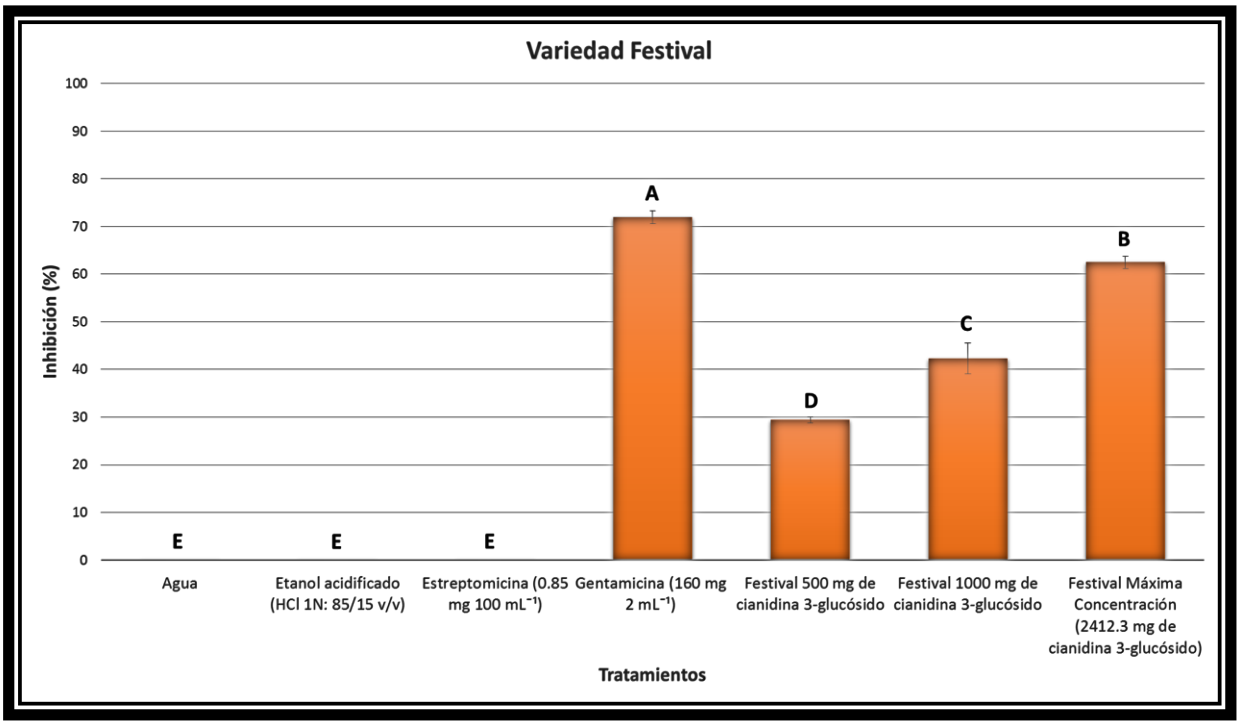


Figura 11. Inhibición de *P. vesicatoria* por extractos antociánicos de frutos de *Fragaria* x *ananassa* Duch. variedad Festival.

De igual manera, el tratamiento de Camino Máxima Concentración superó con más del 16 y 26 % a los tratamientos de Camino 1000 y Camino 500, respectivamente; mientras tanto, Camino 1000 fue más del 10 % superior a Camino 500 (Figura 12).

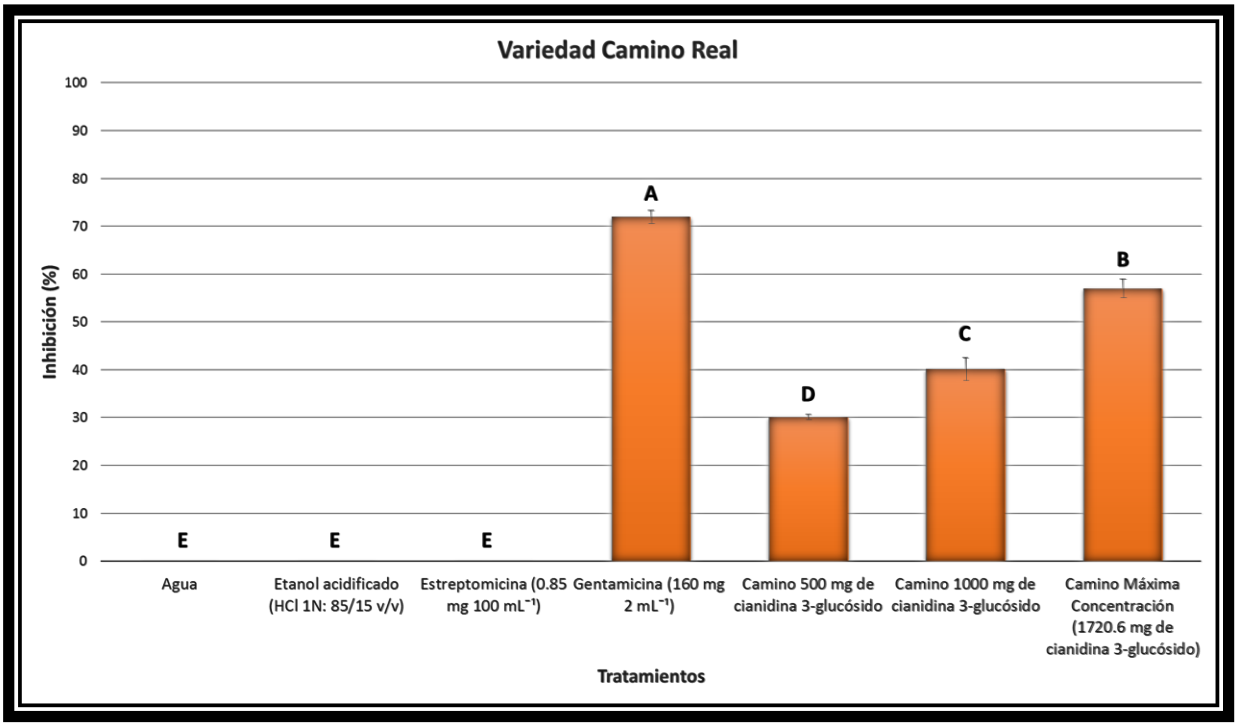


Figura 12. Inhibición de *P. vesicatoria* por extractos antociánicos de frutos de *Fragaria* x *ananassa* Duch. variedad Camino Real.

En la Figura 13 se puede apreciar que los tratamientos de San Andreas Máxima Concentración y San Andreas 1000 fueron significativamente iguales pero superiores a San Andreas 500 con porcentajes por arriba del 25 y 23%, respectivamente.

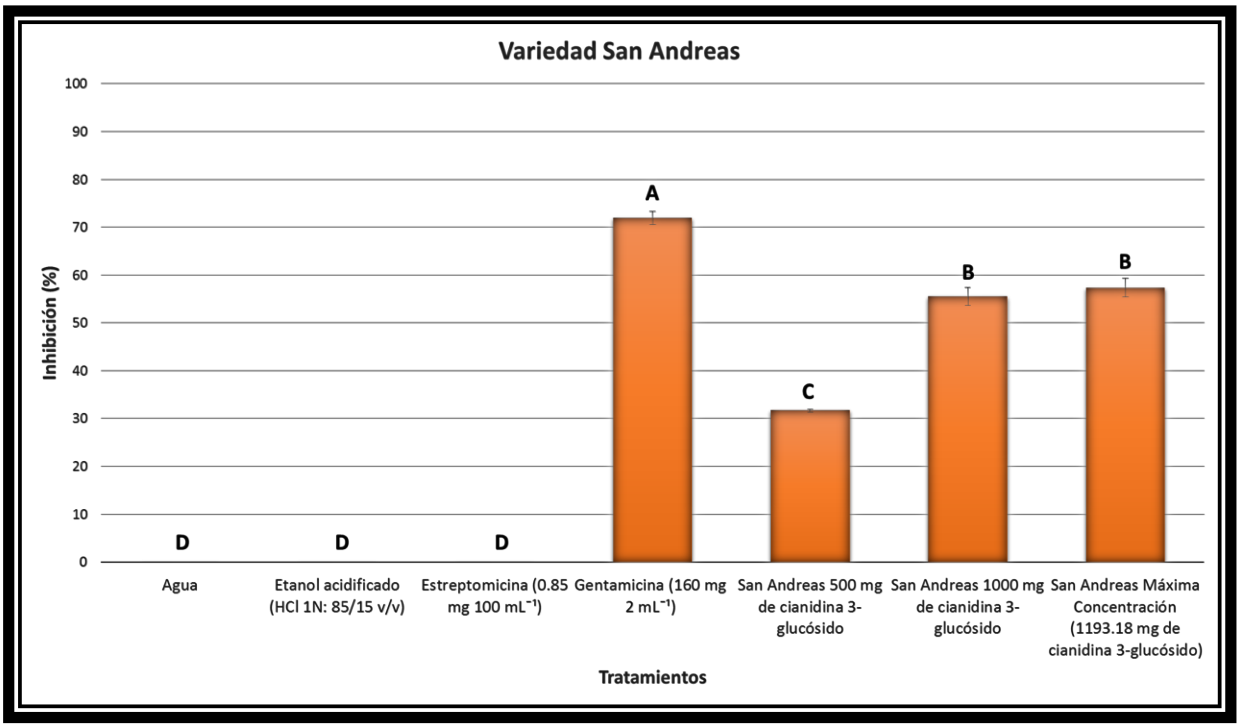


Figura 13. Inhibición de *P. vesicatoria* por extractos antociánicos de frutos de *Fragaria* x *ananassa* Duch. variedad San Andreas.

En la Figura 14 se puede apreciar que el tratamiento de Frontera Máxima Concentración tuvo mayor inhibición bacteriana a comparación de Frontera 1000 y Frontera 500 (superior al 18 y 30 %), respectivamente; por su parte, Frontera 1000 fue mayor que Frontera 500 con un porcentaje superior al 11 %.

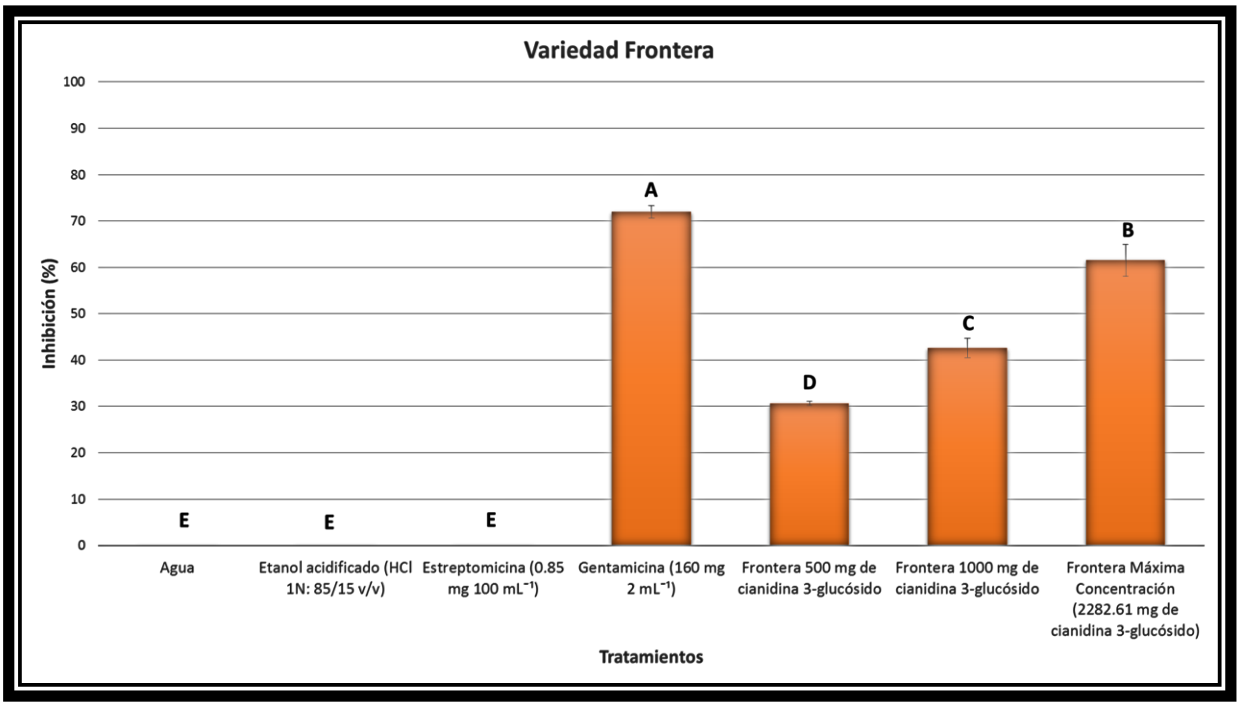


Figura 14. Inhibición de *P. vesicatoria* por extractos antociánicos de frutos de *Fragaria* x *ananassa* Duch. variedad Frontera.

En general, los tratamientos con los extractos antociánicos aplicados a la concentración de 1000 mg como cianidina 3-glucósido fueron significativamente superiores, entre 25 y 30 %, a los tratamientos de las variedades de fresa a concentración de 500 mg como cianidina 3-glucósido, los cuáles presentaron significativamente la misma inhibición. Entre los tratamientos aplicados a concentración de 1000 mg como cianidina 3-glucósido, Albion 1000 y San Andreas 1000 fueron significativamente superiores al resto, entre 17 y 19 %. Cabe señalar que, al contrario de lo esperado, el tratamiento control con gentamicina no fue capaz de inhibir el crecimiento de la bacteria. Los resultados se observan en la Figura 15.

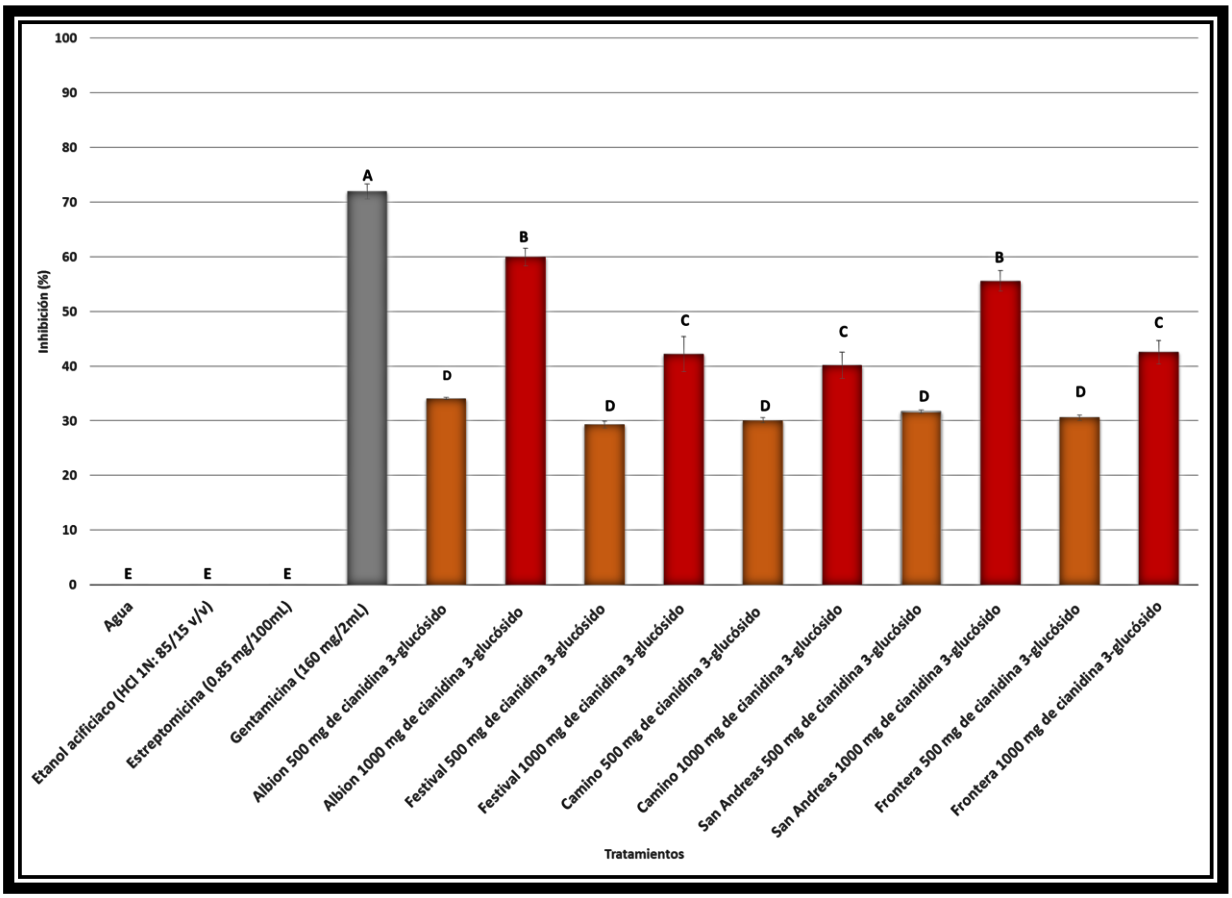


Figura 15. Inhibición de *P. syringae* por extractos antociánicos de frutos de fresa de las variedades Albion, Festival, Camino real, San Andreas y Frontera a concentraciones de 500 y 1000 mg como cianidina 3-glucósido.

6.2.3 Determinación de variedades con mayor poder inhibitorio

Una vez obtenidos los porcentajes de inhibición de los tratamientos, se evaluó cuál de las variedades tuvo mayor efecto inhibitorio sobre las bacterias. Para ello, se tomaron sólo los tratamientos a una concentración de 1000 mg como cianidina 3-glucósido para tener un estándar.

Los tratamientos con mayor efecto inhibitorio contra *X. vesicatoria* fueron San Andreas 1000, Albion 1000, Festival 1000 y Camino 1000, siendo significativamente superiores a Frontera 1000 entre >2 y >14 % (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto de extractos antociánicos de *Fragaria* x *ananassa* Duch. conteniendo 1,000 mg como cianidina 3-glucósido sobre el crecimiento *X. vesicatoria* a las 72 h.		
Tratamiento	**Inhibición (%)**	
Albion 1000	59.85±0.61	AB
Festival 1000	50.14±1.86	AB
Camino 1000	49.91±2.97	AB
San Andreas 1000	62.09±1.97	A
Frontera 1000	47.32±3.60	B

La Tabla 8 muestra la evaluación entre las distintas variedades respecto a su poder inhibitorio contra *P. syringae*, resultando los tratamientos de San Andreas 1000 y Albion 1000 significativamente superiores a Festival 1000, Camino 1000 y Frontera 1000 (entre 17 y 19 %) que fueron significativamente iguales.

Tabla 8. Efecto de extractos antociánicos de *Fragaria* x *ananassa* Duch. conteniendo 1,000 mg como cianidina 3-glucósido sobre el crecimiento *P. vesicatoria* a las 72 h.		
Tratamiento	**Inhibición (%)**	
Albion 1000	60.01±1.56	A
Festival 1000	42.26±3.21	B
Camino 1000	40.20±2.38	B
San Andreas 1000	55.60±1.84	A
Frontera 1000	42.58±2.12	B

6.3 Separación de extractos antociánicos por HPTLC

Se obtuvo una placa desarrollada con el sistema de solventes de acetato de etilo, 2-butanona, agua y ácido fórmico (7:3:0.8:1.2, v/v/v/v) y se documentó como se indica en el apartado 5.5. La Figura 16 muestra el cromatograma por HPTCL de los extractos antociánicos a una concentración de 1000 mg como 3-glucósido Kg^{-1} de fruto fresco de las variedades de fresa

analizadas por triplicado y aplicando 3µL de cada uno; se pueden distinguir 4 bandas en la placa a los factores de retención (R_f) de 0.06, 0.31, 0.43, 0.52 y 0.73.

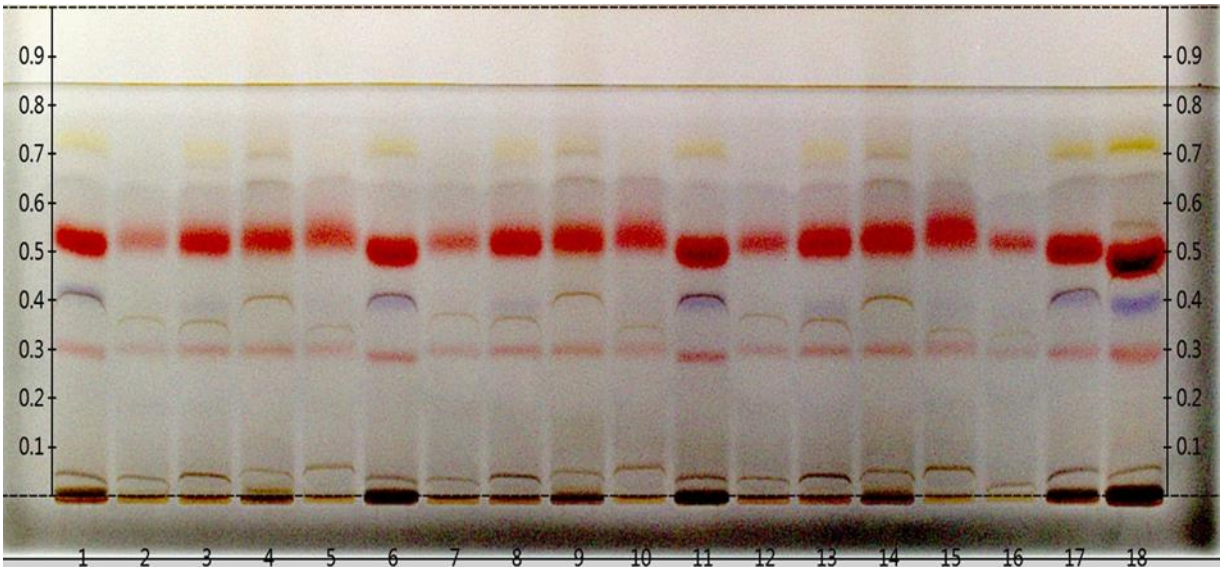


Figura 16. Cromatograma de HPTLC mostrando la separación de los componentes de cinco variedades de *Fragaria* x *ananassa* Duch.: Albion (pistas 1, 6 y 11), Festival (pistas 2, 7 y 12), Camino Real (3, 8, y 13), San Andreas (4, 9 y 14) y Frontera (5, 10 y 15); las pistas 16, 17 y 18 corresponden a extractos de la variedad Albion aplicados a 1, 3 y 5 µL, respectivamente.

A continuación, se muestra la comparación entre la placa obtenida (Figura 17a) y la placa de una mezcla de antocianinas estándar que presenta Cretu & Morlock (2014) (Figura 17b). Cabe mencionar que ambas técnicas se hicieron de la misma manera.

La mezcla de antocianinas que Cretu & Morlock, (2014) desarrollaron estaba construida con las siguientes antocianinas obtenidas como sales de cloruro en grado HPLC por ABCR (Karlsruhe, Germany): cianidina (cn; 3,30,40,5,7-pentahidroxiflavilio), malvidina (mv; 3,40,5,7-tetrahidroxi-30,50-dimetoxi flavilio), delfinidina (dp; 3,30,40,5,50,7-hexahidroxiflavilio) y peonidina (pn; 3,40,5,7-tetrahidroxi-30-metoxoflavilio); pelargonidina (pg; 3,40,5,7-tetrahidroxiflavilo) y pelargonidina-3-glucosido (pg-3-glc), proporcionadas por Sigma–Aldrich (Schnelldorf, Germany). Los 3-glucosidos (3-glc) de dp, mv, cn y pn, fueron obtenidos de Phytolab (Vestenbergsreuth, Germany) y, por último, la Malvidina-3,5-diglucosido (mv-3,5-diglc), fue proporcionado por Carl Roth (Karlsruhe, Germany).

Para su preparación se disolvieron en metanol acidificado (0.6 mL de ácido clorhídrico al 37% y en 120 mL de metanol) los 3-glucósidos de dp, mv, cn, pn (1.1mg/10mL); mientras que, el pg (4.3mg/mL) y mv-3,5-diglc (1.6mg/10mL) fueron disueltos individualmente en etanol acidificado.

Por último, para preparar la mezcla de solución estándar (1.1 mL) para el análisis cromatográficao por HPTLC, se añadieron a un vial 20 µL de dp, mv y cn; 10 µL de pn y pg; 150 µL de mv-3,5-diglc; 250 µL de dp-3-glc, mv-3-glc y cn-3-glc; 110 µL de pn-3-glc y 10 µL de pg-3-glc.

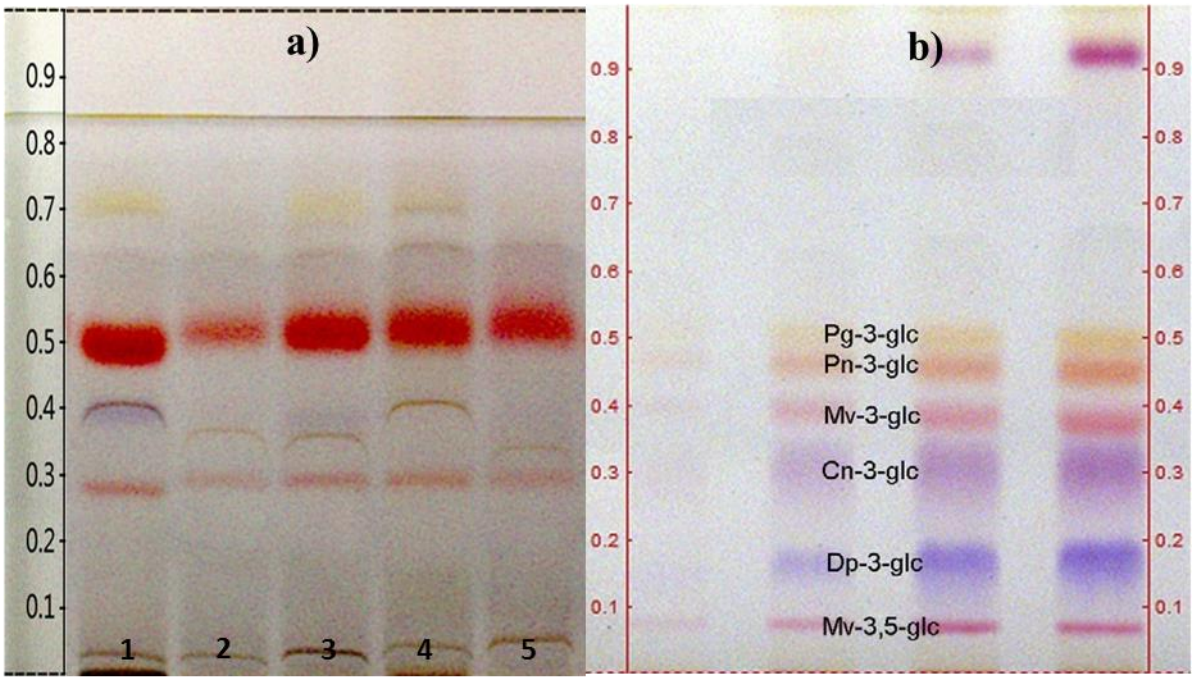


Figura 17. a) Cromatograma de HPTLC mostrando la separación de antocianinas de los extractos de cinco variedades de *Fragaria* x *ananassa* Duch. obtenido siguiendo la metodología de Cretu & Morlock, (2014): Albion, Festival, Camino Real, San Andreas y Frontera (Pistas 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente). b) Mezcla de antocianinas estándar reportada por Cretu & Morlock, (2014). Se presentan la pelargonidina 3-glucósido y la cianidina 3-glucósido a R_f cercano a 5.2 y a 3.5, respectivamente.

Al comparar los R_f de la mezcla de estándares de Cretu & Morlock, (2014) y los del cromatograma de los extractos antociánicos de fresa obtenidos siguiendo la misma técnica, se observó la presencia de Cianidina 3-glucósido (Cn 3-glucósido), Malvidina 3-glucósido (Mv 3-glucósido) y Pelargonidina 3-glucósido (Pg 3-glucósido).

6.4 Bioautogramas de *X. vesicatoria* y *P. syringae*

La técnica de Bioautografía directa se basa en la detección de la actividad de la deshidrogenasa de las bacterias metabólicamente activas. Esta enzima convierte el amarillo del MTT en morado formazán; por lo que las zonas de inhibición se observan más claras que el morado.

En los bioautogramas de ambas bacterias se pudo observar inhibición de algunas bandas separadas. El bioautograma de *X. vesicatoria* mostró inhibición bacteriana cercana a los R_f donde se podrían localizar la pelargonidina 3-glucósido y la cianidina 3-glucósido, siendo la primera la de mayor área de inhibición (Figuras 18a y 18b). Mientras tanto, en el bioatograma de *P. syringae* sólo se observó inhibición en el R_f donde se presumiblemente encuentra la pelargonidina 3-glucósido con un gran rango de actividad antibacteriana (Figuras 19a y 19b).

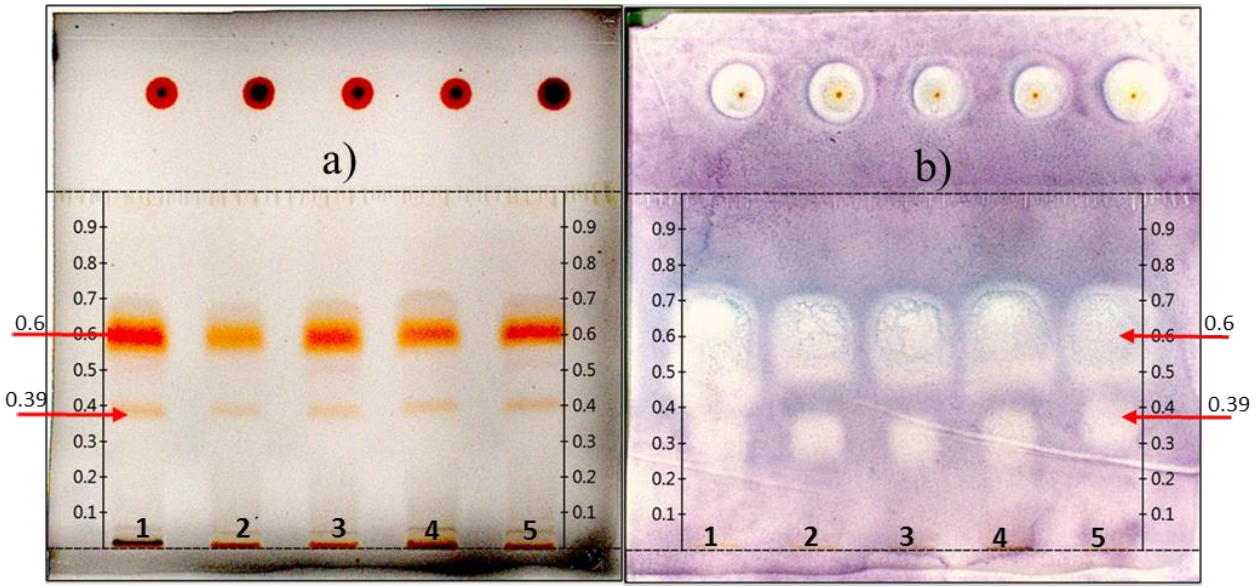


Figura 18. a) Cromatograma de HPTLC mostrando la separación de antocianinas de los extractos de cinco variedades de *Fragaria* x *ananassa* Duch.: Albion, Festival, Camino Real, San Andreas y Frontera (Pistas 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente); b) Bioautograma de extractos antociánicos contra *X. vesicatoria.*

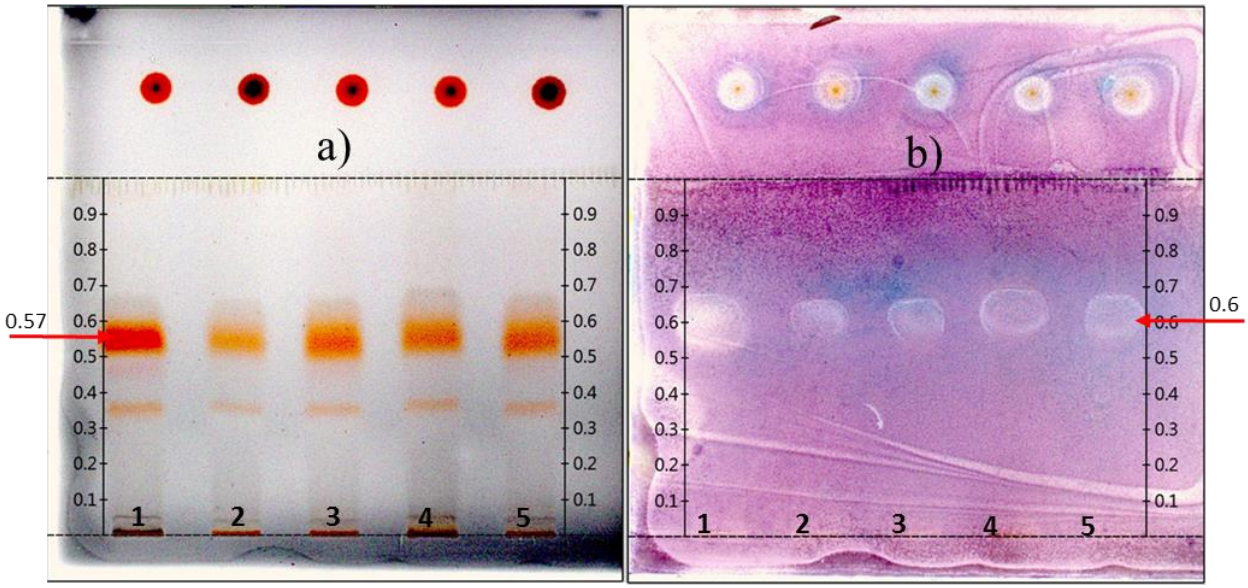


Figura 19. a) Cromatograma de HPTLC mostrando la separación de antocianinas de los extractos de cinco variedades de *Fragaria* x *ananassa* Duch.: Albion, Festival, Camino Real, San Andreas y Frontera (Pistas 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente); b) Bioautograma de extractos antociánicos contra *P. syringae.*

VII DISCUSIÓN

El presente estudio es pionero en la investigación del efecto de las antocianinas de fresa contra bacterias fitopatógenas. Con base en los resultados obtenidos, se encontró que los extractos antociánicos muestran actividad antimicrobiana ante dichas bacterias. Puupponen-Pimia *et al.* (2001), han reportado que los compuestos fenólicos de varias frutillas, incluida la fresa, inhiben el crecimiento bacteriano de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*. Mientras tanto, Jiménez *et al*. (2011), al demostrar la actividad antimicrobiana del extracto de capulín (*Prunus serotina* subsp. *capuli*) sobre las bacterias de *S. typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, encontraron una gran cantidad de antocianinas presentes en dicho extracto.

La concentración de antocianinas obtenida en los extractos de fresa en esta investigación fue similar a la reportada por otros autores. Debnath & Ricard (2009), reportaron entre 161 a 351 mg como cianidina 3-glucósido Kg^{-1} de fruto fresco en 10 variedades distintas: Bounty, Cavendish, Clé des champs, Kent, Micmac, Mira, Rosalyne, Saint-Pierre, Stolo y Wendy. Mientras tanto, Lopes da Silva *et al*. (2007), encontraron entre 200 y 600 mg Kg^{-1} en las variedades de Eris, Oso Grande, Carisma, Tudnew y Camarosa.

Debnath & Ricard (2009) atribuyen la variación de la cantidad de antocianinas a la composición genética específica de cada variedad. De igual manera, Tonutare *et al*. (2014), mencionan que dicha variación depende de la variedad. Según Castañeda-Sánchez & Guerrero-Beltrán (2015), la cantidad de antocianinas es mayor si al cultivo se le proporcionan: suficiente agua, si está en temperaturas cálidas y si tiene buena irradiación solar; además, las antocianinas son vulnerables a la luz, pH y temperatura durante su conservación, por lo que la cantidad puede variar por estos factores. En la presente investigación hubo diferencias entre la cantidad de antocianinas de las distintas variedades a pesar de que fueron cultivadas bajo las mismas condiciones, por lo que dicha variación podría ser resultado de la carga genética de las mismas.

En relación a la actividad antimicrobiana de los extractos antociánicos, se observó una tendencia de la concentración de los extractos con relación a la inhibición; donde, a mayor concentración de antocianinas, mayor fue el porcentaje de inhibición bacteriana. Esto se sustenta con otros estudios como el de Briceño *et al*. (2011), quienes verificaron que, de los tratamientos con

extractos de neem (*Azadirachta indica*) y ruda (*Ruta graveolens*) contra bacterias fitopatógenas, el extracto con mayor concentración fue el que mostró la mayor inhibición bacteriana. Asimismo, Viveros & Castaño (2006), indicaron que el efecto que tiene algún extracto sobre un patógeno, depende de la cantidad de dicho extracto.

La cantidad de antocianinas de los extractos provenientes de las distintas variedades de fresa, está expresada en base a cianidina 3-glucósido; por lo que es probable que la presencia de otras antocianinas y la cantidad en que se encuentran, además de otros compuestos presentes en los extractos, ejerzan influencia sobre su poder inhibitorio.

Existen reportes que manifiestan que la mezcla de sustancias tiene un efecto positivo sobre la inhibición del crecimiento microbiano comparada con las sustancias por separado. Ibrahim *et al.* (2013), determinaron que la combinación de varios compuestos fenólicos tiene efectos sinérgicos y favorece la actividad antimicrobiana en contraste con la acción de uno solo. Sin embargo, se requiere mayor investigación para conocer si el efecto inhibitorio se debe sólo a la cianidina 3-glucósido o a su interacción con otra sustancia, aunque en la prueba de bioautografía de este estudio confirmamos que las antocianinas, en general, inhiben el crecimiento bacteriano.

Por otro lado, los porcentajes de inhibición de los tratamientos, en general, variaron entre una bacteria y otra; manifestando mayor efecto en *X. vesicatoria* que en *P. syringae*. Ante esta situación, Chirinos *et al.* (2007), indican que el poder de inhibición está relacionado a la bacteria misma y su composición. Domingo & López-Brea (2003), sugirieren que la acción de los compuestos fenólicos está relacionada con la inhibición enzimática por la acción de los grupos sulfhídricos de sus aminoácidos de cisteína o por interacciones no específicas con proteínas. Asimismo, Lacombe *et al*. (2010), atribuyen a las antocianinas y a los compuestos fenólicos la destrucción de la membrana celular externa de *Escherichia coli* O157:H7.

Interesantemente, los tratamientos de los extractos antociánicos fueron, en su mayoría, superiores al bactericida agrícola, pese a que se aplicó 10 veces más concentrado de que lo que recomienda el fabricante. Ante este escenario, actualmente se sabe que las bacterias adquieren resistencia a antimicrobianos a través de transferencia vertical y horizontal de genes (López Cuevas *et al.*, 2009).

En el trabajo realizado por Martin *et al*. (2004), se demostró que algunas bacterias presentaron resistencia a algunos bactericidas a base de cobre. Asimismo, Carrillo-Fasio *et al.* (2001b), al aislar 39 cepas bacterianas de *X. vesicatoria* de hojas, tallos y frutos de plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) infectadas, procedentes de distintas zonas del estado de Sinaloa, México, y al someterlas a bioensayos con varias formulaciones de cobre y combinaciones de cobre-mancozeb y cobre-antibiótico, 17 de las 39 cepas mostraron tolerancia e insensibilidad a éstos; concluyendo, pues, que existen algunas cepas de *X. vesicatoria* resistentes a productos a base de cobre.

Cabrera *et al*. (2007), señalan que tanto las bacterias como todos los seres vivos están dotados de mecanismos de adaptación a diversas presiones ambientales, siendo la resistencia a elementos tóxicos una expresión natural de la evolución.

Krüger *et al*. (2013), luego de experimentar con varias pruebas y dosis, determinaron que la mezcla de acetato de etilo, 2-butanona, agua y ácido fórmico en la proporción de 7:3:0.8:1.2 es la más efectiva para la separación de antocianinas por HPTCL. Cretu & Morlock (2014) lo confirmaron en su trabajo al separar antocianinas de distintas frutillas para su identificación. En el presente trabajo lo anterior se corroboró al separar antocianinas de extractos de fresa con la misma mezcla de solventes en la fase móvil.

En la separación de antocianinas por HPTLC se observó la presencia de tres tipos de antocianinas en los extractos de fresa: cianidina 3-glucósido, malvidina 3-glucósido y pelargonidina 3-glucósido. De acuerdo a Lopes da Silva *et al*. (2007), todavía no se caracterizan completamente a las antocianinas presentes en la fresa en sus pigmentos menores, pero las de mayor presencia se derivan de las agliconas de pelargonidina y cianidina, siendo la primera la de mayor presencia en el fruto. Esto se corroboró, pues la banda correspondiente a pelargonidina 3-glucósido fue la más prominente y colorida que aparece en la placa; además, esto era de esperarse, ya que es la antocianina responsable de otorgar el color rojo a los frutos de fresa (Estévez & Mosquera, 2009).

Para determinar cuáles compuestos fueron los responsables de la inhibición obtenida, se realizó una bioautografía directa mediante la técnica modificada de Jesionek *et al*. (2015), ya que este método permite detectar los compuestos biológicamente activos gracias al MTT, y favorece la visualización de las zonas de inhibición de los compuestos separados.

En los bioautogramas se observaron zonas de inhibición de las bandas más altas a donde se encuentra la pelargonidina 3-glucósido y la cianidina 3-glucósido. No se tiene reportado hasta el momento actividad antimicrobiana por la pelargonidina 3-glucósido; sin embargo, Kim *et al*. (2012), al confrontar antocianinas con *Helicobacter pylori*, descubrió que la cianidina 3-glucósido inhibía la secreción de las toxinas que intervienen en la patogénesis de la bacteria.

Hacen falta más estudios sobre la actividad antimicrobiana de las antocianinas y otros compuestos asociados presentes en los extractos antociánicos para conocer su naturaleza y mecanismos de acción. Sin embargo, los resultados de este estudio son un avance en el conocimiento del papel que tienen estas biomoléculas presentes en gran variedad de plantas en los mecanismos de defensa de las mismas contra diversas condiciones adversas en su entorno.

VIII CONCLUSIONES

- Los extractos antociánicos de frutos de fresa inhiben el desarrollo de *X. vesicatoria* y *P. syringae.*
- Existe una relación positiva de la concentración de antocianinas totales y del porcentaje de inhibición de los patógenos.
- Hay un efecto de inhibición distinto entre las variedades de fresa evaluadas.
- Existe un efecto diferencial de inhibición de los extractos antociánicos de las distintas variedades de fresa dependiente de la bacteria a la cual se confrontan.
- Los resultados sugieren que la pelargonidina 3-glucósido y la cianidina 3-glucósido tienen potencial antimicrobiano contra bacterias fitopatógenas y, probablemente, otro componente con R_f ligeramente superior.

IX BIBLIOGRAFÍA

Abd-Alla, M. H., & Bashandy, S. R. (2008). Bacterial wilt and spot of tomato caused by *Xanthomonas vesicatoria* and *Ralstonia solanacearum* in Egypt. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*(2), 291-292.

Abdel-Aal, E. S., & Hucl, P. (1999). A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal chemistry*, 76(3), 350-354.

Aguilera-Ortíz, M., del Carmen Reza-Vargas, M., Chew-Madinaveita, R. G., & Meza-Velázquez, J. A. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *BIOtecnia*, 13(2), 16-22.

Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology* (5ta ed.). México: Limusa.

Álvarez, T. (2012). Biocontrol de *Botrytis cinerea* a partir de extractos fenólicos de fresa. Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional. Disponible en: http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/16418/ALVAREZ%20G%C3%93MEZ%20TANIA%20BELEN%20-%20B101510.pdf?sequence=1

Amil-Ruiz, F., Blanco-Portales, R., Muñoz-Blanco, J., & Caballero, J. L. (2011). The strawberry plant defense mechanism: a molecular review. *Plant and Cell Physiology*, *52*(11), 1873-1903.

Ammar, M. I., Nenaah, G. E., & Mohamed, A. H. H. (2013). Antifungal activity of prenylated flavonoids isolated from *Tephrosia apollinea* L. against four phytopathogenic fungi. *Crop protection*, *49*, 21-25.

Arrazola, G., Herazo, I., & Alvis, A. (2014). Microencapsulación de Antocianinas de Berenjena (*Solanum melongena* L.) mediante secado por aspersión y evaluación de la estabilidad de su color y capacidad antioxidante. *Información tecnológica*, *25*(3), 31-42.

Ávalos, A., & Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, *2*(3), 119-145.

Apolonio-Rodríguez, I., Franco-Mora, O., Salgado-Siclán, M. L., & Aquino-Martínez, J. G. (2017). Inhibición *in vitro* de *Botrytis cinerea* con extractos de hojas de vid silvestre (*Vitis* spp.). *Revista mexicana de fitopatología*, *35*(2), 170-185.

Bajpai, V. K., Kang, S. R., Xu, H., Lee, S. G., Baek, K. H., & Kang, S. C. (2011). Potential roles of essential oils on controlling plant pathogenic bacteria Xanthomonas species: a review. *The Plant Pathology Journal*, *27*(3), 207-224.

Basu, A., Rhone, M., & Lyons, T. J. (2010). Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutrition reviews*, *68*(3), 168-177.

Benavente-García, O., & Castillo, J. (2008). Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(15), 6185–6205.

Briceño, G., García, J., Maselli, A., & Rosales, L. (2011). Efecto de extractos etanólicos de ruda y neem sobre el control de bacterias fitopatógenas del género *Erwinia*. Agronomía Tropical, *61*(2)141-148.

Bultreys, A., & Kaluzna, M. (2010). Bacterial cankers caused by *Pseudomonas syringae* on stone fruit species with special emphasis on the pathovars *syringae* and *morsprunorum* race 1 and race 2. *Journal of Plant Pathology*, S21-S33.

Burdulis, D., Sarkinas, A., Jasutiené, I., Stackevicené, E., Nikolajevas, L., & Janulis, V. (2009). Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits. *Acta poloniae pharmaceutica*, *66*(4), 399-408.

Cabrera, C. E., Gómez, R. F., & Zúñiga, A. E. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia médica*, *38*(2), 149-158.

Cárdenas, J. (2016). Efecto antibacteriano de antocianinas de fresa (*Fragaria ananassa* Duch.) sobre bacterias patógenas de humanos. Tesis de maestría: Instituto Politécnico Nacional.

Carrillo-Fasio, J. A., Sánchez-Bautista, L., García-Estrada, R. S., Allende-Molar, R., & Márquez-Zequera, I. (2001a). Razas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye. presentes en el Estado de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de fitopatología*, *19*(2), 248-250.

Carrillo-Fasio, J. A., García-Estrada, R. S., Allende-Molar, R., Márquez-Zequera, I., Millán-Ocampo, S., & Gaxiola-Espinoza, G. (2001b). Sensibilidad a cobre de cepas de

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye, en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *19*(1), 72-77.

Castañeda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food chemistry*, *113*(4), 859-871.

Castañeda-Sánchez, A., & Guerrero-Beltrán, J. A. (2015). Pigmentos en frutos y hortalizas rojas: antocianinas. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 25-33.

Česonienė, L., Jasutienė, I., & Šarkinas, A. (2009). Phenolics and anthocyanins in berries of European cranberry and their antimicrobial activity. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, *45*(12), 992-999.

Chirinos, J., León, Y., & Vallenilla, Y. (2007). Evaluación de malojillo, verdolaga, nim, manzanilla y orégano como extractos acuosos en el control de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Pseudomonas* sp. y *Xanthomonas* spp. que ocasionan daños en yuca, pimentón, perejil y frijol. Memorias del XX Congreso Venezolano de Fitopatología, San Felipe, Yaracuy, Venezuela.

Chirinos, J., Olivares, B., & Guevara, E. (2013). Efectividad biológica de extractos vegetales en el control *in vitro* de la bacteria fitopatógena *Xanthomona*. *Multiciencias*, *13*(2), 115-121.

Ciappini, M. C., Stoppani, F. S., Martinet, R., & Alvarez, M. B. (2013). Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en mieles de tréboles, eucalipto y alfalfa. *Revista de Ciencia y Tecnología*, (19), 45-51.

Cisowska, A., Wojnicz, D., & Hendrich, A. B. (2011). Anthocyanins as antimicrobial agents of natural plant origin. *Natural product communications*, *6*(1), 149-156.

Cosavalente-Bugos, S. K., Ruíz-Reyes, S. G. & Ganoza-Yupanqui, M. L. (2016). Antocianinas totales y capacidad antioxidante in vitro de extractos de diferente grado etanólico del fruto de *Vaccinium corymbosum* "Arándano". *UCV-SCIENTIA*, *8*(1), 44-48.

Cretu, G. C., & Morlock, G. E. (2014). Analysis of anthocyanins in powdered berry extracts by planar chromatography linked with bioassay and mass spectrometry. *Food chemistry*, *146*, 104-112.

Debnath, S. C., & Ricard, E. (2009). ISSR, anthocyanin content and antioxidant activity analyses to characterize strawberry genotypes. *Journal of Applied Horticulture*, *11*, 83-89.

Díaz-Gómez, R., López-Solís, R., Obreque-Slier, E., & Toledo-Araya, H. (2013). Comparative antibacterial effect of gallic acid and catechin against Helicobacter pylori. *LWT-Food Science and Technology*, *54*(2), 331-335.

Díaz-Solares, M., Lugo-Morales, Y., Fonte-Carballo, L., Castro-Cabrera, I., López-Vigoa, O., & Montejo-Sierra, I. L. (2017). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos frescos de hojas de *Morus alba* L. *Pastos y Forrajes*, *40*(1), 43-48.

Domingo, D., & López-Brea, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española Quimioterap*, *16*(4), 385-393.

Estévez, L., & Mosquera, R. A. (2009). Conformational and substitution effects on the electron distribution in a series of anthocyanidins. *The Journal of Physical Chemistry A*, *113*(36), 9908-9919.

Eurosemillas (2017). *Fresa*. Obtenido de Eurosemillas: http://www.eurosemillas.com/es/variedades/fresa.html

Fanelli, V., Cariddi, C., & Finetti-Sialer, M. (2007). Selective detection of Pseudomonas *syringae* pv. *tomato* using dot blot hybridization and real-time PCR. *Plant pathology*, *56*(4), 683-691.

Falcone, M., Rius, S. & Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in plant science*, *3*.

FAO. (2003). *Manejo Integrado de Enfermedades.* Obtenido de Biblioteca Agroecológia FUNDESYRAM: ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1374s/a1374s05.pdf

FAOSTAT. (2014). *Producción de fresa.* Obtenido de Food Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division: http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC

FND (2015). *Panorama de la fresa.* Obtenido de Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero: http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Ficha%20Fresa.pdf

Francisco Francisco, N., Gallegos Morales, G., Ochoa Fuentes, Y. M., Hernández Castillo, F. D., Benavides Mendoza, A., & Castillo Reyes, F. (2013). Aspectos Fundamentales del Tizón Común Bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith): Características, Patogenicidad y Control. *Revista mexicana de fitopatología*, *31*(2), 147-160.

Fumagali, E., Correia Gonçalves, R. A., Pires Silva Machado, M. F., Vidoti, G. J., & Braz de Oliveira, A. J. (2008). Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros Tabernaemontana e Aspidosperma. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *18*(4), 627-641.

Garzón, G. A. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta Biológica Colombiana*, *13*(3), 27-36.

Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J. M., Quiles, J. L., Mezzetti, B., & Battino, M. (2012). The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, *28*(1), 9-19.

Gimeno Creus, E. (2004). Compuestos fenólicos: un análisis de sus beneficios a la salud. *Offarm*, *23*, 80-84.

González, F. (2005). Fresa, antioxidante por excelencia. *Salud medicinas, 3-6.*

Gopu, V., Kothandapani, S., & Shetty, P. H. (2015). Quorum quenching activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels and its anthocyanin malvidin against *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial pathogenesis*, *79*, 61-69.

Hafidh, R. R., Abdulamir, A. S., Vern, L. S., Bakar, F. A., Abas, F., Jahanshiri, F., & Sekawi, Z. (2011). Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *The open microbiology journal*, *5*, 96-106.

Huerta, D. (2016). Efecto antifúngico de antocianinas de frutos de fresa vs hongos fitopatógenos. Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional. Disponible en:

http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/16785/HUERTA%20PEREZ%20DIEGO%20RAFAEL%20-%20B131033.pdf?sequence=1

Ibrahim, S., Hayek, S. & Gyawali, R. (2013). Antimicrobial Natural Products. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, (págs. 910-921). Méndez-Vilas Editorial.

ImagenAgropecuaria. (2014). *Sabías que México es el tercer exportador de fresa a nivel mundial.* Obtenido de Confederación Nacional Campesina: http://www.cnc.org.mx/sabias-que-mexico-es-el-tercer-exportador-de-fresa-a-nivel-mundial/

Jacas, J., Caballero, P., & Avilla, J. (2005). *El control biológico de plagas y enfermedades. La sostenibilidad de la agricultura mediterránea.* Castellón: Universitat Jaume.

Jesionek, W., Móricz, Á. M., Alberti, Á., Ott, P. G., Kocsis, B., Horváth, G., & Choma, I. M. (2015). TLC-Direct Bioautography as a Bioassay Guided Method for Investigation of Antibacterial Compounds in *Hypericum perforatum* L. *Journal of AOAC International*, *98*(4), 1013-1020.

Jiménez, M., Castillo, I., Azuara, E., & Beristain, C. I. (2011). Antioxidant and antimicrobial activity of capulin (*Prunus serotina* subsp *capuli*) extracts. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, *10*(1), 29-37.

Kessel-Dominí, A. (2012). Mejora genética de la fresa (*Fragaria ananassa* Duch.), a través de métodos biotecnológicos. *Cultivos Tropicales*, *33*(3), 34-41.

Kim, D. O., Heo, H. J., Kim, Y. J., Yang, H. S., & Lee, C. Y. (2005). Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, *53*(26), 9921-9927.

Kim, S. H., Park, M., Woo, H., Tharmalingam, N., Lee, G., Rhee, K. J., & Kim, J. B. (2012). Inhibitory effects of anthocyanins on secretion of Helicobacter pylori CagA and VacA toxins. *International journal of medical sciences*, *9*(10), 838.

Khoshnevisan, B., Rafiee, S., & Mousazadeh, H. (2013). Environmental impact assessment of open field and greenhouse strawberry production. *European journal of Agronomy*, *50*, 29-37.

Krüger, S., Urmann, O., & Morlock, G. E. (2013). Development of a planar chromatographic method for quantitation of anthocyanes in pomace, feed, juice and wine. *Journal of Chromatography A*, *1289*, 105-118.

Lacombe, A., Wu, V. C., Tyler, S., & Edwards, K. (2010). Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against *Escherichia coli* O157: H7. *International Journal of Food Microbiology*, *139*(1), 102-107.

Lattanzio, V., Lattanzio, V. M., & Cardinali, A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in research*, *661*, 23-67.

Ledesma, N. A., Nakata, M., & Sugiyama, N. (2008). Effect of high temperature stress on the reproductive growth of strawberry cvs. 'Nyoho' and 'Toyonoka'. *Scientia Horticulturae*, *116*(2), 186-193.

León López, L., Guzmán-Ortíz, D. L. A., García Berumen, J. A., Chávez Marmolejo, C. G., & Peña-Cabriales, J. J. (2014). Consideraciones para mejorar la competitividad de la región" El Bajío" en la producción nacional de fresa. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, *5*(4), 673-686.

Lopes da Silva, F., Escribano-Bailón, M. T., Pérez Alonso, J. J., Rivas-Gonzalo, J. C., & Santos-Buelga, C. (2007). Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT-Food Science and Technology*, *40*(2), 374-382.

López Cuevas, O., León Félix, J., Jiménez Edeza, M., & Chaidez Quiroz, C. (2009). Detección y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. *Revista fitotecnia mexicana*, *32*(2), 119-126.

Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, I., Salmond, G., & Foster, G. D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, *13*(6), 614-629.

Martin, H. L., Hamilton, V. A., & Kopittke, R. A. (2004). Copper tolerance in Australian populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* contributes to poor field control of bacterial spot of pepper. *Plant disease*, *88*(9), 921-924.

Martínez-Bolaños, M., Nieto-Angel, D., Téliz-Ortiz, D., Rodríguez-Alcazar, J., Martínez-Damian, M. T., Vaquera-Huerta, H., & Carrillo Mendoza, O. (2008). Comparación cualitativa de fresas (*Fragaria x ananassa* Duch.) de cultivares mexicanos y estadounidenses. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, *14*(2), 113-119.

Martínez-González, E., Barrios-Sanromá, G., Rovesti, L., & Santos-Palma, R. (2006). *Manual Integrado de Plagas.* La Habana: Centro Nacional de Sanidad Vegetal.

Miceli, N., Trovato, A., Dugo, P., Cacciola, F., Donato, P., Marino, A., Bellinguieri, V., La Barrera, T. M., Güvenç A., & Taviano, M. F. (2009). Comparative analysis of flavonoid profile, antioxidant and antimicrobial activity of the berries of *Juniperus communis* L. var. *communis* and *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. from Turkey. *Journal of agricultural and food chemistry*, *57*(15), 6570-6577.

Moldovan, B., David, L., Chişbora, C., & Cimpoiu, C. (2012). Degradation kinetics of anthocyanins from European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) fruit extracts. Effects of temperature, pH and storage solvent. *Molecules*, *17*(10), 11655-11666.

Molina, J. & Uribarren, T. (2015). *Generalidades de Bacterias*. Obtenido de Universidad Nacional Autónoma de México: http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html

Moposita, E. (2011). *Variedades de fresa*. Obtenido de Aseragro: https://aseragro.jimdo.com/portafolio/plantas/fresas/

Musilová, J., Trebichalský, P., Timoracká, M., & Bystrická, J. (2013). Cultivar as one of the factors affecting the anthocyanin content and antioxidant activity in strawberry fruits. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 1765-1775.

Naz, S., Siddiqi, R., Ahmad, S., Rassol, S. A., & Sayeed, S. (2007). Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. *Journal of Food Science*, *72*(9), M341-M345.

Ortiz, D., Noguera, R., & Posada, S. (2014). Efecto de metabolitos secundarios de las plantas sobre la emisión entérica de metano en rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*, *26*.

Oyoque, G., (2008). Inducción de resistencia en jitomante (*Solanum lycopersicum* L.) con extractos de bacterias patógenas. Tesis de maestría: Instituto Politécnico Nacional. Disponible en: http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/3614/INDUCCIONRESISTENCIA.pdf?sequence=1

Palacios-Rojas, N., Burtin, D., & Leech, M. (2004). Biología molecular, una herramienta para la bioprospección del metabolismo secundario de plantas en Colombia. Ejemplo práctico en plantas colombianas de interés medicinal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *6*(2), 67-77.

Peña-Varela, G., Salinas-Moreno, Y., & Ríos-Sánchez, R. (2006). Contenido de antocianinas totales y actividad antioxidante en frutos de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) con diferente grado de maduración. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, *12*(2), 159-163.

Pérez-Alonso, N., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal*, *11*(4), 195-211.

Pérez Trueba, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, *22*(1), 48-57.

Pírez, M., & Mota, M. (2006). *Temas de Bacteriología y Virología Médica: morfología y Estructura Bacteriana.* Universidad de la República Montevideo: Oficina del libro FEFMUR.

Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., & Oksman-Caldentey, K. M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of applied microbiology*, *90*(4), 494-507.

Ramírez-Reyes, T., Flores-Estévez, N., Luna-Rodríguez, M., Noa-Carrazana, J. C., Sánchez-Velásquez, L. R., & Trigos-Landa, Á. (2015). Extractos crudos de *Magnolia schiedeana* Schltdl. para el control de bacterias fitopatógenas. *Madera y bosques*, *21*(2), 159-164.

Ritchie, D. F. (2000). *Bacterial spot of pepper and tomato.* Obtenido de The American Phytopathological Society: http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/Bacterialspot.aspx

Rodríguez-Bautista, G., Calderón-Zavala, G., Jaen-Contreras, D., & Curiel-Rodríguez, A. (2012). Capacidad de propagación y calidad de planta de variedades mexicanas y extranjeras de fresa. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, *18*(1), 113-123.

Rodríguez-Ledesma, C.; González-Gutiérrez, G., & Gómez-Espinoza, M. G. (2016). Fresa transgénica: importancia, beneficios y avances científicos en México. *Revista electrónica Reaxión*. Disponible en: http://reaxion.utleon.edu.mx/Art_Fresa_transgenica_importancia_beneficios_y_avances_cientificos_en_Mexico.html.

Rosli, G. (2007). Degradación de pared celular en frutillas. Análisis de sus componentes, evolución de la actividad enzimática y expresión de genes asociados. Tesis de doctorado, Universidad Nacional General San Martín Argentina. Disponible en: http://www.iib.unsam.edu.ar/php/docencia/tesis/archivos/HernanRosli.pdf

SAGARPA. (2009). *Sistema Producto Fresa. Estudio de oportunidades de mercado e inteligencia comercial internacional para la resa.* Obtenido de SAGARPA: http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/FRESA.pdf

SAGARPA. (2013). *AGC: investigadores desarrollan variedades de fresa mexicanas.* Obtenido de SAGARPA: http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/michoacan/boletines/2013/agosto/Documents/B049 2013.pdf

Santoyo, J., & Martínez, C. (2009). *Paquete tecnológico para la producción de fresa.* Sinaloa: Colección RP.

Sepúlveda Jiménez, G., Porta Ducoing, H., & Rocha Sosa, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *21*(3), 355-363.

Serrano, L., & Galindo, E. (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Revista de la Academia Mexicana de Ciencias*, *58*(1), 77-88.

SIAP. (2015). *Producción de fresa*. Obtenido de Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera: http://www.siap.gob.mx/

Slabbinck, B., De Baets, B., Dawyndt, P., & De Vos, P. (2010). Análisis de Pseudomonas fitopatógenas usando métodos inteligentes de aprendizaje: un enfoque general sobre taxonomía y análisis de ácidos grasos dentro del género Pseudomonas. *Revista mexicana de fitopatología*, *28*(1), 1-16.

SNITT. (2016). Agenda Nacional de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología 2016-2020. Obtenido de Sistema Nacional de Investigación y Transferencia Tecnológica para el Desarrollo Rural Sustentable: http://www.snitt.org.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=185&catid=20&Itemid=182

Soto Váquez, M. R. (2015). Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de la región Amazonas. *In Crescendo*, *6*(1), 33-43.

Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology.* Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., Publishers.

Tonutare, T., Moor, U., & Szajdak, L. (2014). Strawberry anthocyanin determination by pH defferential spectroscopic method – How to get true results?. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*, *13*(3), 35-47.

Tsuda, H., Kunitake, H., Kawasaki-Takaki, R., Nishiyama, K., Yamasaki, M., Komatsu, H., & Yukizaki, C. (2013). Antioxidant activities and anti-cancer cell proliferation properties of Natsuhaze (*Vaccinium oldhamii* Miq.), Shashanbo (*V. bracteatum* Thunb.) and Blueberry cultivars. *Plants*, *2*(1), 57-71.

Ventura, M. G. (2007). Identificación de bacterias fitopatógenas en cultivos de Papaya (Ca*rica papaya*) en las fincas El Pantanal y El Subín, ubicadas en el Departamento del Petén,

Guatemala. Tesis de licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2520.pdf

Vidaver, A., & Lambrecht, P. (2004). *Las Bacterias como Patógenos Vegetales.* Obtenido de The American Phytopathological Society: http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/BacteriaEspanol.aspx

Vinuesa, J. (2010). *Bacteria*. Obtenido de Introducción a la biología: https://biologialiga.files.wordpress.com/2008/08/bacteria2010.pdf

Vivas, P. (2012). *Investigación de mercado de la fresa.* Obtenido de Corpfresasvivas: http://corpfresasvivas.blogspot.mx/2012/11/investigacion-de-mercado_11.html

Viveros, F. J., & Castaño, J. (2006). Evaluación *in vitro* de extractos vegetales sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Agronomía (Manizales), 14*(1), 35-50.

Vuorela, S., Kreander, K., Karonen, M., Nieminem, R., Hämäläinem, M., Galkin, A., Laitinen, L., Salminem, J. P., Moilanem, E., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P., & Heinonen, M. (2005). Preclinical evaluation of rapeseed, raspberry, and pine bark. *Journal of Agrucultural and Food Chemistry*, *53*(15), 5922−5931.

Xie, Y., Yang, W., Tang, F., Chen, X., & Ren, L. (2015). Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. *Current medicinal chemistry*, *22*(1), 132-149.

Young, J. M. (2010). Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology*, S5-S14.

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de medio KB (1 L)

Se disolvieron destilada los siguientes reactivos en 1 L de agua en el orden que aparecen.

REACTIVO	CANTIDAD
Sulfato de Magnesio ($MgSO_4$ $7H_2O$) (Productos Químicos Monterrey, Monterrey, México)	1.5 g
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4) (Folden Bell, Anaheim, CA, Estados Unidos)	1.5 g
Glicerol (Fermont, Monterrey, México)	10 mL
Peptona de carne (BD Bioxon, San Diego, CA., Estados Unidos)	10 g
Peptona de caseína (DIBICO)	10 g
Agar bacteriológico (BD Bioxon, San Diego, CA., Estados Unidos)	15 g

Anexo 2. Preparación de medio nutritivo (1L)

Se disolvieron 23 g de agar nutritivo (Bioxon) en 1 L de agua destilada