

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”
DIVISION DE AGRONOMIA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRICOLA**



ACTIVIDAD ANTIFUNGICA *in vitro* E *in vivo* DE QUITOSAN, *Larrea tridentata* (D.C) COVILLE Y MEZCLAS DE AMBOS BIOPRODUCTOS EN CINCO CEPAS DE *Colletotrichum gloeosporioides* (PENZ.)

Por:

JOSE SANTIAGO CABRERA

T E S I S

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
Noviembre de 2004.**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”
DIVISION DE AGRONOMIA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRICOLA**

ACTIVIDAD ANTIFUNGICA *in vitro* E *in vivo* DE QUITOSAN, *Larrea tridentata* (D.C) COVILLE Y MEZCLAS DE AMBOS BIOPRODUCTOS EN CINCO CEPAS DE *Colletotrichum gloeosporioides* (PENZ.)

PRESENTADA POR:

JOSE SANTIAGO CABRERA

T E S I S N I V E L L I C E N C I A T U R A

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

INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO

**Aprobada
Presidente del Jurado**

Dr. Alberto Flores Olivas

Sinodal

Sinodal

**Dr. Ricardo Hugo Lira Saldivar
Director de Tesis (CIQA)**

Dr. F. Daniel Hernández Castillo

Sinodal Suplente

**COORDINADOR DE LA
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA**

M.C. Abiel Sánchez Arizpe

M.C. Arnoldo Oyervides García

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México., Noviembre de 2004.

DEDICATORIAS

*A la memoria de mi madre la **Sra. Guadalupe Cabrera Ambrosio (+)** de quien estaré eternamente agradecido por traerme a la vida y hacer de mi un hombre de bien ya que siempre estuviste conmigo, no en carne, pero sí en espíritu. Que dios te bendiga por siempre.*

*Con profundo respeto y admiración a mi padre el **Sr. Alberto Santiago Espinoza** por ser mi padre, además por sus valiosos consejos e instruirme ser mejor cada día, te doy infinitamente las gracias por el gran regalo del mundo que he recibido de usted como el ser un profesionalista, nuevamente gracias a usted.*

A mis Hermanos de Siempre:

Antonio
Rosy
Juan
Alberto
Lolita
Lupita

Por el inmenso amor, respeto que han dado hacia mi y por impulsarme a seguir adelante, luchando por conseguir hasta lo imposible, además por sus consejos de hermanos les doy gracias a ustedes.

A mis tíos y tías:

Por sus consejos que alguna vez me brindaron y me hayan servido de mucho, gracias a ustedes.

A mis primos(a)s:

Por ese gran respeto que ustedes me han dado y no los menciono por temor a que se me pase alguno de ustedes, a todos les doy muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a ti señor Dios que has permitido a realizarme como profesionista de lo cual estaré siempre y eternamente agradecido por darme mas vida.

Doy profundamente las gracias a mi máxima casa de estudios “*Alma Terra Mater*” por brindarme el saber como herramientas necesaria, que me ayuda a sostenerme como persona y así mismo por aceptarme como uno mas de tus hijos en tu familia de agrónomos.

Doy gracias al Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) por Brindarme el apoyo necesario en la realización del presente trabajo.

Al Dr. R. Hugo Lira Saldivar por su valioso apoyo ilimitado, consejos y orientaciones durante mi estancia en la realización del presente trabajo de investigación.

Al Dr. Alberto Flores Olivas, por ser el asesor principal de esta tesis y por su valioso apoyo en la revisión del mismo trabajo.

Al Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo, por formar parte del comité H. Jurado examinador del presente examen profesional.

Al M.C. Abiel Sánchez Arizpe, también por ser suplente del presente examen profesional.

Al Ing. José Luis Villareal, por su valioso asesoría requeridas durante el desarrollo del trabajo de tesis.

Al Ing. Jesús Cruz Blasi por la aportación de materiales biológicos (cepas de hongos)

A la Lic. Josefina Zamora Rodríguez por su valiosa asesoría en tomas fotográficas de hongos en microscopio óptica, gracias a usted.

A las personas del CIQA como amigos, especialmente al Departamento de Estudios Ambientales, que de una u otra forma estuvieron cercanamente.

A todos mis compañeros de la generación de Ingenieros Agrónomos de diferentes especialidades, incluyendo a los parasitólogos.

Gracias a mis amigos y amigas a Marcela H., Jorge Alberto, Erika G., Karime, Lucio, José Edilberto, Diomedes, Víctor, José Luis R., Saúl, Ma. de Jesús, Laura, Enoc, Adalberto, Miguel, Juan D., Manuel, Juan, Elías, Márquez, Gaspar, Paty, Jesabel, Adabella, Abel, H. y E.

Al Ing. Ma. Magdalena Granados y Familia. Por su amistad y consejos que ustedes me han sabido brindar, además por considerarme una persona de confianza, les doy gracias a ustedes y que dios les bendiga.

RESUMEN

La antracnosis es una enfermedad de pre y poscosecha causado por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, generalmente ocasiona necrosis o pudrición de los frutos en estado de madurez o de consumo en la mayoría de los cultivos tropicales, subtropicales y templadas; en ocasiones el hongo se han encontrado hasta en follaje, causando daños significativos. El control que comúnmente se han realizado son las aplicaciones de fungicidas sintéticos en pre y poscosecha, así como lavados de frutos en agua caliente mas fungicida sintético en contenedores, sin embargo, con el paso del tiempo este patógeno ha generado resistencias a varios funguicidas, por otra parte, estos pesticidas generan toxicidad en el humano y una amplia residualidad en el ambiente.

Con base en lo anterior, en la búsqueda de opciones para el manejo de la antracnosis se estudió la actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de dosis de quitosan (Q), extracto etanólico hidrosoluble de *L. tridentata* (L) así como la formulación de ambos bioproductos (Q-L) contra cinco cepas del hongo *C. gloeosporioides*. En los bioensayos *in vitro* se empleó (PDA) como testigo absoluto y dos testigos químicos (Mancozeb y Tecto 60); mientras que en el experimento *in vivo* se utilizaron frutos de papaya cv. Maradol en estado de maduración de consumo. Las cepas del hongo fueron aisladas de las porciones enfermas del fruto de papaya, mango y guanábana, pecíolo de hoja de papaya y hojas mango de la región del Soconusco, Chiapas. Todos los aislamientos fueron cultivos monosporicos o monoconidiales.

Se prepararon los tratamientos de quitosan, cada concentración se disolvió en ácido acético al 10 % con agua destilada desionizada. En el caso de los tratamientos de *Larrea* se prepararon las concentraciones a evaluar disolviendo el extracto en agua destilada desionizada; de igual manera se prepararon las concentraciones Q-L y a todas las preparaciones se les adicionó Tween 80 como surfactante. Se elaboraron medios de cultivos con Papa Dextrosa Agar (PDA) y después de esterilizado se preparó el medio envenenado en el que posteriormente se hizo la siembra de las cinco cepas del hongo.

Los resultados obtenidos *in vitro* mostraron que los tratamientos de *L. tridentata* tuvieron una alta eficiencia sobre la inhibición del crecimiento micelial de las cinco cepas de este patógeno de poscosecha. Por el contrario, las dosis de quitosan reportaron ser menos eficientes contra el crecimiento micelial del hongo. Al evaluar las mezclas Q-L se observó que estas resultaron ser más eficientes que los extractos solos de gobernadora y quitosan, lo anterior debido a que las mezclas mostraron ser más eficaces en su efecto antifúngico contra las cinco cepas de *C. gloeosporioides*, por lo anteriormente señalado y con base en la comprobación matemática mediante la fórmula de Limpel, se demostró en este trabajo un claro efecto sinérgico de las mezclas Q-L.

Por otro lado, los resultados *in vivo* obtenidos al analizar el efecto preventivo de quitosan a 8000 ppm, *L. tridentata* a 4000 ppm y la formulación Q-L a 2000/2000 ppm en frutos de papaya, los resultados generados indican que la dosis aplicada de resina de gobernadora mantuvo una baja incidencia de la antracnosis en frutos de papaya, mientras que la mezcla Q-L le siguió en cuanto a la efectividad antifúngica contra *C. gloeosporioides*. Por lo tanto, el quitosan reportó ser menos eficiente en cuanto a su efecto contra la antracnosis, todos estos tratamientos comparados contra un testigo que mostró un 100% de incidencia de la enfermedad. En este trabajo *in vivo* también se evaluó la severidad de la antracnosis sobre los frutos de papaya, habiéndose detectado que la dosis de 4000 ppm de extracto de gobernadora, así como la mezcla Q-L fueron los mejores tratamientos, lo anterior debido a que mantuvieron una baja severidad de la enfermedad.

Los resultados aquí consignados, indican que las formulaciones Q-L resultaron ser más eficientes en cuanto a su actividad antifúngica *in vitro* contra *C. gloeosporioides*, ya que mostraron una capacidad inhibitoria muy superior comparada con las que se obtuvo con los productos por separado. Considerando los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo*, se concluye en este trabajo que la utilización de los extractos de *L. tridentata* y su mezcla con el biopolímero quitosan pudieran ser utilizados en el futuro para un manejo agronómico de la antracnosis causado por *C. gloeosporioides* en cultivos hortofrutícolas; sin embargo, es importante señalar que todavía se requieren más trabajos *in vivo* e *in planta* para validar bajo condiciones de invernadero y campo lo demostrado en este trabajo.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
INDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE.....	xi
INDICE DE FIGURAS.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Antecedentes históricos de frutas tropicales.....	5
Problemas patológicos en guanábana, mango y papaya.....	5
Antracnosis producida por <i>C. gloeosporioides</i>	10
Antecedentes históricos de <i>C. gloeosporioides</i>	10
Ubicación taxonómica.....	12
Importancia de <i>C. gloeosporioides</i>	12
Distribución geográfica.....	14
Epidemiología.....	14
Sintomatología.....	17
Ciclo biológico de <i>C. gloeosporioides</i>	18
Métodos de control de <i>C. gloeosporioides</i>	19
Control químico.....	19
Control no químico.....	20
Generalidades del biopolímero quitosan.....	21
Antecedentes.....	21
Usos del quitosan y mecanismos de acción.....	22
Algunas propiedades químicas del quitosan.....	23
Formula química del quitosan, quitina y celulosa.....	24
Antecedentes históricos sobre la actividad biocida de algunas plantas.....	25
Características generales de la gobernadora (<i>Larrea tridentata</i>).....	26
Distribución geográfica.....	27

Descripción botánica.....	28
Constituyentes fitoquímicos de la resina y usos de <i>L. tridentata</i>	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
Localización y actividades experimentales.....	32
Extracción de la resina.....	32
Muestreos para la obtención de los patógenos.....	32
Descripción de la morfología colonial de cepas aisladas.....	33
Reactivación del patógeno.....	34
Identificación del patógeno.....	34
Bioensayos <i>in vitro</i>	35
Preparación de los tratamientos de quitosan.....	35
Preparación de los tratamientos de <i>Larrea tridentata</i>	37
Preparación de las mezclas quitosan-Larrea.....	37
Preparación de los medios de cultivos.....	38
Siembra de las cepas del patógeno <i>C. gloeosporioides</i>	38
Parámetros medidos.....	39
Bioensayos <i>in vivo</i>	40
Preparación de los tratamientos de quitosan, <i>L. tridentata</i> y Q-L.....	40
Preparación del inóculo.....	40
Desinfección de las frutas utilizadas en el experimento <i>in vivo</i>	41
Inoculación de los frutos de papaya.....	41
Parámetros medidos.....	41
Análisis estadístico.....	42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
CONCLUSIONES.....	61
LITERATURA CITADA.....	63
APÉNDICE.....	71

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Algunas propiedades químicas del biopolímero quitosan.....	24
2. Principales constituyentes fitoquímicos de <i>L. tridentata</i>	31
3. Tratamientos aplicados en los experimentos <i>in vitro</i> con quitosan, <i>L. tridentata</i> y formulaciones quitosan-Larrea contra 5 cepas de <i>C. gloeosporioides</i>	36
4. Tratamientos preventivos de quitosan, <i>Larrea tridentata</i> y una mezcla Q-L aplicados a frutos de papaya cv. Maradol que fueron inoculados con una cepa del hongo <i>C. gloeosporioides</i>	40
5. Comparación de medias de la inhibición del crecimiento micelial radial de cinco cepas de <i>C. gloeosporioides</i> sometidas a diferentes dosis de soluciones de quitosan y extracto etanólico hidrosoluble de <i>L. tridentata</i>	44
6. Comparación de medias de la inhibición del crecimiento micelial radial de cinco cepas de <i>C. gloeosporioides</i> sometidos a diferentes dosis de formulaciones de dos bioproductos quitosan- <i>L. tridentata</i> (Q-L).....	49
7. Crecimiento micelial radial de cinco cepas del hongo <i>C. gloeosporioides</i> sometidas a soluciones de quitosan, <i>L. tridentata</i> y mezclas quitosan-Larrea.....	51
8. Eficacia de los tratamientos aplicados sobre cinco cepas del hongo fitopatógeno <i>C. gloeosporioides</i>	53
9. Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial radial del hongo <i>C. gloeosporioides</i> (cepa CFG-4) sometidos a diferen-	

tes dosis de soluciones de quitosan de elevado peso molecular.....	55
10. Valores promedio de incidencia de la antracnosis en frutos de papaya ocasionados por el hongo <i>C. gloeosporioides</i> (cepa 372), sometidos a dosis preventivas de quitosan, extracto etanólico de <i>L. tridentata</i> y una mezcla quitosan-Larrea.....	57
11. Comparación de medias de severidad del daño por antracnosis en frutos de papaya después de haber sido inoculados con una suspensión de esporas de <i>C. gloeosporioides</i> , y efecto inhibitorio de la enfermedad, por aplicaciones preventivas de quitosan, extracto etanólico de <i>L. tridentata</i> y una formulación de Q-L.....	58

INDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE

Cuadro	Pagina
1. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial radial a las 240 horas (10 días) del hongo <i>C. gloeosporioides</i> (cepa 372) sometido a diferentes dosis de la solución de quitosan de bajo peso molecular y dosis del extracto etanólico de <i>L. tridentata</i> así como los testigos químicos.....	75
2. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial radial a las 240 horas (10 días) del hongo <i>C. gloeosporioides</i> (cepa 372) sometido a diferentes dosis de la formulación de quitosan-Larrea y un testigo absoluto(PDA) sin extracto.....	75
3. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial radial a las 240 horas (10 días) del hongo <i>C. gloeosporioides</i> (cepa 264) sometido a diferentes dosis de la solución de quitosan de bajo peso molecular y dosis del extracto etanólico de <i>L. tridentata</i> así como los testigos químicos.....	76
4. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial radial a las 240 horas (10 días) del hongo <i>C. gloeosporioides</i> (cepa 264) sometido a diferentes dosis de la formulación de quitosan-Larrea y un testigo absoluto(PDA) sin extracto.....	76
5. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial radial a las 240 horas (10 días) del hongo <i>C. gloeosporioides</i> (cepa 322) sometido a diferentes dosis de la solución de quitosan de bajo peso molecular y dosis del extracto etanólico de <i>L. tridentata</i> así como los testigos químicos.....	76
6. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial radial a las 240 horas (10 días) del hongo <i>C. gloeosporioides</i> (cepa 322) sometido a diferentes dosis de la formulación de Quitosan-Larrea y un testigo absoluto(PDA) sin extracto.....	77
7. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial radial a las 264 horas (11 días) del hongo <i>C. gloeosporioides</i> (cepa 187) sometido a diferentes dosis de la solución de quitosan de bajo peso molecular y dosis del extracto etanólico de <i>L. tridentata</i> así como los testigos químicos.....	77

8. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial radial a las 264 horas (11 días) del hongo <i>C. gloeosporioides</i> (cepa 187) sometido a diferentes dosis de la formulación de quitosan-Larrea y un testigo absoluto(PDA) sin extracto.....	77
9. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial radial a las 192 horas (8 días) del hongo <i>C. gloeosporioides</i> (cepa CFG-4) sometido a diferentes dosis de la solución de quitosan de bajo peso molecular y dosis del extracto etanólico de <i>L. tridentata</i> así como los testigos químicos.....	78
10. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial radial a las 192 horas (8 días) del hongo <i>C. gloeosporioides</i> (cepa CFG-4) sometido a diferentes dosis de la formulación de quitosan-Larrea y un testigo absoluto(PDA) sin extracto.....	78
11. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial radial a las 192 horas (8 días) del hongo <i>C. gloeosporioides</i> (cepa CFG-4) sometido a diferentes dosis de la soluciones de quitosan de elevado peso molecular.....	78
12. Cuadro 12. Análisis de varianza de datos del porcentaje de incidencia a las 144 horas (6 días) de la antracnosis en frutos de papaya ocasionado por el hongo <i>C. gloeosporioides</i> (cepa 372) sometido a una dosis de la solución de quitosan de bajo peso molecular y dosis del extracto etanólico de <i>L. tridentata</i> así como una formulación de ambos bioproductos (Q-L).....	79
13. Cuadro 13. Análisis de varianza de datos del Grado de severidad a las 144 horas (6 días) de la antracnosis en frutos de papaya ocasionado por el hongo <i>C.gloeosporioides</i> (cepa 372) sometido a una dosis de la solución de quitosan de bajo peso molecular y dosis del extracto etanólico de <i>L. tridentata</i> así como una formulación de ambos bioproductos (Q-L).....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pagina
1. Ciclo de vida del hongo <i>C. gloeosporioides</i>	18
2. Estructura química del quitosán, quitina, y celulosa.....	24
3. Mapas de las zonas donde se distribuyen las poblaciones naturales de <i>L. tridentata</i> en el norte de México y sur de los Estados Unidos.....	28
4. Follaje de un arbusto de gobernadora (<i>L. tridentata</i>) donde se aprecian algunas características distintivas de las hojas bifoliadas, flores y frutos con su cubierta vellosa.....	29
5. Corte transversal que muestra la resina contenida en las células epidermales del haz y envés de un foliolo de <i>Larrea tridentata</i> (160 x).....	30
6. Estructura química molecular del antioxidante ácido nordihidroguaiarético.....	30
7. Efecto de las formulaciones quitosán-Larrea (extracto etanólico) en la inhibición del crecimiento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> (A) cepa 187 y (B) cepa CFG-4.....	50
8. Incidencia progresiva de la antracnosis causada por el hongo <i>C. gloeosporioides</i> en frutos de papaya cv. Maradol.....	59
9. Grado de severidad de la antracnosis causada por el hongo <i>C. gloeosporioides</i> en frutos de papaya cv. Maradol.....	60

INTRODUCCIÓN

El consumo de frutas tropicales varía considerablemente entre cada país, además fluctúa marcadamente entre y a lo largo de cada año. En general, los precios más altos se presentan de Octubre a Noviembre y los países de hemisferio sur como Brasil, Sudáfrica y Australia, tienen una considerable ventaja con respecto a otros países ya que su producción puede alcanzar mejores precios, y pueden entregar su fruta durante el otoño del hemisferio norte.

En la actualidad, los cultivos tropicales y subtropicales son una fuente generadora de divisas en nuestro país. Sin embargo, cabe señalar que existen varias limitantes que afectan la productividad de dichos cultivos, entre los que destacan los de importancia fitopatológica como es el caso de la enfermedad conocida como antracnosis, ya que este problema es uno de los factores que afectan la calidad y especialmente el precio de las frutas.

Colletotrichum gloeosporioides Penz, es el agente causal de la antracnosis, enfermedad que afecta a un amplio rango de especies vegetales y causan enfermedades en diferentes órganos y en distintas etapas fenológicas así como en pre y postcosecha. Las pérdidas de postcosecha ocasionada por este patógeno se presentan principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, incluyendo México y es el factor principal que limita la exportación de frutas debido al deterioro de la calidad de mango y otras frutas (Acosta-Ramos, *et al.*, 2003). En el caso específico del aguacate ocasiona pérdidas del 4 al 7 % en postcosecha (Vidales, 1997); en cítricos reduce el rendimiento hasta casi el 50 % (Orozco-Santos, 1984); y en mango las pérdidas fluctúan del 15 al 50 % (Becerra-Leor, 1995).

Los métodos de control que se han utilizado son principalmente el control cultural. Teniendo buenas labores culturales tales como buen drenaje del suelo, riegos bien controlados, buena densidad de plantación y eliminación de malas hierbas hospederas de patógenos. El control físico mediante el uso de tratamientos con agua caliente en función del tiempo, es otro método que se utiliza frecuentemente. Últimamente el control biológico se ha venido utilizando en muchos países del mundo debido a la ventaja que este método ofrece. Existen

microorganismos tales como bacterias del suelo y del agua que se pueden utilizar en el control biológico para reducir poblaciones de patógenos de plantas, pero estos métodos no son suficientes para el control de la antracnosis (Montes *et al.*, 2000).

Desde el punto de vista agronómico el control químico es uno de los métodos que más ha contribuido en el control de plagas y enfermedades de tipo fitopatológicos, pero también es muy controversial porque provoca serios problemas en el medio ambiente incluyendo daños al hombre, además, de la resistencia desarrollada por algunos microorganismos fitopatógenos, por lo que es necesario encontrar otras opciones menos agresivas con la ecología y los humanos para reducir las pérdidas causadas por dichas enfermedades.

Los fungicidas sintéticos se utilizan ampliamente para el control de hongos fitopatógenos, para el control del *C. gloeosporioides* o antracnosis del mango y de la papaya, se han utilizado varios fungicidas como los benzimidazoles, sin embargo, varios hongos incluyendo este, han desarrollado resistencia a fungicidas de este grupo. El fungicida benomil es uno de los más ampliamente usados, pero provocan graves consecuencias, además, *C. gloeosporioides* posee capacidad de adaptación y variabilidad extraordinaria (Acosta *et al.*, 2003).

A pesar de esto los fungicidas sintéticos son de uso cotidiano y en México se usan más de 20,000 toneladas anuales (AMIPFAC, 1993). Ante esta situación, una de las alternativas más prometedoras es el uso de los productos naturales derivados de las plantas o de otros productos biológicos. Existe información de que aproximadamente 400 plantas tienen propiedades fungicidas para contrarrestar los microorganismos fitopatógenos y se estima que muchas más producen metabolitos secundarios con propiedades biocidas para microorganismos que afectan a plantas y animales (Montes-Belmont, *et al.*, 2000).

Por otro lado, de acuerdo con Ohta *et al.* (1999) el uso de los biopolímeros derivados de la quitina (beta-(1,4)-2-acetamido-2-deoxi-D-glucosa), como el quitosán (poli-N-acetil-D-glucosamina), el cual se viene usando para aplicación foliar o en los sustratos, puede ser una buena opción para modificar positivamente el crecimiento de las plantas y para minimizar el

efecto de diversos organismos fitopatógenos. El quitosan es un derivado de la quitina el cual se obtiene generalmente en los caparazones de los crustáceos después de un tratamiento en la solución básica y alta temperatura (No y Meyers, 1995). El quitosan es soluble en ácidos débiles y puede utilizarse como agente antifúngico en jugos no pasteurizados (Roller y Covill, 1999) así como en el manejo de poscosecha de frutas (Salvador *et al.*, 1999).

El quitosan (Q) un biopolímero no tóxico, de origen natural que se obtiene por desacetilación de la quitina, siendo considerado el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza (Lira, *et al.*, 2003a), es el principal componente del exoesqueleto de muchos de los animales marinos, tales como crustáceos, cangrejo langosta, jaibas y camarones e insectos, la cual tienen aplicaciones comerciales en la industria química, para el control ambiental ya que actúan como matriz adsorbentes de iones metálicos tales como Cd^{++} , Cr^{++} , Pb^{++} y otros iones presentes en efluentes acuosos, considerando los grandes volúmenes de efluentes contaminantes provenientes de la industria y minería, de alimentos, para inhibir el crecimiento de *Brettanomyces intermedius* y *Brettanomyces bruxellensis* (potentes contaminantes en destilerías y bebidas alcohólicas), biomédicas y como biocida.

La gobernadora (*Larrea tridentata*), es un arbusto perenne de los desiertos Chihuahuenses, Sonorense y Mojave de Norteamérica, sus hojas contienen una espesa resina que se comporta como antitranspirante debido a que forma una barrera que disminuye la transpiración. Los metabolitos secundarios de la resina esta compuesta principalmente de una mezcla de ácido nordihidroguaiaretico (NDGA), lignanos, fenólicos, saponinas y flavonoides que han demostrado tener propiedades inhibitorias contra hongos, insectos, bacterias, virus, y nematodos, a demás como defensas bioquímicas para repeler la agresión de animales herbívoros, hongos y otros microorganismos, ya que no se conocen plagas, enfermedades o animales que ataquen a esta planta. (Lira, 2003d).

Dada la importancia de las enfermedades en pre y poscosecha y el uso excesivo fungicidas sintéticos, a nivel mundial se vienen buscando nuevas alternativas para contrarrestar la antracnosis. Una posibilidad viable es el uso de sustancias de origen natural tal como el quitosan (Q) y la gobernadora *Larrea tridentata* (L), ya que ambos han demostrado su

actividad antifúngica, y debido también a que contienen compuestos que son sintetizados por las plantas como defensa contra invasores o depredadores.

OBJETIVO GENERAL

Con base en lo antes señalado, el objetivo general de este trabajo fue analizar *in vitro* e *in vivo* el efecto de concentraciones de quitosan, *Larrea tridentata* y mezclas de ambos bioproductos contra cinco cepas de *C. gloeosporioides*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto antifúngico *in vitro* contra cinco cepas de *C. gloeosporioides*, de extractos de resina de gobernadora obtenidos con etanol al 30 % de sólidos totales o ingrediente activo.
2. Analizar la actividad antifúngica *in vitro* de soluciones de quitosan de bajo peso molecular contra las mismas cinco cepas del hongo antes mencionado.
3. Estudiar el posible efecto sinérgico *in vitro* de diversas mezclas o formulaciones quitosan-Larrea (Q-L) contra cinco cepas de *C. gloeosporioides*.
4. Comprobar *in vivo* en frutos de papaya, la actividad antifúngica de una mezcla Q-L, así como dosis de quitosan y extracto de *L. tridentata*.

HIPÓTESIS

Las soluciones de quitosan, extracto etanólico hidrosoluble de *L. tridentata*, así como las formulaciones de ambos bioproductos, inhibirán el crecimiento de *C. gloeosporioides* Penz con respecto al testigo absoluto (PDA) bajo condiciones *in vitro*; además reducirán la severidad e incidencia de la antracnosis *in vivo* en frutos de papaya cv. Maradol.

REVISIÓN DE LITERATURA

Antecedentes históricos de frutas tropicales

Hasta el siglo veinte las frutas tropicales han saltado al primer plano. Antes de 1900 muchas de ellas eran completamente desconocidas en Europa y Estados Unidos, además, aquellas que se conocían solo podían transportarse en determinados meses y luego se hacían completamente inasequibles durante el resto del año. El hombre no puede vivir solo de frutas, pero definitivamente deben formar parte de su dieta alimenticio (FAO, 1983). A continuación se presenta información bibliográfica que se consideró relevante para incluirse en este trabajo, la cual se relaciona con la enfermedad conocida como antracnosis causada por *C. gloeosporioides* en los cultivos de guanábana, mango y papaya.

Problemas patológicos en guanábana, mango y papaya

La guanábana (*Anona muricata*) es una de las frutas tropicales más valiosas, es de las que menos se producen a escala comercial, debido en parte a la escasa información sobre su manejo, principalmente en el aspecto nutrimental, y control de enfermedades (Sedafop, 2004). En México, en los estados de Tabasco y Chiapas el cultivo de la guanábana ha generado un interés creciente entre los productores agrícolas debido a los precios y la demanda nacional e internacional que llega a adquirir esta fruta.

La producción de guanábana en México es reducida debido a la falta de programas adecuados de fertilización y al daño de los frutos ocasionado por enfermedades (Nava *et al.*, 2000). Esta anonacea representa una buena alternativa de producción en México, ya que en nuestro país, además de contar con condiciones ecológicas adecuadas para su cultivo, se dispone de 5 clones con caracteres de alto rendimiento, resistentes a la antracnosis y los insectos perforadores del fruto, los cuales fueron introducidos a Tabasco en 1990 para su evaluación, y en 1993 se inició su propagación vegetativa, haciendo posible que el cultivo adquiriera importancia comercial y económica en los últimos años (<http://www.sedafop.gob.mx/apoyos/notas/nota4.htm>).

En la región de Centro América el cultivo de la guanábana tiene una relativa importancia que se viene incrementando en los últimos años. Loaiza y Rivera (1996) realizaron un estudio preliminar del efecto fungicida de extractos de 10 plantas sobre el hongo *C. gloeosporioides*, mediante pruebas in vitro y sobre árboles de guanábana en invernadero. Los resultados de estas investigadores mostraron que el extracto de raíz de madero negro (*Gliricidia sepium*) fue el que mostró los mejores resultados a las tres concentraciones usadas; la parte mas concentrada fue la que desarrollo mayores halos de inhibición (74.28, 68.22 y 82.73%) para los aislamientos obtenidos de hojas, brotes y flores.

En el año de 1992 se evaluó el progreso de la antracnosis (*C. gloeosporioides*) en árboles de guanábana bajo dos sistemas de manejo de la enfermedad en la zona atlántica de Costa Rica. Los resultados obtenidos respecto a este trabajo por Mora y Arauz (1996) mostraron que la tasa de infección aparente para el tratamiento químico con el fungicida sintético benomil presentó valores bajos y reduciendo la severidad de la enfermedad indicando la antracnosis es una enfermedad de ciclo lento. Por otro lado, Kitajima *et al* (1993) identificaron que los síntomas de manchas amarillas que posteriormente se tornaban necróticas en árboles de guanábana eran ocasionadas por el denominado Soursop Yellow Blotch Virus (SYBV), el cual se consideró que es un rhabdovirus transmitido por vectores de la región sur de Brasil.

Por otra parte el cultivo de mango (*Mangifera indica* L.) es en la actualidad el fruto tropical más importante después del banano y los cítricos (Coates, 2003). El mango es considerado por algunos autores como la manzana o durazno de las áreas tropicales. El 80% de la producción de mango en Australia ocurre en la provincia de Queensland. La importancia del mango en ese país se refleja en la producción del ciclo de 1998-99, ya que el valor total de la producción fue \$60.1 millones de dólares. La variedad de mango mas importante en Australia es Kensington Pride, la cual es severamente afectada por antracnosis causada por *C. gloeosporioides* y varias especies de *Dothiorella* spp, estos dos patógenos son las enfermedades mas severas de postcosecha de mango en Australia. (<http://www.tpp.uq.edu.au/commo/mango.htm>).

En Cuba se han reportado 24 enfermedades fungosas del mango, entre ellas se destaca como endémica la antracnosis *C. gloeosporioides* Penz y la mancha parda de las hojas *Pestalotia mangifera* P. Henn. que junto a otras enfermedades ocasionan pérdidas en las cosechas, sobre todo cuando las condiciones ambientales son favorables para su desarrollo. Varias especies de *Cylindrocladium* ocasionan enfermedades en diversas plantas tropicales, pero en este país no se ha tenido reportes que afecte el mango. Sin embargo en Brasil, en el año de 1996 se reportó que *C. ascoparium* es el agente causal de manchas en hojas sobre el cultivo del mango (Arnol, 1996).

Otra de las enfermedades más importantes del mango es la cenicilla *Oidium mangiferae* Berthet ocasiona pérdidas de 80 a 90% en el rendimiento e incide desde el desarrollo inicial de los frutos hasta antes del amarre (Prusky, 1991; Schoeman *et al.*, 1995). Esta enfermedad se ha reportado al Sur de Sahara, Medio Oriente, Sur de Asia, América y Nueva Gales del Sur. El hongo parasita y causa muerte de tejidos jóvenes en inflorescencias, hojas y frutos (Palti *et al.*, 1974).

Dentro del cultivo de mango en variedad Ataulfo es de gran importancia en México, principalmente en la región del Soconusco, Chiapas, siendo la producción principalmente para exportación. En esta región se tienen 18,000 ha, de las cuales 9,000 ha están en producción. Este cultivar es de interés agrícola, pues logra permanentemente un sobreprecio con respecto a otros cultivares que compiten en el mercado. Entre los cvs. de mango que más se destinan a la exportación están las variedades Haden, Tomy, Atkins, Kent, Keitt y Ataulfo (Paulin-Nava, 2000). De acuerdo con la información consignada por Sandoval *et al.*, (1993), hace más de 8 años que los productores de mango del sureste de México empezaron a aplicar nitrato de potasio (K_2NO_3) alrededor de la segunda quincena de noviembre, lo anterior con el objeto de adelantar la floración y producir una cosecha temprana que les permita obtener un mayor precio del producto (US\$30/reja).

En México la cosecha de mango normalmente se realiza durante Abril y Mayo y tiene un precio aproximadamente de 77 a 90% menor que el que se produce en la época temprana, debido a que coincide con la producción de mango en otros estados de la República. Sin

embargo, se ha observado que hay una excesiva caída prematura de flores y un reducido prendimiento de frutos. Este problema se ha incrementado año con año, a tal grado que se estima una reducción del 60% de la producción temprana de mango (Benítez-Camilo *et al.*, 2003), a pesar de que en Soconusco Chiapas, no se han determinado las causas de la reducción del prendimiento de frutos, algunos productores opinan que es ocasionado por trips y otros por hongos del genero *Colletotrichum*.

Por su parte el papayo (*Carica papaya* L.), pertenece a la familia Caricacea, cuya distribución abarca principalmente Centro y Sudamérica. La papaya es la única especie de importancia económica de dicha familia; es un árbol pequeño de madera suave, su tronco se presenta sin ramificación y de crecimiento rápido, se considera que es “casi una hierba” con vasos laticíferos (Chandler, 1958).

De acuerdo con la información consignada por la FAO (1983), los principales productores de papaya son: Brasil, Indonesia, India, México y Zaire. Existe una importante exportación desde Hawai y México hacia la parte continental de los Estados Unidos. La exportación hacia Europa esta creciendo, pero aun no ha alcanzado un volumen importante. Holanda, por ejemplo, importó únicamente 30 toneladas en 1977 y 73 toneladas en 1982, principalmente de Brasil. Hasta hace poco, Tanzania era el principal productor de papaina y los Estados Unidos el principal importador. De acuerdo con este reporte uno de los factores mas importantes que limita la exportación de los frutos de papaya, son los problemas que ocasionan las enfermedades de poscosecha.

Las enfermedades causadas por patógenos que atacan al cultivo del papayo son numerosas. Las hay desde aquellas que afectan al follaje, a la raíz y hasta los frutos. Entre los organismos causales se mencionan tanto a virus como micoplasmas, hongos, nematodos y bacterias. Algunas de ellas causadas por ciertos virus que afectan al follaje y frutos, y algunos hongos que producen pudrición de la raíz, que bajo ciertas condiciones causan la muerte de las plantas. Las enfermedades causadas por nematodos noduladores de la raíz debilitan a las plantas y reducen la producción; otras mas causadas por hongos provocan manchas en el

follaje y/o manchas o pudriciones en los frutos, reduciendo drásticamente la producción o calidad de los mismos haciéndolos no comerciales (Mosqueda, 1987).

Según ese mismo autor en México se han identificado 22 géneros de hongos causando diversas enfermedades en papayo, un genero de bacterias y virus, en este ultimo caso sin precisarse cual de los varios señalados en la literatura mundial. Actualmente en la mayoría de las regiones tropicales donde se produce papaya, la limitante mas seria la constituyen enfermedades de origen viral.

Varias enfermedades causadas por virus que atacan al papayo se menciona en la literatura. Entre los primeros informes sobre el particular se describe que en Jamaica se detectó en 1929 una enfermedad causada por virus y posteriormente ha habido informes en Santo Domingo, Australia, Puerto Rico, Guayana Inglesa, Birmania, Brasil, China, Trinidad, India, Cuba, Rodesia, Venezuela, Java, y Hawaii. En México el primer registro se hizo en 1974 (Mosqueda, 1987).

La nomenclatura de las enfermedades causadas por virus es confusa por que se ha basado mayormente en el uso de la sintomatología; pero ha habido intentos de algunos autores (Mosqueda 1987), por clarificar esta situación, sin embargo, recientemente con el empleo de las técnicas moleculares mediante PCR, es posible que pronto se puedan establecer las relaciones, principalmente entre aquellos virus del papayo transmitidos por áfidos.

Con base en la reciente información de que la variabilidad del virus conocido como VMAP en la naturaleza es muy estrecha, y de que no se ha encontrado resistencia al mismo dentro de *C. papaya*, no es difícil pensar en la presión ambiental para que ambos organismo muten es muy baja. Por otra parte, se han inducido mutantes del virus utilizando mutágenos químicos; por lo tanto, debería ponerse mayor énfasis en la inducción de variabilidad en papayo buscando resistencia al virus con la utilización de mutágenos físicos y químicos en semillas y en cultivos de meristemas (Mosqueda 1987).

En México se considera que después del VMAP, varias enfermedades causadas por hongos, le siguen en importancia económica y se encuentran atacando al papayo. Entre estas se encuentran: la antracnosis, la pudrición de la raíz, el mildiu polvoriento u oidio y la que se ha dado en llamar Cercospora, Pucciniopsis o Falsa roya.

En México, no se han cuantificado los daños causados por la pudrición de la raíz de la papaya, pero se considera la tercera en importancia en papayo. En la isla de Hawai en 1979 se estimó la pérdida de 181,000 árboles de papayo debido a una alta incidencia de *Phytophthora palmivora* Bult, durante la estación lluviosa, lo cual redujo la producción de esta fruta en 35%. Este hongo causa además cáncer en el tronco y pudriciones de frutos (Mosqueda, 1987).

De acuerdo con Storey (1972) otras enfermedades como *Pythium* sp, *Rhizoctonia* sp y *Fusarium* sp. estas tres enfermedades provocan el ahogamiento de las plántulas del papayo. Varios hongos se han asociado a la pudrición de la raíz de papayo pero desde hace algún tiempo se considera a *Phytophthora palmivora* como el principal agente causal, este el hongo se ha registrado en México como causante de la pudrición de la raíz en papayo, el cual es un fomiceto ampliamente distribuido en las regiones tropicales.

Otra de las principales enfermedades más importantes de la papaya es la antracnosis que afecta al cultivo y a los frutos maduros durante pre y postcosecha, ocasionando pérdidas significativas, considerándola como la enfermedad que ocupa el segundo lugar en importancia. En Hawai se ha determinado que aproximadamente el 17% de los frutos presentaban afección por esta enfermedad en experimentos de transporte simulado (Mosqueda, 1987).

Antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz & Sacc. in Penz].

Antecedentes históricos de *C. gloeosporioides*

La antracnosis, es una de las principales enfermedades causadas por el agente *C. gloeosporioides* y es considerado de gran importancia económica ya que infecta a un amplio ámbito de hospedantes (Manners *et al.*, 1992).

Maas (1983), utilizando el criterio de patogenicidad para diferenciar aislamientos de *C. gloeosporioides*, *C. fragariae*, *C. coccodes*, *C. trifolii*, *C. dematium*, *Glomerella cingulata* y *Gloeosporium* spp, observó que la patogenicidad varió con el aislamiento y el tejido inoculado. Por su parte, Smith y Black (1990) reportaron un interesante aislamiento de fresa, en el cual los conidióforos celulares son rodeadas por el acervulo.

En 1992 se reconocieron 900 especies de *Colletotrichum* y cerca de 600 variantes de *C. gloeosporioides* (Bailey y Jeger, 1992). Desde un poco antes Bonde *et al.* (1991), distinguieron varias formas patogénicas basadas en los hospederos específicos y características culturales.

En una investigación efectuada con cepas de *C. gloeosporioides* aisladas de mango, se observó que el 5% de los conidios fueron binucleados heterogéneos, lo que podría explicar en parte la variación observada por Alahakoon *et al.* (1992). En los aislamientos de *C. gloeosporioides* obtenidos en frutos de mango afectados por antracnosis se ha observado variación, principalmente en el crecimiento, forma y color de la colonia.

Más de 80 especies de *Glomerella* han sido descritas, pero solo pocos trabajos han sido reconocidos. *Glomerella cingulata* es frecuentemente encontrado como el estado asexual de *C. gloeosporioides*, encontrándose reportado como parásito más de 100 angiospermas. Sin embargo, solo algunas de estas especies son reportadas de importancia económica como algodón, maíz y manzana, este hongo ataca también a un gran número de plantas nativas (Alexopoulos, 1995). Este mismo autor señala que todas las especies de *Colletotrichum* producen células hialinas, ovoides cilíndricas, o conidias que se encuentran dentro de acervulos. Los acervulos algunas veces llevan setas pero estos caracteres son determinados parcialmente.

Morales-García *et al.* (1996) reportó diferentes variantes de *C. gloeosporioides*, que se obtuvieron de frutos de aguacate con diferentes tipos de síntomas y lugares de procedencia, lo que reflejó un grado de variabilidad alto entre las poblaciones de este patógeno.

Ubicación taxonómica de *C. gloeosporioides* según (Alexopoulos y Mims, 1979).

Reino	Mycetae
División	Amastygomycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Deuteromycetes
Orden	Melanconiales
Familia	Melanconiaceae
Genero	<i>Colletotrichum</i>
Especie	<i>gloeosporioides</i> Penz.

Importancia de *C. gloeosporioides* Penz.

C. gloeosporioides es el agente causal de la antracnosis, una de las principales enfermedades que ataca al cultivo y a los frutos maduros durante pre y postcosecha. Es también el agente causal de diversas enfermedades altamente virulentas que infectan las partes aéreas y causa lesiones letales en el tallo de plántulas y en los frutos de muchas plantas cultivada y nativas. Este es el caso de la planta conocida como hierba de San Juan (*Hypericum perforatum* L.), la cual se desarrolla en grandes regiones de Canadá. En algunas partes la mortalidad de plantas nativas no cultivadas de *H. Perforatum* es del 36 a 96% durante el desarrollo y casi el 50% de las plantas infectadas mueren en invierno (http://res2.agr.ca/lethbridge/weedbio/agents/acolglo_e.htm).

Esta enfermedad también afecta a plantas anuales como la malva (*Malva pusilla*), además es considerada una de las enfermedades más severas y destructivas de la planta forestal conocida como lupino (*Lupinus albus*), que se desarrolla en extensas superficies de Australia. La muerte de las plantas del lupinus debido a este hongo se encuentra en el rango de 10 a 100%, especialmente cuando no se tiene un control adecuado de enfermedades (http://www.pfc.forestry.ca/biotechnology/posters/mistletoe_e.html).

Por otra parte, el aguacate es el segundo cultivo subtropical más importante de Sudáfrica en términos de volumen exportado, sin embargo este cultivo es susceptible a diversas enfermedades de poscosecha entre las que destaca la pudrición de la punta del tallo causada por la antracnosis. Durante el invierno este patógeno persiste como micelio en materia orgánica infectada que se encuentra sobre la superficie del suelo, o en semilla infectada o contaminada. El patógeno no persiste por largo tiempo si el hospedero es incorporado al suelo después de la cosecha, ya sea con maquinaria agrícola, o de manera manual (http://www.up.ac.za/academic/microbio/plant/research/pr_postpath.html).

Coates (2003) ha venido realizando diversos estudios en los que ha encontrado una gran variabilidad de *C. gloeosporioides* en aislamiento de aguacate de la variedad Hass, en comparación con mango en huertas en ambos cultivos de Australia. Este autor ha demostrado que existen evidencias de que el aguacate tiene resistencia a *C. gloeosporioides* debido al tipo de portainjerto utilizado para prevenir las infecciones de este mismo patógeno (<http://www.tpp.uq.edu.au/disease/research/#Top>).

En las variedades de aguacate Fuerte y Hass se han encontrado enfermedades fungosas causadas por *C. cingulata* de la cual el estado conidial es *C. gloeosporioides*, dichas enfermedades se han detectado en Estados Unidos, Israel, Argentina, Australia, Nueva Zelanda, India, Sudáfrica, Puerto Rico y muchos otros países donde se cultiva el aguacate, ya sea en huertas para producción comercial o solo para autoconsumo (<http://www.hortnet.co.nz/publications/science/everavo1.htm#E11E1>).

Antracnosis es también la enfermedad más importante de la guanábana en los climas de alta humedad relativa, ya que causa una pudrición negra en los frutos y ataca en todas las etapas de desarrollo, principalmente a los tejidos tiernos. Los frutos que han sido infectados se momifican y caen. En el vivero esta enfermedad también provoca necrosis en el cuello del tallo y en las ramas terminales. Se ha observado que los árboles de guanábana que crecen en condiciones poco favorables con mal drenaje, plagas, etc., son más afectadas por la antracnosis, por lo que se recomienda un manejo adecuado de la plantación. (http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/tec_guanabana.pdf).

En el cultivo de mango *C. gloeosporioides* ocasiona una de las enfermedades mas importantes del mango, provocando grandes pérdidas por la necrosidad que causa en follajes y frutos. *C. gloeosporioides* muestra considerable variación morfológica, y patogénica que ha sido difícil definirla usando caracteres morfológicas (Ploetz, y Prakash, 2000).

En el cultivo de papaya, la antracnosis es la principal enfermedad de poscosecha de esta fruta en todo el mundo, la cual es causada por varias especies de hongos del género *Colletotrichum*, siendo la más común *C. gloeosporioides* (Castro *et al.*, 1996), este mismo autor menciona que es frecuente encontrar acervulos de *Colletotrichum* spp. en peciolo senescentes y secos de papaya en plantación, tanto en el árbol como en el suelo (http://www.mag.go.cr/congreso_agronomico_X/a50-2388-II_123.pdf).

Se sabe que la antracnosis en papaya afecta frutos en el estado de madurez para consumo, siendo esta etapa en la cual la fruta es infectada por *C. Gloeosporioides*. Durante la etapa de madurez fisiológica el fruto no muestra evidencias de infección, ya que los síntomas se desarrollan durante la fase de maduración posclimatérica, así la infección se presenta cerca de la madurez o durante el manejo de poscosecha (Morton, 1987; Dickman y Álvarez, 1983).

Distribución geográfica de *C. gloeosporioides*

Se han señalado que en la actualidad *C. gloeosporioides* es una enfermedad de muchas plantas, además es considerada como cosmopolita, es decir se encuentra ampliamente distribuida en muchas partes del mundo, sobre todo en regiones tropicales y subtropicales (Dickman y Álvarez, 1983).

Epidemiología

El hongo que ocasiona la enfermedad denominada antracnosis es la forma asexual de *Glomerella cingulata*, la cual se reproduce y se dispersa solo por conidias, las que germinan bajo condiciones apropiadas en un lapso de 20 horas para formar apresorios negros con hifas que penetra las células epidermales. Posteriormente son formadas las hifas secundarias las cuales colonizan y destruyen los tejidos de las plantas. Debajo de la cutícula se forma un

estroma hifal a partir de tejido necrótico en donde se desarrollan los acervulos en donde son producidos las conidias y los conidioforos; los cuales a su vez pueden causar una gran cantidad de ciclos secundarios de la enfermedad dependiendo de las condiciones ambientales de esa zona geográfica (http://res2.agr.ca/lethbridge/weedbio/agents/acolglom_e.htm).

También se ha demostrado que *C. gloeosporioides*, puede infectar frutos verdes de papaya en las edades comprendidas entre 4 y 14 semanas después de la antesis. Sin embargo, no se ha demostrado que cause la caída de frutos como se ha considerado en México. La forma más común de penetración es a través de la cutícula de los frutos de papaya mediante la formación de apresorios. Inicialmente las esporas germinan y forman apresorios. En la superficie del fruto el hongo por acciones enzimáticas penetra la cutícula y entonces permanece como una hifa subcuticular, hasta que el estado climatérico del fruto es alcanzado llega a infectar, aunque también se presenta penetración directa por medio de tubos germinales. En las áreas tropicales y sub-tropicales este hongo ataca frutos de mango, aguacate, plátano y cítricos. De hecho la antracnosis es solo una de las enfermedades que afectan a los frutos de papaya en poscosecha, pues hay varios hongos involucrados en este problema. (Mosqueda, 1987).

Algunos autores han señalado que los conidios del hongo germinan y producen apresorios oscuros después de las 24 horas de inoculación en fruta en madurez fisiológica (Daykin y Milholland, 1984). En frutos de papaya cultivar Kapoho solo en madurez fisiológica, se observó que los conidios germinaron y formaron un apresorio a partir de la cual una hifa infectiva penetró la cutícula vía directa después de los 3 o 4 días de la inoculación, entonces se formó una hifa entre la cutícula y la pared de la célula epidérmica. Después, el crecimiento del micelio fue intra e intercelular, las células infectadas se separaron y colapsaron y se formó una lesión hundida visible después de los 5 días de la inoculación. La cutícula del fruto se rompió durante la esporulación del hongo (Chau y Álvarez, 1983).

Estudios histológicos de la patogénesis por *Colletotrichum* en aguacate y naranja, indicaron que existen dos patrones de penetración del hongo en uno se presenta el crecimiento del tubo germinativo que penetra de manera directa la epidermis del hospedante, y en el otro, que es el más frecuente, tubo germinativo forma un apresorio y después una punta infectiva

que es la que penetra la pared periclinal de las células epidérmicas (Daquioag y Quimio, 1978). En la superficie de los frutos de cítricos y en áreas localizadas, se encontraron numerosos apresorios de *C. gloeosporioides* y varios de ellos no formaron la hifa infectiva, permaneciendo de esta manera hasta la madurez del fruto (infección latente). Posteriormente, se observaron hifas delgadas por debajo de la cutícula, intercelularmente en la epidermis, e inter e intracelularmente en 2 a 4 estratos de células del mesófilo (Brown, 1975).

Por otra parte, las condiciones ambientales como la alta temperatura favorece el desarrollo de este patógeno, siendo 28°C la temperatura óptima y alta humedad relativa alrededor de 95% es la que parece ser la mas adecuada para el desarrollo de *C. gloeosporioides*. Las esporas deben estar libres de humedad para germinar; la germinación es negligible o nula en baja humedad relativa. Las esporas son liberadas de los acervulos cuando hay una abundante humedad. La fuerte lluvia es una forma común de dispersión de las esporas. La severidad de la enfermedad está estrechamente relacionada al clima y el hongo es relativamente inactivo en clima seco. La luz solar, baja humedad y temperaturas extremas (menores a 18°C y mayores que 25°C), rápidamente vuelven inactivas las esporas para su germinación en el hospedero que ataca (Dickman y Álvarez, 1983).

En un trabajo de investigación realizado por Gutiérrez-Alonso *et al.* (2001) se estudiaron las características del crecimiento, germinación, esporulación y patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* obtenidos en frutos de mango (*Mangifera indica* L.) en diferentes regiones tropicales de México. Estos autores aislaron cepas de *C. gloeosporioides* de frutos de mango afectados por antracnosis y colectados en las regiones productoras de Veracruz, Sinaloa, Michoacán, Guerrero, y Chiapas, para comparar su crecimiento, esporulación y patogenicidad. Un análisis discriminante probó la existencia de grupos diferentes, basándose en la tasa de germinación (TG) y pruebas de patogenicidad (% de severidad) en frutos. El aislamiento Sinaloa presentó los valores mas altos de TG (6.8% germinación/h) y 94% de severidad. En contraste, el aislamiento Veracruz 1, presentó 0.19% de TG, no obstante mostró una severidad de 100% en frutos. El aislamiento Michoacán presentó un comportamiento similar a Veracruz 1, excepto que ocasionó una severidad de solo 22%. El aislamiento de Chiapas presentó una TG de 3.9% y ocasionó una severidad de daño

similar a la de Michoacán; mientras que la TG de los aislamientos de Veracruz 2 y Guerrero fueron de 6.7 y 5.3%, respectivamente, pero no fueron patogénicos. Este comportamiento diverso entre los diferentes aislamientos sugiere tasas de crecimiento, patogenicidad, esporulación y una variabilidad genética elevada en *C. gloeosporioides* de acuerdo con su lugar de procedencia geográfico.

Sintomatología

Por otra parte, *C. gloeosporioides* es considerado como un hongo facultativo que pertenece al orden de Melanconiales, este hongo produce conidias hialinas unicelulares de ovoides a oblongas y poco curvadas las cuales miden de 10 a 15 micras de longitud y 5 a 7 micras de ancho. Las masas de conidias son de color rosa a salmón, forman cuerpos fructífera llamado acervulos que son cerosos y son producidos en tejido infectados, son subepidermales, típicamente tiene setas que son simples, cortas y con conidioforos erectos. Los pecíolos de papayas pueden soportar abundantes desarrollos de *C. gloeosporioides* y su estado perfecto *Glomerella cingulata*. Sin embargo, los aislamientos de pecíolos cuando son usados para inocular frutos no causan la típica antracnosis que se caracterizan por producir manchas color chocolate o las lesiones de color gris en forma de depresiones sobre la epidermis del fruto (Dickman y Álvarez, 1983).

Los primeros síntomas de la antracnosis de la papaya son secciones redondas, ablandadas y hundidas en el fruto maduro, las zonas infectadas aparecen pequeñas áreas acuosas que se agrandan a medida que avanza la maduración de la fruta y llegan a alcanzar hasta 5 cm de diámetro, las síntomas también pueden aparecer como círculos irregulares de 10 mm de diámetro, en frutas demasiado maduras esta lesión crecen rápidamente (arriba de 20 mm de diámetro) severamente definido, en algunas ocasiones se detectan ligeros hundimientos en color café rojizo o negruzco (Dickman y Álvarez, 1983).

En las lesiones se producen masas conidiales o de esporas de color rosado o salmón que en ocasiones aparecen como anillos concéntricos. Posteriormente el hongo penetra hacia el interior de la pulpa, oscureciendo su color haciéndola más suave los tejidos que la rodea

impartiéndole un sabor desagradable. Con el tiempo se forma una separación entre los tejidos infectados y los tejidos sanos. Después la porción enferma puede levantarse con facilidad conocida como síntomas de la mancha chocolate. Dado el tipo superficial de la infección, las manchas son diferentes de las anteriores, la coloración de las lesiones varían de café rojizo conforme avanza la infección (http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/c_gloeo.htm).

Ciclo biológico de *C. gloeosporioides*

El ciclo de vida de este hongo que provoca principalmente enfermedades en cultivos hortofrutícolas durante poscosecha se presenta a continuación:

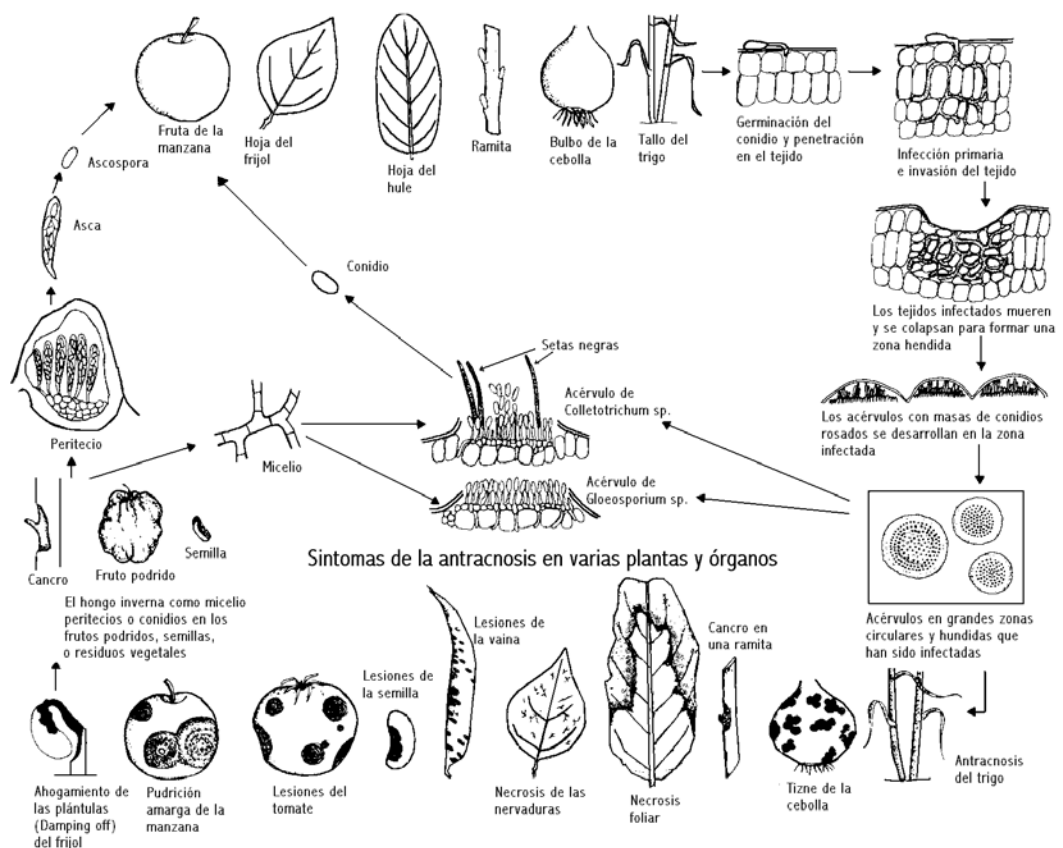


Figura 1. Ciclo biológico de *Colletotrichum* sp. como estado imperfecto de *Glomerella cingulata* y *Gloeosporium* sp. similar a *Colletotrichum* sp. (Agrios, 2001).

En la Figura 1 se presenta el ciclo biológico (Agrios, 2001) del estado imperfecto del patógeno conocido por *Colletotrichum* sp, así como el estado perfecto denominado *Glomerella*

cingulata, el cual resulta ser similar que *Gloeosporium* sp. En el esquema de la figura mencionada se presenta la infección que *C. gloeosporioides* puede realizar en diferentes tipos de plantas, así como en diferentes órganos de las mismas.

Métodos de control de *C. gloeosporioides*

El control de la antracnosis es difícil debido a que las infecciones ocurren desde el campo y es importante mantener un programa continuo de aspersiones de fungicidas desde las etapas iniciales de crecimiento de los frutos, ya que el control químico es el más empleado; por ello se presenta una revisión del mismo.

Control químico. Un tratamiento popular es el que se aplica con el fungicida sintético Maneb y agua caliente durante 20 minutos a una temperatura de 45°C, esto se emplea contra la antracnosis en diversos frutos; en muchos casos también se llega a aplicar zineb en caso de contar con la presencia de otros hongos (Storey, 1972).

De acuerdo con la Agency for Food and Fibre Sciences, en Australia las enfermedades más severas del mango son causadas por hongos. El control de la antracnosis antes de la cosecha se realiza mediante aspersiones de Mancozeb, las cuales se aplican cada semana durante la floración, y después cada mes hasta 14 días antes de la cosecha. Los productores de mango de Australia también utilizan el producto Prochloraz para el control de esta enfermedad, el cual se aplica cada 3 o 4 semanas. Para el control de la antracnosis durante postcosecha en Australia también se usa el Carbendazim, para lo cual sumergen los frutos de aguacate después de 24 horas de haberse cosechado por 5 minutos en agua caliente (52°C) a la cual se le han agregado 100 ml de Carbendazim en 100 litros de agua. Si la temperatura del agua se reduce por debajo de los 52°C también se reduce significativamente; por lo que la temperatura debe ser cuidadosamente controlado en el rango de 0.5 °C para prevenir el daño del fruto (<http://www.dpi.qld.gov.au/horticulture/5306.html>).

De acuerdo con lo reportado por Grant *et al.* (1997) el tratamiento poscosecha de mango con prochloraz en agua caliente es muy eficaz en el combate de la antracnosis causada

por *C. gloeosporioides*. Estos autores reportan que en un experimento realizado por ellos se evaluó el efecto del pH del agua sobre la eficacia y duración de la actividad del fungicida antes mencionado. Estos autores trataron mangos con prochloraz a 250 ppm en agua a 53°C por tres minutos. El pH de las suspensiones fungicidas se ajustó a una alcalinidad en el rango de 4 a 7 con HCl. Diferentes grupos de fruta se sumergieron en la suspensión a los 25, 125, 315 y 425 minutos de preparado el caldo fungicida. La severidad de la antracnosis fue de 10.21% de área enferma en la fruta sin tratar y en la fruta tratada varió de 0.35 a 1.95%. La severidad disminuyó con el pH de las suspensiones, estabilizándose a un pH de 5.0, lo cual indica que este punto fue mejor para tratamiento contra la antracnosis (<http://www.ots.ac.cr/rdmcnfs/datasets/viewrec>).

Para el control químico de la antracnosis en guanábana pueden usarse el benomyl (Benlate, 15 g/16 l), captafol (Difolatán, 45 g/16 l), mancozeb (Dithane, M-45 60 g/16 l), oxiclورو (Cupravit, 60 g/16 l), así como las mezclas de estos productos, aplicándolos cada 10 días cuando el ataque es severo o cada 30 días cuando la incidencia es baja o durante la época seca. Se ha determinado una relación estrecha entre el ataque de la antracnosis, principalmente durante la época lluviosa, por lo que combatir la enfermedad ocasionada por *C. gloeosporioides* conlleva a la disminución de otras enfermedades de poscosecha (<http://www.sedafop.gob.mx/apoyos/notas/nota4.htm>).

Control no químico. El control no químico de esta enfermedad se realiza mediante inmersiones en agua caliente a 48°C por 20 minutos para reducir la incidencia de la antracnosis en papaya, sin embargo, esto no elimina completamente la enfermedad. La antracnosis es controlada en frutos maduros o muy maduros cuando son vendidos directamente del campo o en mercados locales, sin refrigerarlos, y lo más importante es cuando las frutos han sido refrigerados y luego exportados a otros mercados (Dickman y Álvarez, 1983). En años recientes otros tratamientos en frutos se han venido realizando con productos orgánicos inocuos para la salud humana y que representan una alternativa tecnológica para la prevención y control de enfermedades; uno de estos productos de gran interés en países asiáticos y otras partes del mundo es el biopolímero quitosan.

Generalidades del biopolímero quitosan

Antecedentes

El quitosan, derivado por desacetilación de la quitina muestra una actividad antimicrobial contra algunas bacterias, hongos filamentosos y levaduras (Savard *et al.*, 2002). En los últimos años los polímeros biológicos han tomado gran auge por sus diversas aplicaciones así como ser materiales biodegradables que no dañan a la naturaleza. La biodegradación es un proceso natural en la cual los compuestos orgánicos son convertidos en componentes simples y redistribuidos a los ciclos elementales, como el de carbono y nitrógeno (Chandra *et al.*, 1998).

La quitina es un biopolímero natural muy abundante en la naturaleza, junto con otros componentes (proteínas y sales minerales, aparecen como constituyentes estructural de los artrópodos, hongos y algas unicelulares (Srinivasan, 1998). Gracias a los avances en biotecnología, la quitina y el quitosan representan un gran reto para la comunidad científica e industrial, ya que son una fuente de materiales renovables y biodegradables (Lason-Tsigos *et al.*, 2000).

Hoppe-Seyler obtuvo quitosan a partir de quitina en 1894, mezclando quitina con KOH a 180°C. Este quitosan se reporta soluble en una solución acuosa de ácido acético. Posteriormente, Kunike (1926) reportó un método para obtener quitosan de la quitina, señalando también que el quitosan es fácilmente solubles en asidos diluidos. Se conoce que el quitosan es soluble en ácidos fórmicas, acético, cítrico al 10%, pirúvico y láctico (Muzzarelli, 1973).

En estudios de postcosecha, el quitosan se ha visto que mantiene la calidad de frutas y vegetales, reduciendo las tasas de respiración, producción de etileno y la transpiración (El Ghaouth, *et al.*, 1992a,b; Li y Yu, 2000). Otro importante atributo de este compuesto natural es que está asociado con propiedades fungistáticas o fungicidas contra patógenos de varias frutas y vegetales.

El crecimiento de importantes hongos de poscosecha como *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer* y *Penicillium* spp. es inhibido en medios nutritivos con varias concentraciones de quitosán (Hirano y Nagao, 1989; Benhamou, 1992; Reddy *et al.*, 1997; Bautista *et al.*, 1999). En estudios *in vivo*, El Ghaouth *et al.* (1991;1992b) reportó que el quitosán tiene un efecto fungicida en fresas contra *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*. Por su parte, Luna *et al.* (2001) consignó que la pudrición de las frutas cosechadas es menor cuando la papaya fue sumergido en soluciones de quitosán comparado con otro tratamiento de poscosecha tal como calentamiento y aplicaciones de Tiabendazol.

Usos del quitosán y mecanismo de acción

Se han efectuado numerosos investigaciones que comprueban la utilidad de la quitina y el quitosán en la industria farmacéutica, cementos, agentes quelatantes de metales pesados y solventes (Rathke, 1994).

Debido al desarrollo de microorganismos nocivos para las plantas, humanos y animales, se han buscado el uso de compuestos químicos que dejan residuos tóxicos y causan resistencia en los microorganismos, se han buscado nuevos métodos naturales para prolongar la vida de anaquel de los alimentos. El quitosán es un biopolímero catiónico capaz de inducir la producción de moléculas de defensa (quitosanasas, quitinasas, glucacanasas) en tejidos vegetales, por lo que es considerado como un conservador natural. No obstante, los mecanismos por los cuales el quitosán inhibe el crecimiento de hongos, se ha considerado que son debido a que deforman las células al destruir las paredes y membranas de las mismas (El Ghaouth *et al.*, 1991).

El quitosán es un polisacárido, producido por desacetilación alcalina de la quitina, es eficaz para el control de pérdidas de poscosecha actuando sobre la senescencia y promueve una inducción sobre el incremento de la actividad de las enzimas al igual que la quitinasa y β -1,3-glucanasas, y al ácido 2,6-dicloroisocotínico que tienen sistemas de inducción que le permiten a la planta adquirir resistencia contra patógenos. Sin embargo, son pocos los estudios que se tienen en cuanto a la habilidad que estos inducen sobre los frutos evitando la descomposición para prolongar su vida de anaquel. Por lo tanto, lo anterior es muy importante

y es una forma manejable, para evitar la descomposición de frutos y vegetales cosechados (de Capdeville *et al.*, 2002).

También se ha demostrado que algunas plantas como el frijol cuando son sometidas a algún tipo de estrés reacciona produciendo quitinasa como un medio de defensa natural de la planta (Gaynor, 1985). La actividad de la quitinasa aumenta cuando se añaden al suelo enmiendas que contienen quitina y las bacterias quitinolíticas tienen la capacidad de destruir las paredes celulares de los hongos fitopatógenos (Haywards y Stirling 1988).

Por otra parte, hay evidencias de que el modo de acción de la quitina se debe principalmente a la producción de amonio durante el proceso de descomposición. Además es un material que contiene nitrógeno, el cual es degradado por la hidrólisis, y posteriormente se convierte en ácido acético y glucosamina, que libera amonio (Rodríguez-Kabana y Morgah-Jones 1985).

Algunas propiedades Químicas del Quitosan

Algunas propiedades químicas de este biopolímero son las que se señalan en el Cuadro 1, en el que se muestra el peso molecular del mismo cuando este se encuentra en su forma normal y cuando se ha polimerizado.

Grado de polimerización (GP)	Peso molecular
Quitosan original (no polimerizado)	1.2 Mda
GP101	10kDa
GP42	7 kDa
GP25	4 kDa
GP8	1.3 kDa
GP3	0.5 kDa

Otra de las propiedades químicas del quitosan es que son materiales que contienen compuestos nitrogenados lo cual estos se degradan por hidrólisis, que después se convierte en ácido acético y glucosamina lo cual libera amonio (Rodríguez-Kabana y Morgah-Jones 1985). Una importante propiedad química para la quitina y el quitosan es la variabilidad en el peso molecular entre especies de los especímenes preparados para una descalcificación única. El peso molecular promedio reportado para la quitina es de 0.4 a 1.96×10^6 a 2.5×10^6 daltones (Rathke y Hudson, 1993).

En su conjunto la quitina y el quitosan han adquirido un gran interés comercial debido a su alto contenido de nitrógeno (6.89%), comparado al sustituto sintético de celulosa (1.25%). Esto convierte a la quitina en un útil agente quelatante (Rathke, 1994).

Formula química del quitosan, quitina y celulosa

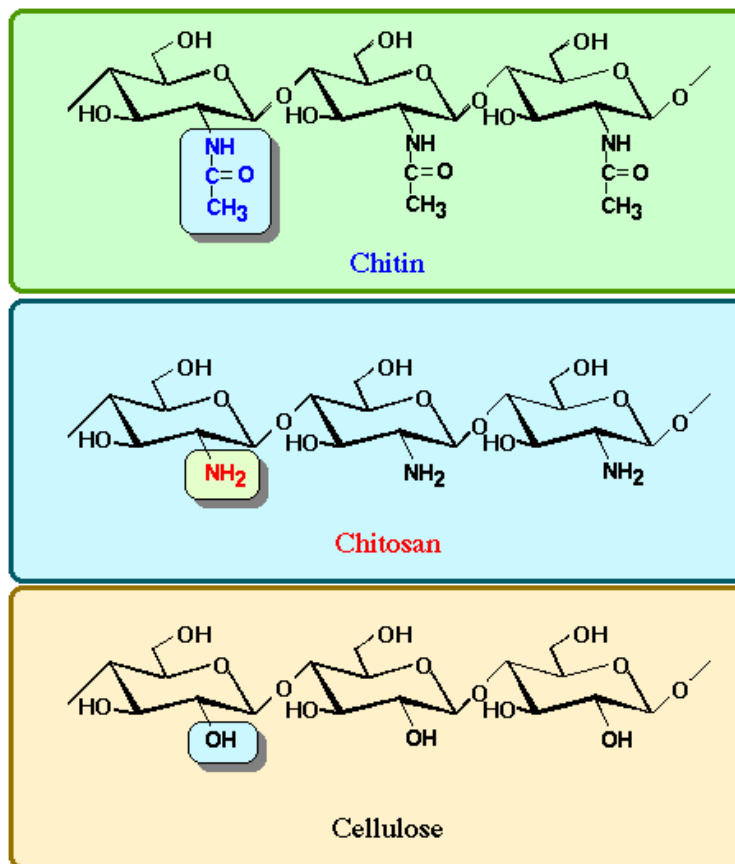


Figura 2. Estructura química del biopolímero quitosan, quitina y la celulosa.

De manera general, el quitosán es un polisacárido, producido por desacetilación alcalina de quitina poly- β -(1-4-N-acetil-D-glucosamina, es también uno de los polisacáridos más abundante en la naturaleza la cual muestran una actividad antimicrobial. Además se considera un derivado de la celulosa, aunque no se encuentra en organismos que producen celulosa. Se puede definir como un biopolímero parecido a la celulosa, que se encuentra presente en forma natural, especialmente en invertebrados marinos, insectos, hongos, y levaduras (Austin *et al.*, 1981). Especialmente se encuentra en la concha de los crustáceos como langostas, jaibas, y camarones, la quitina obtenida en crustáceos de diferentes especies y colores muestran una variación en el peso molecular, lo cual indica una estrecha relación con el método de descalcificación (Brian and Austin, 1981).

Antecedentes históricos sobre la actividad biocida de algunas plantas

A lo largo de la historia, las plantas fueron usadas como agentes microbiales antes de la llegada de los antibióticos. A inicio del siglo XVII, en Alemania, se usaban 78 plantas en el tratamiento para infecciones (Ramsta, 1959). Entre estas 78 plantas, 65 de ellas tienen y muestran actividad antibacterial *in vitro*. Muchas de las plantas pueden ser usados en el tratamiento contra enfermedades tales como cólera, tuberculosis, y disentería entre otras (Tokin, 1942; Chen y Chen, 1933). En América algunas tribus nativas usaban ciertas plantas en el tratamiento de sífilis (Waller, 1942). La revista de Tokin (1956) llamada "Fitocida" discutía la actividad antimicrobial de las sustancias obtenidas de las plantas.

Las actividades antimicrobiales y/o citotóxicas se encuentran en una extensa variedad de plantas (Berdy *et al.* 1982). A parte de los antibióticos, un amplio número de agentes antimicrobiales son elaborados a partir de plantas. Aproximadamente 1300 agentes antimicrobiales y/o compuestos citotóxicos pueden ser extraídos de las plantas. Estas sustancias antimicrobiales son principalmente de cadenas heterocíclicas (alcaloides, flavonoides), alicíclicos (terpenoides y esteroides) y aromáticos (fenoles y lignanos). En general, la actividad farmacológica de la planta es promovida por compuestos similares, una de las características de estos compuestos es que son citotóxicos (Crevar, 1970).

Wilson *et al.* (1964) investigaron los extractos de 125 especies de plantas, encontrando que 45 de estos extractos mostraron actividad contra bacterias, levaduras y hongos. Jui (1966) estudió los extractos de 94 especies de plantas medicinales de México y reportó que un amplio número de estos extractos, incluyendo extractos en alcoholes de *L. tridentata* son activos contra hongos. Según Bhakuni *et al.* (1968), más de 300 plantas tienen propiedades antimicrobiales contra cánceres y hongos, mientras que otras tienen actividad farmacológica.

Algunos efectos bactericidas y anticancerígenos pueden ser encontrados en aceites esenciales que contienen las plantas tales como ajo (Hu *et al.* 2002), rábanos (Kienholz y Kemper, 1960), en *Artemisia tridentata* (Nagy y Tengerdy, 1968), aceites de cítricos (Subba, Soumithrl, y Rao, 1967). Masquelier (1958) describió las propiedades bactericidas de fenoles de plantas contra *Salmonella Typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Escherichia coli*, y *Staphylococcus pyogenes*. Por su parte los flavonoides son asociados con la resistencia de plantas a enfermedades (Harborne, 1967). Los flavonoides se cree que tienen propiedades fungistáticas y fungicidas (Helgert, 1962). Algunas sustancias de *A. tridentata* y *L. tridentata* muestran actividades antimicrobiales (Ramírez, 1969).

Características generales de la gobernadora (*Larrea tridentata*)

Las zonas áridas representan un gran potencial por que guardan una riqueza basado no tanto en su densidad, como en su especialización biológica, donde la flora y fauna son el producto de miles años de adaptación fisiológica para su sobrevivencia. Un caso típico es de estas condiciones lo representa la gobernadora *Larrea tridentata* (D.C.) Coville de la familia Zygophyllaceae esta especie perenne es la más ampliamente distribuida en las zonas áridas de los desiertos Mojave, Sonorense y Chihuahuense (Barbour, 1969). Comúnmente en México se le conoce con el sugestivo nombre gobernadora por su denominación en las grandes extensiones de las zonas áridas del norte de México. Pero también se le conoce como sonora, tasajo, jarilla, y hediondo o hediondilla por el peculiar que tiene, sobre todo después de una lluvia (Brinker, 1993).

Las hojas de este arbusto xerófito están envuelta en una gruesa capa de resina producida por tricomas glandulares durante el desarrollo de las hojas y puede llegar a formar parte del 20% del peso seco de las hojas (Rhoades, 1977) o mas (Lira-Saldivar *et al.*, 2003^a) la resina tiene la propiedad de hacer menos digestivo el follaje, de manera similar al efecto que producen los taninos (Rhoades, 1977); también se comporta como un antitranspirante ideal debido a que forma una barrera en la superficie de las hojas que disminuye la transpiración mas que las tasas de asimilación de CO₂ (Meinzer *et al.*, 1990; Gonzáles-Coloma *et al.*, 1994). Se considera que la resina funciona como un filtro contra la radiación solar UV. y protege a la planta contra el hervivorismo de insectos y animales (Barbour *et al.*, 1977); Downum *et al.*,1988).

Los arbustos de *Larrea tridentata* enfrentan fuertes presiones de animales herbívoros, debido a que las hojas están siempre verdes durante los meses del año sin lluvia, época en que son pocos los recursos vegetales que pueden encontrar insectos y animales: sin embargo, el herbivorismo en *Larrea* es limitado, probablemente debido a los metabolitos secundarios como los biopolímeros fenolicos y el ácido nordihidroguaiaretico (NDGA) que se encuentran presentes en la resina producidas en hojas y tallos, los cuales resultan ser defensas bioquímicas para repeler el ataque de animales herbívoros, hongos y otros microorganismos (Valesi *et al.*, 1972; Wisdom *et al.*, 1987; Rundel *et al.*, 1994).

Distribución geográfica

L. tridentata denomina aproximadamente 17.5 millones de ha desde el oeste de Texas hasta al sur de California en los Estados Unidos (Duisberg, 1952). Su rango en el desierto Mojave va desde la parte sur de California y Nevada a la parte central de Arizona y Nuevo México, limitado por heladas invernales o lluvias excesivas de invierno. En la republica Mexicana, la gobernadora se encuentra en la parte del Desierto Sonorense, incluyendo los estados de Baja California Norte, Baja California Sur, y Sonora y en el Desierto Chihuahuense incluyendo los estados de Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Zacatecas, San Luis Potosí y Durango. Se estima que 25% (500,000 km²) del territorio nacional esta cubierto con este arbusto de las zonas áridas (Belmares *et al.*, 1979).

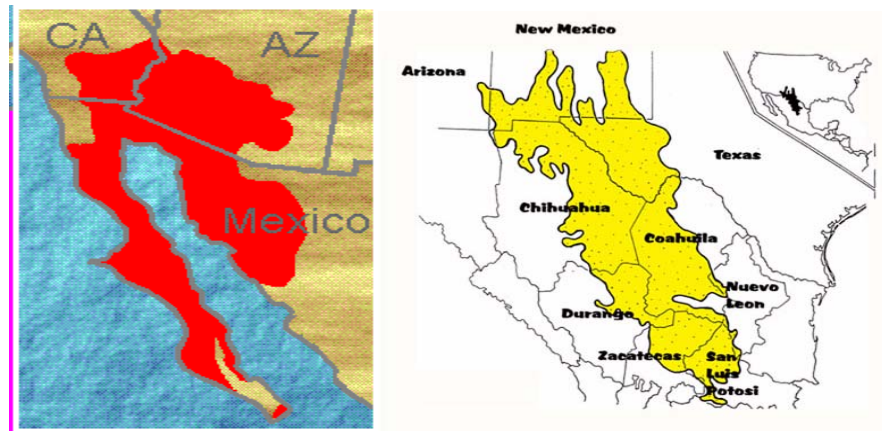


Figura 3. Representación gráfica del norte de México y sur de los Estados Unidos donde se distribuyen las áreas naturales de *Larrea tridentata*.

Las razas de esta especie caracterizan por ser diferentes en su número cromosómico, ya que las plantas del Desierto Chihuahuense son diploides ($n=13$), las de Sonorense son tetraploides ($n=26$) y las del Mojave son hexaploides ($n=39$) (Sakakibara *et al.*, 1976; Mabry *et al.*, 1977). Su rango de adaptación en elevación es de menos del nivel del mar en el valle de la muerte en California, hasta más de los 2,500 m en las sierras del norte de México (Van Deavender, 1990). Crece bien en planicies secas y masas, rodeando colinas y declives, y en varios tipos de suelos, excepto arcillosos, salinos o graníticos (Shreve y Wiggins, 1964). Su crecimiento ampliamente distribuido en áreas generalmente consideradas como improductivas, ha conducido a hacer estudios de su potencial valor comercial. Se ha estimado que la gobernadora representa una fuente potencial de más de un millón de toneladas de forrajes secos y unas 100,000 toneladas de resina con un rendimiento anual sostenido cuando se coseche cada 2 a 4 años (Duisberg, 1952).

Descripción botánica

L. tridentata es un arbusto perenne xerófito siempre verde. Su edad puede exceder los 100 años, aunque algunas plantas pueden sobrevivir cientos o miles de años a través de reproducción vegetativa asexual, ya que las raíces producen brotes o retoños que después se convierten en nuevas plantas. La edad se determina por el tamaño de la corona radicular. La

raíz crece solo cerca de 170 cm hacia abajo, pero se ramifica hasta mas de 4 m lateralmente (Brinker, 1993). El tamaño de la planta varia de 0.5 a 4 m en altura dependiendo de la lluvia del invierno o verano y al altura promedio varia de acuerdo a su raza de ploidía (diploide 86 cm, hexaploide 112 cm y tetraploide 138 cm). No hay un tallo principal, pero las ramas gruesas crecen vertical u oblicuamente desde la corona radicular y se hace dicotomica lateralmente (Coyle y Roberts, 1975).



Figura 4. Follaje de un arbusto de gobernadora (*Larrea tridentata*) donde se aprecian algunas características distintivas de las hojas bifoliadas, flores y frutos con su cubierta bellosa. (Tomado de Lira-Saldivar, 2003).

Las hojas son pequeñas y bifoliadas, de un verde oscuro a verde amarillento con cutículas gruesas y una capa resinosa, tiene pecíolos cortos y crecen opuestas en las ramas. Las flores son amarillas, usualmente aparecen al final del invierno o principios de la primavera, pero pueden florecer en cualquier momento después de una lluvia; crecen cerca de las terminaciones de los retoños como capullos solitarios con cinco pétalos (Fig. 4) y su polen y néctar atraen muchas abejas (unas 30 especies diferentes). Los frutos son pequeños (4 a 7 mm de diámetro), tienen una cubierta vellosa y contienen cinco semillas que se esparcen en primavera y al principio del otoño por el viento y la lluvia (Shreve y Wiggins, 1964; Coyle y Roberts, 1975).

Constituyentes fitoquímicos y usos de *L. tridentata*

Los principales compuestos en la resina de *L. tridentata* reportados en la literatura son numerosos, sin embargo se presenta un resumen de los más importantes. Destacan por su mayor contenido en base al peso del follaje los lignanos fenolicos, seguidos por las saponinas, flavonoides, aminoácidos y minerales. El compuesto más importante que se encuentra en la resina de las células cercana a las capas epidermales superior e inferior de las hojas y tallos es el ácido nordihidroguaiaretico [(NDGA) (Fig.5)].

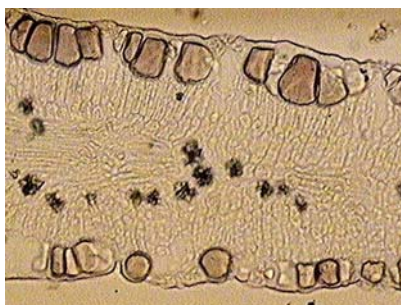


Figura 5. Corte transversal que muestra la resina contenida en las células epidermales del haz y envés de un foliolo de *Larrea tridentata* (160 x). (Tomado de Lira-Saldivar, 2003).

El NDGA es uno de los antioxidantes mejor conocido (Seigler *et al.*, 1974), químicamente se le ha descrito como beta gamadimetil-alfa,delta-bis (3,4-dihidroxifenil) butano. Se ha determinado que este ácido tiene propiedades como antioxidante, antiinflamatorio, citotóxica, antimicrobial e inhibidor de enzimas (Mabry *et al.*, 1977; Fernández, 1979; Brinker, 1993). Este fuerte antioxidante se presenta en todas las especies híbridos de *Larrea*, habiendo una ligera deferencia en concentraciones entre las razas de ploidia

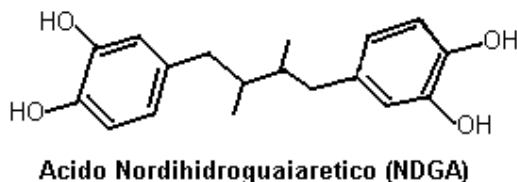


Figura 6. Estructura química molecular del antioxidante ácido nordihidroguaiaretico.

Uno de los atributos más importantes de *L. tridentata*, es que tienen propiedades medicinales y uno de los ingredientes activos de es el ácido nordihidroguaiarético (NDGA), el cual tienen propiedades antioxidantes, antimicrobiales, antiparásitos y citotóxicos; además la gobernadora es rica también en otros compuestos como fenoles y flavonoides (Waller, 1942; Lundberg *et al.*, 1944).

Cuadro 2. Principales constituyentes fitoquímicos de *Larrea tridentata* (Brinker, 1993).

Peso seco (%)	Tipo	Compuesto
16-21	Lignan Fenólicos	Ácido Dihidroguaiarético Hemi-nosisoguaiacin Ácido nordihidroguaiarético Nordihidroguaiacin
5-7.5	Flavonoides	Apigenin Kaempferol
10-15	Saponinas Triterpenos	Larreagenin A Asido Larreico
0.1-0.2	Monoterpenos Volátiles Hidrocarburos 35	Alpha pinene Delta-3-carene limoneno
	Aromáticos	Benzaldehído Benzilbutano Benzilbutano Metil naftaleno
	Esteroides	Beta-sitosterol Colesterol Campesterol
	Taninos Carbohidratos	Glucosa Sucrosa
70.1 (de tallos) 16.6	Lípidos Aminoácidos	Alkil esterres (C43-C56) Fenilalanina Isoleucina Ácido glutámico Ácido aspártico Glicina

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización y actividades experimentales

El trabajo experimental se llevó al cabo en los laboratorios del Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), ubicada en Blvd. Enrique Reyna Hermosillo No. 140, Saltillo, Coahuila, México, C.P. 25100. El experimento consistió en dos fases; en la primera se evaluó *in vitro* el quitosán (Q), el extracto de *Larrea* (L), así como la formulación de ambos bioproductos contra cinco cepas de *C. gloeosporioides*. La segunda fase de este trabajo de investigación consistió en la evaluación *in vivo* del quitosán, Larrea y mezclas Q-L sobre una cepa de *C. gloeosporioides* en frutos de papaya maduros cv. Maradol.

Extracción de la resina

Se realizó mediante la técnica de inmersión en contenedores Lira *et al* (2002), a los que se agregó al solvente indicado, hasta obtener un licor resinoso, la resina se separó del solvente remanente en un reactor Brighthon modelo X 1000. Posteriormente, la resina concentrada se procedió a hidrosolubilizar, lo anterior de acuerdo a la metodología reportada por Lira *et al* (2002).

Muestreos para la obtención de los patógenos

La obtención de las cepas del hongo *C. gloeosporioides* fueron proporcionadas por el Ing. Jesús Cruz Blasí del Centro de investigación Ecosur, ubicado en Tapachula, Chiapas. Las muestras se obtuvieron en plantaciones de mango de partes vegetativas como hojas, flores y frutos en la variedad de mango Ataulfo. También se obtuvieron de frutos y pecíolos de hojas de papaya variedad Maradol y criollos; así como de frutos de guanábana con síntomas de antracnosis procedentes del estado de Chiapas. Para aislar al patógeno de los frutos, hojas y flores, previamente se tomaron trozos de tejido enfermo y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5% durante 2 minutos.

Los aislamientos monospóricos obtenidos de los frutos de papaya, guanábana y mango se obtuvieron mediante la remoción de la cáscara del fruto y puesto a secar para inducir a formación de acervulos. Una vez formadas los acervulos se pasaron a la cámara húmeda para inducir la esporulación, posteriormente se tomó una masa de esporas y se hizo el aislamiento a través de la siembra por dilución-dispersión; en los tubos con agua destilada previamente esterilizados se hizo la dilución agitando constantemente, se tomaron una a dos gotas con una micropipeta y se dispersó en el medio extracto de malta (EMA), con un triángulo de vidrio estéril sin flamear, el cual se pasaba a más cajas para hacer una dispersión más grande, después de esto a las 20-24 horas, se revisaba en un estereoscopio la germinación de las esporas y se tomaban aquellas aisladas con una aguja estéril y se transfería al medio extracto de malta (EMA).

La mayoría de los aislamientos de fruto de papaya fueron realizados a través de la extracción de muestras con sacabocados de frutos tiernos, medianos, y sazones, luego de ser desinfectados, se transfirieron directamente a medio EMA poniendo la cáscara en contacto con el medio. Los aislamientos tanto de hoja, flor de mango así como hoja, pecíolo y flor de papaya se colocaron directamente en una sección del tejido dentro de una cámara húmeda por 20-24 horas y se observó a través de un estereoscopio; posteriormente, con una aguja se tomó una masa de esporas sembrando por solución-dispersión como anteriormente se mencionó.

Descripción de la morfología colonial de cepas aisladas

Las cepas de *C. gloeosporioides* que fueron aisladas se marcaron con una clave para posteriormente poder describir o diferenciar en cuanto a la morfología colonial. A continuación se describen las cepas que se usaron en los experimentos:

- 1) Cepa 372 “fruto de papaya” micelio de color gris claro aéreo con formación de ascomas oscuros y mucha formación de masas de esporas de color negro claro.

- 2) Cepa 264 “pecíolo de la hoja de papaya” micelio blanco, aéreo ligeramente salmón, centro salmón mas pigmentado que la orilla, formación de ascomas oscuros en el centro y formación de masas de esporas de color naranja.
- 3) Cepa 322 “fruto de mango” micelio de color oscuro aéreo con formación de ascomas oscuros y masas conidiales de color transparente y gris.
- 4) Cepa 2CHM6-187, “hoja de mango” micelio de color oscuro aéreo con formación de ascomas oscuros y masas conidiales de color transparente y gris.
- 5) Cepa CFG-4, “fruto de guanábana”, cultivo monosporico, con características visibles en micelios de color blanco algodonoso con formación de pocos ascomas oscuros en el centro y masas conidiales de color naranja.

Los aislamientos estuvieron guardados en tubos de ensaye con agua destilada y papel filtro estéril, ya que así pueden conservarse hasta por 5 años en refrigeración (4°C).

Reactivación del patógeno

Para el desarrollo del experimento, las cepas de *C. gloeosporioides* conservadas en tubos de ensaye y previamente seleccionadas fueron reactivados en el Centro Internacional de Servicios Fitosanitarios (CISEF) y en el CIQA, Para reactivar las cepas se usaron pinzas de punta fina o agujas, al momento de sacar una pizca de micelio sobre el papel , se eliminó el exceso de agua y luego se transfirió al medio de cultivo PDA donde *C. gloeosporioides* creció muy bien a un pH 5.6 y a temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$. Una vez reactivados se aseguró que contáramos con suficiente material para los estudios posteriores.

Identificación del patógeno

Para identificar el patógeno se indujo el crecimiento micelial y la esporulación en PDA, una vez que el crecimiento del hongo llenó la caja petri y produjo esporas, se hizo

nuevamente la descripción de la morfología colonial, posteriormente se realizaron las preparaciones de montajes en porta y cubre objetos utilizando lactofenol para su fijación; y se observaron al microscopio compuesto. Para su identificación se utilizaron las claves de Barnett y Hunter (1986) para genero y especie.

Bioensayos *in vitro*

Preparación de los tratamientos de quitosan

A partir del quitosan en polvo de bajo peso molecular [(20,000 centipoises (cps)] se prepararon soluciones de quitosan a 500, 1000, 2000, 4000, 6000 y 8000 partes por millón (ppm), agregando 10.1 ml de ácido acético glacial al 99.9 % a un volumen de 90 ml de agua destilada desionizada para tenerla a una concentración del 10%, esto con la finalidad de poder disolver el Quitosan debido al grado de insolubilidad que presenta este biopolímero en agua pura. Se pesaron y se agregaron 0.5 g para 500 ppm, 1 g para 1000 ppm, 2 g para 2000 ppm, 4 g para 4000 ppm, 6 g para 6000 ppm, y 8 g para 8000 ppm, de quitosan comercial a la solución de ácido acético al 10%. Cada solución se fue agitando separadamente durante 24 horas, al final de este proceso, cada solución fue aforada a 1000 ml con agua destilada desionizada para tenerla diluida en ácido acético glacial al 1 %. De igual manera, pero utilizando hojuelas de quitosan de elevado peso molecular (800,000 cps) se prepararon otras soluciones que representaron los tratamientos contra los que se comparó el efecto antifúngico de las soluciones de quitosan de bajo peso molecular en las cinco cepas de *C. gloeosporioides*.

Todas las soluciones de quitosan preparadas se esterilizaron en un autoclave automática a 121°C durante 20 minutos, al termino de este periodo fue ajustado el pH a 5.6 con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 5 N, posteriormente a cada solución se le agregó un adherente, para lo cual se utilizo 1 ml de Tween 80, lo anterior con base a la metodología propuesta por Romanazzi *et al.*, (2002).

El arreglo de los 31 tratamientos con sus seis repeticiones aplicados en los bioensayos *in vitro* en los que se emplearon las soluciones de quitosan y el extracto de gobernadora, así como las mezclas de ambos bioproductos se presentan a continuación en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Tratamientos aplicados en los experimentos *in vitro* con quitosan, *L. tridentata* y formulaciones quitosan-Larrea contra 5 cepas de *C. gloeosporioides*.

Número de tratamiento	Tratamientos aplicados (ppm)
1	Testigo absoluto(PDA)
2	Mancozeb a 2000
3	Tecto 60 a 1000
4	Q 1000
5	Q 2000
6	Q 4000
7	Q 6000
8	Q 8000
9	L 62.5
10	L 125
11	L 250
12	L 500
13	L 1000
14	L 2000
15	L 4000
16	L 8000
17	L 16000
18	Q-L 1000/62.5
19	Q-L 1000/125
20	Q-L 1000/250
21	Q-L 1000/500
22	Q-L 1000/1000
23	Q-L 1000/2000
24	Q-L 1000/4000
25	Q-L 2000/62.5
26	Q-L 2000/125
27	Q-L 2000/250
28	Q-L 2000/500
29	Q-L 2000/1000
30	Q-L 2000/2000
31	Q-L 2000/4000

Preparación de los tratamientos de *Larrea tridentata*

Para la preparación de los tratamientos de resina líquida hidrosoluble de *L. tridentata*, esta fue diluida tomando presente que 1 mg equivale a 1 ppm, basándose en un volumen conocido de 1000 ml de agua pura, y así sucesivamente para las concentraciones de 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 ppm, se pesó la cantidad requerida para cada tratamiento de *Larrea* considerando al 100% de sólidos totales para el experimento, tomando en cuenta la concentración de sólidos totales que contenía la resina, que en el presente estudio fue de 30 % de sólidos totales (ST) o ingrediente activo. Las soluciones de *Larrea* fueron agitadas durante una hora en una parrilla agitadora eléctrica para obtener de esa manera las soluciones bien diluidas a la concentración requerida. Por último, se le adicionó 1 ml del surfactante Tween 80 por litro de solución para mejorar la mezcla de los productos.

Preparación de las mezclas quitosan-Larrea (Q-L)

La preparación de las mezclas Q-L consistió de la siguiente manera; se pesaron las cantidades requeridas de *Larrea* líquida extraída con ETOH, considerando al 100% de ST, pero tomando en cuenta que la concentración de la resina era de 30% de ST, las concentraciones pesadas fueron colocadas en frascos de volumen conocido y previamente identificados según las concentraciones de Q-L, por lo tanto, las mezclas o formulaciones preparadas fueron las siguientes: Q-L 1000/62.5, Q-L 1000/125, Q-L 1000/250, Q-L 1000/500, Q-L 1000/1000, Q-L 1000/2000, Q-L 1000/4000; Q-L 2000/62.5, Q-L 2000/125, Q-L 2000/250, Q-L 2000/500, Q-L 2000/1000, Q-L 2000/2000 y Q-L 2000/4000.

A cada concentración de quitosan diluida en ácido acético se le adicionaron las concentraciones de la resina líquida, posteriormente estos fueron agitados en una parrilla agitadora eléctrica durante una hora, logrando así tener las mezclas Q-L deseadas, por último, a cada concentración de mezclas diluidas se le adicionó 1 ml de Tween 80 como adherente.

Para el experimento *in vitro* se prepararon 31 tratamientos los cuales se muestran en el Cuadro 3. Un tratamiento correspondió al testigo absoluto (PDA), dos tratamientos de testigos

químicos (Mancozeb a 2000 ppm y Tecto 60 a 1000 ppm); cinco tratamientos de quitosan a las dosis de 1000, 2000, 4000 6000 y 8000 ppm; ocho tratamientos de *L. tridentata* a las dosis de 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000, 8000 y 16000 ppm; catorce tratamientos de mezclas Q-L a las dosis 1000/62.5, 1000/125 ppm y así sucesivamente. Lo anterior se realizó en los volúmenes requeridos, teniendo entonces 31 tratamiento y 6 repeticiones de cada una de las cepas utilizados en los bioensayos.

Preparación de los medios de cultivos

La preparación de medios de cultivos del experimento *in vitro* fue basada en las recomendaciones del fabricante del medio de cultivo marca Bioxón, por lo que se preparó suficiente medio de cultivo para todos los tratamientos, así como sus repeticiones para cada una de las cepas de *C. gloeosporioides*.

Para la preparación de los medios de cultivo se pesaron 39 g de papa dextrosa agar (PDA) para un litro de agua destilada desionizada, esto se llevó en una parrilla agitadora eléctrica puesta a calentar con la finalidad de homogenizar el PDA con el agua hasta quedar el medio completamente disuelto. Posteriormente se midieron los volúmenes requeridos para cada tratamiento en los matraces previamente identificados, tomando en cuenta que la proporción de PDA disuelta fue de 20 ml/caja petri; los matraces con PDA fueron llevados al autoclave automático para su esterilización a 15 libras de atmósferas de presión durante 15 minutos a una temperatura de 121°C. Terminado este proceso se elaboró el medio envenenado considerando una relación del extracto:medio de cultivo de 5:20 v/v, es decir, 5 ml de extracto por caja petri en 20 ml de PDA, por lo tanto, la cantidad de extracto fue adicionada en los matraces según la cantidad de repeticiones para cada tratamiento.

Siembra de las cepas de *C. gloeosporioides*

Una vez que los medios envenenados de todo los tratamientos y concentraciones se solidificaron, se procedió a realizar las siembra del material biológico (patógeno), teniendo suficientes cultivos de 8 a 10 días de crecimiento para todos los tratamientos con sus

repeticiones. La siembra del patógeno se llevó al cabo en una campana de flujo laminar horizontal, con la ayuda de un sacabocados se tomaron los explantes de PDA con el hongo y se transfirieron a cada caja petri con el medio envenenado, y así sucesivamente en todos los tratamientos incluyendo el testigo absoluto (sin extracto). Todas las placas sembradas fueron identificadas y selladas con cinta (kleen pack) de plástico adhesiva con el propósito de evitar la deshidratación y una posible contaminación en el ambiente. Por ultimo, después de haber sellado las cajas sembradas con el patógeno se incubaron a una temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$, hasta que el testigo absoluto (PDA) llenó completamente las cajas con sus repeticiones, en ese punto se suspendió la incubación de todo el bioensayo.

Parámetros medidos

La tasa de crecimiento micelial radial (mm) se midió con un Vernier cada 24 horas hasta que el testigo absoluto con sus repeticiones llenaron las cajas petri, posteriormente el valor promedio se representó gráficamente. La medición fue expresada en mm, y después se calculó el porcentaje de inhibición de cada tratamiento y de cada cepa, para posteriormente graficar los resultados obtenidos. También se midió la tasa del porcentaje de inhibición diaria cada 24 horas, la cual también se representó en graficas. Por último, mediante la ecuación de Abbott (1925) se determinó la eficacia de los tratamientos. En este trabajo experimental también se determinó el efecto de sinergia de las formulaciones quitosan-*Larrea*.

Bioensayos *in vivo*

Con la finalidad de complementar y validar la información *in vitro* obtenida previamente, se procedió a realizar un experimento *in vivo*, para lo cual se utilizaron papayas cv. Maradol mismas que se desinfectaron y posteriormente se inocularon con una cepa de *C. gloeosporioides* y se aplicaron los tratamientos del extracto de *Larrea* y de la solución de Quitosan. En el Cuadro 4 se presentan dichos tratamientos.

Cuadro 4. Tratamiento preventivo de quitosan, *Larrea tridentata* y una mezcla Q-L aplicados a frutos de papaya cv. Maradol que fueron inoculados con una cepa del hongo *C. gloeosporioides*.

Número de tratamiento	Tratamientos aplicados (ppm)
1	Testigo absoluto
2	Quitosan 8000
3	<i>Larrea tridentata</i> 4000
4	quitosan- <i>Larrea</i> 2000/2000

Preparación de los tratamiento de quitosan, *L. tridentata* y mezclas Q-L

Para la preparación de los tratamientos del experimento *in vivo* se siguió el mismo procedimiento ya descrito anteriormente para el experimento *in vitro*, solo que en este caso para el testigo absoluto se utilizó agua destilada en lugar del PDA.

Preparación del inculo

A la cepa de *C. gloeosporioides* esporulada, se le agregaron 10 ml de agua destilada estéril y con una varilla de vidrio esterilizada se removieron los conidios, posteriormente fue filtrada en un vaso de precipitado con una gasa de tela manta. A la solución obtenida se le agregaron otros 15 ml de agua destilada estéril, teniendo así 25 ml como solución madre en un tubo de ensayo, por lo tanto, utilizando un hematocitómetro se determinó la concentración de

conidias por diluciones seriadas hasta obtener la concentración deseada que fue de 5×10^5 esporas/ml, en este caso se utilizó la metodología previamente descrita por Casarrubias-Carrillo *et al.* (2002).

Desinfección de las frutas utilizadas en el experimento *in vivo*

Los frutos de papaya se adquirieron de un centro comercial local y fueron seleccionados por su uniformidad en tamaño, así como por la ausencia de daños visibles en la piel. En el laboratorio se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5 % sumergiéndolos completamente en dicha solución durante 10 minutos, posteriormente fueron retirados y se enjuagaron con agua destilada, por último fueron puestos a secar a temperatura ambiente.

Inoculación de los frutos

Para la aplicación de los tratamientos sobre la superficie o piel expuesta de los frutos, se procedió de la siguiente manera: las papayas fueron seccionadas en cuatro partes con tinta negra y con la ayuda de un atomizador manual calibrado con volumen conocido se aplicaron los extractos sobre la superficie expuesta del fruto, posteriormente se secaron a temperatura ambiente del laboratorio y más tarde se colocaron en charolas de unicel. El volumen de cada tratamiento asperjado fue de 10 ml/por superficie expuesta, es decir 20 ml/fruto.

Para inocular los frutos, en cada cuadrante se asperjó el inóculo con el atomizador, aplicando una suspensión de esporas que correspondió a 5×10^5 esporas/ml. Posteriormente, los frutos inoculados fueron incubados en una cámara a una temperatura de ± 25 °C y con una humedad relativa de 90 a 95 %.

Parámetros medidos

Los parámetros evaluados fueron: incidencia y severidad de la antracnosis cada 24 horas, tomando como referencia los parámetros antes mencionados y que estaban más evidentes en el testigo absoluto. La incidencia de la enfermedad fue expresada en porcentaje

utilizando una escala arbitraria del 0 al 100%; la severidad se midió en una escala de 1 al 5, en donde: 1 = 0%, 2 = 1 al 25%, 3 = 26 al 50%, 4 = 51 al 75% y 5 = 76 al 100%. Las escalas utilizadas en este trabajo son las reportadas en el trabajo realizado por Bautista-Baños *et al.* (2003).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en el experimento *in vitro* relativos a las concentraciones de quitosan, *Larrea* y la mezcla Q-L respecto a la variable porciento de inhibición del crecimiento micelial del hongo, fueron analizados bajo un diseño estadístico Completamente al Azar utilizando el paquete estadístico computarizado de la Universidad de Nuevo León versión 2.5. De igual manera, los datos obtenidos del estudio *in vivo* relacionados con la incidencia y severidad de la antracnosis inducida también fueron analizados bajo un diseño Completamente al Azar.

RESULTADOS Y DISCUSION

Resultados *in vitro*

Los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* relacionados con el efecto inhibitorio de los extractos de resina de gobernadora se muestran en el Cuadro 5. Las cepas estudiadas de *C. gloeosporioides* indican que la cepa 372 fue la más susceptible a las concentraciones del extracto etanólico de *L. tridentata* (L), ya que esta se vió notablemente afectada desde la concentración más baja utilizada (500 ppm), estos resultados son muy satisfactorios, ya que resultaron ser estadísticamente iguales que los obtenidos con el tratamiento del testigo químico (Mancozeb a 2000 ppm). Por el contrario, los tratamientos que menos efecto antifúngico mostraron fueron los de quitosan (Q) a 1000, 2000, 4000, 6000 y 8000 ppm, ya que estas concentraciones del biopolímero inhibieron en menos del 50% el crecimiento micelial del hongo. Resultados similares en cuanto a la inhibición de este hongo por extractos de plantas también han sido reportados por Bravo *et al.* (2003), quienes encontraron que el extracto crudo de la planta conocida huele de noche (*Cestrum nocturnum*) mostró mayor efecto antifúngico en tres cepas de *C. gloeosporioides* que el extracto de guamúchil (*Pithecellobium dulce*), observándose la tendencia de que a mayor concentración del extracto, mayor inhibición micelial. Estos resultados confirmaron la actividad antifúngica del huele de noche y del guamúchil reportados por otros autores (Bravo *et al.*, 1997 y Bautista *et al.*, 2002).

En cambio, en la cepa 264 L a 2000, 4000 y 8000 ppm fueron los mejores tratamientos de *L. tridentata*, ya que resultaron ser iguales que lo reportado por el fungicida sintético Mancozeb a 2000 ppm, debido a que estos tratamientos reportaron un 100% de inhibición de *C. gloeosporioides*, por otro lado, las concentraciones de Q a 6000 y 8000 ppm mostraron un efecto de inhibición del 51 y 56% respectivamente, seguidos por 1000, 2000 y 4000 ppm con 10 a 45% de inhibición sobre crecimiento micelial del hongo. Por lo tanto, debemos destacar que esta cepa resultó ser inhibida completamente por el extracto de gobernadora desde las 2000 ppm, mientras que el quitosan no logró inhibirla por completo, aun a la dosis mas elevada utilizada (8000 ppm).

En cuanto a la cepa 322, los resultados obtenidos y presentados en el Cuadro 5, indicaron que esta fue inhibida completamente por L a 8000 ppm, lo cual resultó ser igual que lo obtenido por Mancozeb a 2000 y seguido por L a 4000 ppm con 91%, mientras que L a 1000 y 2000 ppm reportaron una inhibición de 80 y 82 % respectivamente, siendo estadísticamente iguales entre sí. Otros tratamientos como L 125, 250 ppm con 56 a 79%, mientras que L 62.5 ppm con 44%, donde los tratamientos Q 6000 y 8000 ppm con 8 a 10%, seguidos Q 1000 y 4000 ppm con 4 a 5%, posteriormente Q 2000 fue el que menos efecto mostró contra este patógeno. Estos resultados muestran de nuevo que el extracto etanólico hidrosoluble de gobernadora fue superior para inhibir el desarrollo del hongo causante de la antracnosis que el quitosan a dosis similares y también que el fungicida sintético Mancozeb.

Cuadro 5. Comparación de medias de la inhibición del crecimiento micelial radial de cinco cepas de *C. gloeosporioides* sometidas a diferentes dosis de soluciones de quitosan y extracto etanólico hidrosoluble de *L. tridentata*.

Tratamientos (ppm)	Inhibición micelial (%) de las cinco cepas				
	372	264	322	187	CFG-4
Mancozeb 2000	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Tecto 60 1000	76.78 c	86.53 d	85.11 c	88.46 c	92.63 b
Q 1000	9.85 i	10.73 k	4.51 j	20.46 h	20.83 ij
Q 2000	12.90 h	39.08 j	1.00 k	41.95 g	18.93 j
Q 4000	14.88 g	45.08 i	4.91 j	44.15 fg	20.45 ij
Q 6000	18.41 f	51.43 h	8.56 i	45.60 f	22.00 ij
Q 8000	23.33 e	56.55 g	9.86 i	49.11 e	25.43 i
L 62.5	47.56 d	60.86 f	44.41 h	43.01fg	33.05 h
L 125	75.28 c	76.65 e	56.00 g	56.90 d	39.43 g
L 250	93.21 b	88.68 cd	72.15 f	89.51 bc	68.05 f
L 500	100 a	91.95 bc	78.60 e	91.50 b	79.28 e
L 1000	100 a	95.36 b	80.98 de	100 a	83.61 de
L 2000	100 a	100 a	82.16 d	100 a	85.90 cd
L 4000	100 a	100 a	91.01 b	100 a	91.83 bc
L 8000	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
DMS=	1.508	3.671	2.479	2.594	6.118

Medias seguidas por la misma literal son estadísticamente iguales entre sí con un nivel de significancia $P \geq 0.01$.

En cambio en la cuarta cepa estudiada con número de identificación 187, las dosis de L 1000, 2000, 4000 y 8000 ppm, fueron los mejores tratamientos ya que reportaron 100% de inhibición, siendo estadísticamente iguales entre sí. El testigo químico Mancozeb a 2000 ppm generó resultados estadísticamente iguales que los de *Larrea* a las concentraciones antes señaladas. Estos tratamientos fueron seguidos por L 500 ppm con 91%, mientras que Q 4000, 6000 y 8000 ppm lograron inhibir al hongo en el rango de 43 a 57%, en cambio Q 1000 ppm mostró solo un 20 % de inhibición micelial.

En la cepa CFG-4, Mancozeb 2000 ppm y L 8000 ppm fueron los mejores tratamientos, ya que con estos se logró inhibir completamente a *C. gloeosporioides*. En relación con su eficacia fueron seguidos por L 4000 ppm que inhibió al hongo en 91%, otros tratamientos como L 500, 1000 y 2000 ppm lograron alrededor de 79 a 86% de inhibición, mientras que L 62.5, 125 y 250 ppm mostraron de 33 a 68%, y el resto de los tratamientos como Q 1000, 2000, 4000, 6000 y 8000 ppm mostraron porcentajes de inhibición en el rango de 18 a 25%, todos ellos contrastados con el tratamiento testigo absoluto PDA sin extracto que tuvo 0% de inhibición sobre el crecimiento micelial. Los resultados antes señalados sobre las cinco cepas analizadas son mostrados en el Cuadro 5. En un trabajo similar al aquí reportado por Barrera-Necha y Bautista-Baños, (2003) se evaluó el potencial antifúngico de extractos vegetales crudos de 25 familias botánicas en la germinación de esporas de *C. gloeosporioides*. Los resultados de ese trabajo indican que las dos cepas de este hongo aislados de frutas de papaya fueron significativamente afectados por los extractos acuosos de chirimoya (*Annona cherimola*) y de hule de noche.

Los resultados que se reportan en el presente trabajo indican que el efecto de los tratamientos con soluciones de quitosán son similares a los reportados por Bautista-Baños, *et al.* (2003). Estos autores analizaron el efecto de quitosán a 20000, 25000 y 30000 ppm, así como los extractos acuosos de hojas de manzana y hojas y semillas de papaya. Estos investigadores al evaluar la actividad antifúngica de dosis de quitosán obtuvieron una

inhibición completa del crecimiento micelial radial de *C. gloeosporioides* a las concentraciones de 25000 y 30000 ppm, lo cual indica que a mayores concentraciones de quitosan el crecimiento micelial del hongo es reducido cuando es sometido a estos bioproductos bajo condiciones *in vitro*, sin embargo, la combinación de quitosan a 25000 ppm con todos los extractos estudiados mostraron un efecto fungistático, pero no un efecto fungicida.

Por otra parte, los resultados que reportan los tratamientos de *L. tridentata* también son similares a los consignados por Lira *et al.* (2003), quienes al analizar dosis de extractos etanólicos hidrosolubles de gobernadora encontraron actividad antialgas, ya que inhibieron la germinación y el crecimiento micelial del alga fitopatogena *Pythium* sp. al 100%, esto se logró a partir de la concentración de 4000 ppm, mientras que a dosis bajas de este extracto la inhibición del patógeno es leve, es decir, a dosis altas de extractos adicionados en el medio de cultivo, el crecimiento del hongo fue menor.

En un reciente artículo de Chitwood (2002) se menciona que numerosas plantas tienen un amplio espectro de componentes orgánicos bioactivos, incluyendo isotiocianatos, glucosinolatos, glicoides, alcaloides, lípidos y fenoles, los cuales han demostrado que tienen acción fungicida y fungistática. Siendo estos últimos componentes los que se encuentran en grandes concentraciones en la resina de las hojas de *L. tridentata* (Brinker, 1993).

En los datos generados en el presente trabajo se pudo apreciar claramente el activo crecimiento, la posible agresividad de las cepas, pero sobretodo, el crecimiento de las mismas en función del tiempo respecto al testigo absoluto. También se apreció que las cinco cepas de *C. gloeosporioides* crecieron y llenaron totalmente las cajas petri correspondientes a los testigos absolutos en diferentes periodos de tiempo debido a la variabilidad genética de las mismas. El inicio del crecimiento empezó con la cepa CFG-4, la cual reportó el mayor crecimiento en el más corto tiempo, logrando llenar completamente la caja petri a las 192 horas (8 días), esta cepa fue seguida por las cepas con código 372, 264 y 322 respectivamente, mismas que reportaron el crecimiento total en el testigo absoluto a las 240 horas (10 días) después de la siembra. Por último la 187, la cual fue la cepa que requirió mayor tiempo para alcanzar su máximo crecimiento en el testigo absoluto, ya que requirió 240 horas (11 días).

Con base con la información presentada en el Cuadro 5, se puede señalar que el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* fue inhibido por los tratamientos de quitosan a concentraciones de 8000 ppm, mostrando un efecto antifúngico mas definido en las cepas 264 y 187, mientras que en la CFG-4 el efecto fue menor. En cambio, en la cepa 372 el efecto fue mucho menor que en las cepas antes mencionadas, mientras que en la cepa 322 el efecto de las concentraciones de quitosan fue muy inferior, estos resultados sugieren una marcada variabilidad genética de este hongo, tal y como ha sido señalado por Casarrubias-Carrillo *et al.* (2003), quienes encontraron mediante el uso de marcadores moleculares RAPD que *C. gloeosporioides* presenta una alta variabilidad morfológica, patogénica y genética, lo cual ha sido difícil de evaluar usando los métodos tradicionales.

En los últimos años las técnicas moleculares han facilitado la separación y caracterización genética de este y muchos otros hongos. En ese trabajo se usaron aislados de frutos de papaya de los estados de Veracruz, Chiapas y Campeche, los cuales fueron analizados mediante la técnica RAPD y la extracción de DNA de cada una de las cepas. Se usaron 18 oligonucleótidos decámeros de secuencias aleatorias, los cuales se hicieron reaccionar con el DNA de cada una de las cepas para determinar la variabilidad y se obtuvieron 134 bandas polimórficas. Con esta información Casarrubias-Carrillo *et al.* (2003) obtuvieron un dendrograma en el cual se observó la formación de dos grupos principales de cepas, mismas que presentaron características completamente diferentes unas de otras.

Dando continuidad a la discusión de los resultados obtenidos en este trabajo, al analizar el efecto de las formulaciones quitosan-Larrea contra cinco cepas del hongo *C. gloeosporioides* se detectó un claro efecto antifúngico, lo cual se muestra en el Cuadro 6. Claramente se aprecia aquí que en la cepa 372 casi todas las formulaciones Q-L estudiadas (1000/250, 1000/500, 1000/1000, 1000/2000, 1000/4000, 2000/250, 2000/500, 2000/1000, 2000/2000 y 2000/4000 ppm), reportaron un 100% de inhibición del crecimiento micelial, siendo estadísticamente iguales entre sí. Estos resultados sugieren claramente una acción sinérgica de los dos bioproductos estudiados, ya que su eficacia como fungicida fue superior al efecto mostrado por el testigo químico Mancozeb a 2000 ppm.

Resultados sobre sinergia entre mezclas de productos orgánicos similares a los aquí presentados, pero utilizando unos extractos diferentes de plantas fueron consignados recientemente por Bautista-Baños *et al.* (2003). Estos autores analizaron el efecto de quitosan solo y combinado con extractos acuosos de manzana, así como de hojas y semillas de papaya, los cuales se evaluaron solos y también mezclados con quitosan, contra niveles de antracnosis y calidad en frutos de papaya. Las soluciones de quitosan a 20000 y 30000 ppm tuvieron un efecto antifúngico sobre *C. gloeosporioides*, mientras que los extractos solos no mostraron ningún efecto fungicida, en cambio, cuando se mezclaron con quitosan a 25000 ppm, todos los extractos evaluados tuvieron un efecto fungistático, pero no se observó un efecto fungicida.

Es importante destacar que las concentraciones de quitosan empleadas por los autores antes señalados son mucho más elevadas (20000 a 30000 ppm) en comparación con sólo 2000 ppm empleadas en este trabajo experimental, lo anterior sugiere que debido a la potente acción fungicida de los extractos de gobernadora, la mezcla Q-L resulta muy eficaz en su efecto sinergista para inhibir el crecimiento *in vitro* de *C. gloeosporioides*, comparado con los extractos acuosos evaluados por los autores antes señalados.

En la cepa 264, las dosis de Q-L 1000/500, 1000/1000, 1000/2000, 1000/4000 ppm, Q-L 2000/500, 2000/1000, 2000/2000 y 2000/4000 ppm, reportaron un efecto fungicida con 100% de inhibición, seguidos el Q-L 1000/62.5, Q-L 2000/62.5, Q-L 1000/125 Q-L 2000/125, Q-L 1000/250 Q-L 2000/250 muestran alrededor de 52 a 89% de inhibición del crecimiento micelial con respecto al testigo absoluto PDA. Por lo tanto en la cepa 322, la dosis de Q-L 1000/1000, 1000/2000, 2000/1000 y 2000/2000 ppm también reportaron 100% de inhibición, mientras que Q-L 1000/4000 y 2000/4000 ppm solo mostraron inhibición en el rango de 71 a 75%.

En cambio en la cepa 187, las formulaciones de quitosan a las concentraciones de 1000 ppm combinadas con dosis de gobernadora a las concentraciones de 250, 500, 1000, 2000 y 4000 ppm, así como concentraciones de quitosan a 2000 ppm con dosis de Larrea a 125, 250, 500, 1000 y 2000 ppm reportaron una inhibición completa al 100%, siendo estadísticamente iguales; esas mezclas fueron seguidas en su efecto antifúngico por Q-L 2000/4000 con 93%,

mientras que Q-L 1000/62.5 Q-L 2000/62.5 y Q-L 1000/125 ppm mostraron alrededor de 60 a 63% de inhibición del crecimiento micelial.

Cuadro 6. Comparación de medias de la inhibición del crecimiento micelial radial de cinco cepas de *C. gloeosporioides* sometidos a diferentes dosis de formulaciones de dos bioproductos quitosan-*L. tridentata* (Q-L).

Tratamientos (ppm)	Porcentaje de inhibición de las cinco cepas				
	Cepas 372	264	322	187	CFG-4
T. absoluto (PDA)	0.00 f	0.00 h	0.00 h	0.00 c	0.00 i
Q-L 1000/62.5	30.36 e	52.96 g	23.20 g	60.13 b	36.28 h
Q-L 1000/125	61.20 d	68.68 e	28.98 f	62.93 b	44.06 g
Q-L 1000/250	100 a	86.30 c	30.56 f	100 a	53.31 f
Q-L 1000/500	100 a	100 a	37.50 e	100 a	60.10 e
Q-L 1000/1000	100 a	100 a	100.00 a	100 a	75.65 c
Q-L 1000/2000	100 a	100 a	100.00 a	100 a	85.76 b
Q-L 1000/4000	100 a	100 a	71.08 b	100 a	79.65 c
Q-L 2000/62.5	65.25 c	65.06 f	27.71 f	60.73 b	40.53 gh
Q-L 2000/125	68.43 b	79.68 d	39.88 e	100 a	45.30 g
Q-L 2000/250	100 a	88.85 bc	43.51 d	100 a	64.58 de
Q-L 2000/500	100 a	100 a	63.86 c	100 a	68.65 d
Q-L 2000/1000	100 a	100 a	100 a	100 a	77.60 c
Q-L 2000/2000	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Q-L 2000/4000	100 a	90.38 b	71.50 b	93.18 a	80.33 bc
DMS =	2.6710	3.0636	3.4940	8.7031	5.4449

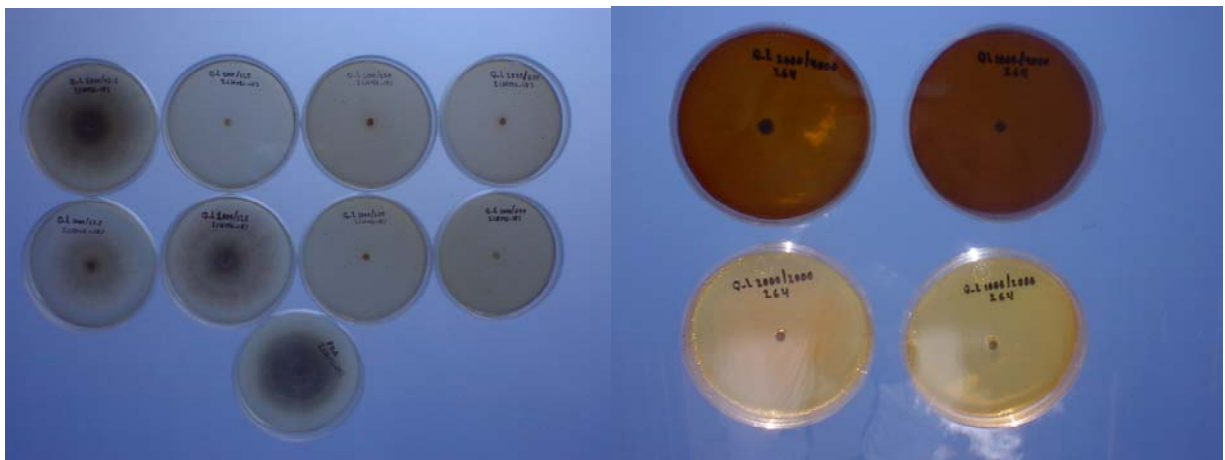
Medias seguidas por la misma literal son estadísticamente iguales entre sí, con un nivel de significancia $P \geq 0.01$.

Posteriormente en la cepa CFG-4 las concentraciones Q-L 2000/2000 mostraron ser las que mejor efecto inhibidor ejercieron sobre el hongo, ya que inhibieron en un 100% su crecimiento, seguido por Q-L 1000/2000 con 85% de inhibición, mientras que Q-L 1000/1000 Q-L 2000/1000 Q-L 1000/4000 y Q-L 2000/4000, mostraron efecto antifúngico en el rango de 75 a 80% de inhibición, además, Q-L 2000/250 y 2000/500 ppm inhibieron en 64 y 68% respectivamente, el crecimiento micelial respecto al testigo absoluto. Lo anteriormente señalado se presenta en el Cuadro 6.

En el Cuadro 6 también se puede apreciar la variabilidad mostrada por las cinco cepas en relación con el efecto inhibitor de los bioproductos solos y por las mezclas de los mismos. Lo antes señalado manifiesta una vez mas la alta variabilidad de las poblaciones de *C. gloeosporioides*, tal y como fue reportado por Masel *et al.* (1990), quienes indicaron que en condiciones de campo el genoma de las poblaciones de este hongo es muy variable; ellos desconocen como se da ese polimorfismo, pero sus resultados sugieren que la reorganización de las cromosomas pueden considerarse como un medio para la generación de variabilidad en este hongo.

Crecimiento micelial de las cinco cepas estudiadas del hongo *C. gloeosporioides*

Con base en la información obtenida y analizada, en el Cuadro 7 se muestran los crecimientos miceliales de las cinco cepas de *C. gloeosporioides* después de que estas llenaron completamente las placas del testigo absoluto (PDA), y de la misma manera en los tratamientos con quitosan, *Larrea* y en las formulaciones Q-L. Posteriormente, con base en los datos generados en el experimento, se determinó la eficacia de los tratamientos sobre cada uno de los aislamientos, lo anterior con base en la ecuación de Abbott (1925).



A)

B)

Figura 7. Efecto de las formulaciones quitosan-Larrea (extracto etanólico) en la inhibición del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* (A) cepa 187 y (B) cepa CFG-4.

Cuadro 7. Crecimiento micelial radial de cinco cepas del hongo *C. gloeosporioides* sometidas a soluciones de quitosan, *L. tridentata* y mezclas quitosan-Larrea.

Tratamiento Número	Dosis aplicadas (ppm)	Crecimiento radial de las cepas (mm)				
		372	264	322	189	CFG-4
1	Testigo Absoluto (PDA)	37.7	37.7	37.7	37.7	37.7
2	Mancozeb	0	0	0	0	0
3	TECTO 60	8.7	5.0	5.5	4.3	2.7
4	Q 1000	33.9	33.6	35.9	29.9	29.8
5	Q 2000	32.8	22.9	37.3	21.8	30.5
6	Q 4000	32.0	20.6	35.8	21.0	29.9
7	Q 6000	30.7	18.3	34.4	20.4	29.3
8	Q 8000	28.8	16.3	33.9	19.1	28.1
9	L 62.5	19.7	14.7	20.9	21.4	25.2
10	L 125	9.3	8.7	16.5	16.2	22.8
11	L 250	2.5	4.2	10.4	3.9	12.0
12	L 500	0	3.0	8.0	3.1	7.8
13	L 1000	0	1.7	7.1	0	6.1
14	L 2000	0	0	6.7	0	5.3
15	L 4000	0	0	3.3	0	3.0
16	L 8000	0	0	0	0	0
17	L 16000	0	0	0	0	0
18	Q-L 1000/62.5	26.2	17.7	28.9	15.0	24.0
19	Q-L 1000/125	14.6	11.7	26.7	13.9	21.0
20	Q-L 1000/250	0	5.15	26.1	0	17.5
21	Q-L 1000/500	0	0	23.5	0	15.0
22	Q-L 1000/1000	0	0	0	0	9.1
23	Q-L 1000/2000	0	0	0	0	5.3
24	Q-L 1000/4000	0	0	10.8	0	7.6
25	Q-L 2000/62.5	13.0	13.1	27.2	14.8	22.4
26	Q-L 2000/125	11.8	7.6	22.6	0	18.7
27	Q-L 2000/250	0	4.1	21.3	0	13.3
28	Q-L 2000/500	0	0	13.6	0	11.8
29	Q-L 2000/1000	0	0	0	0	8.4
30	Q-L 2000/2000	0	0	0	0	0
31	Q-L 2000/4000	0	3.6	10.7	2.5	7.4

Eficacia de los tratamientos sobre las cepas de *C. gloeosporioides*.

En el Cuadro 8 se puede apreciar la información resultante relativa a la eficacia de los tratamientos sobre los aislamientos de *C. gloeosporioides*, la cual se determinó mediante la ecuación de Abbott (1925). En forma general se observó que en todos los tratamientos y después de haber calculado la eficacia de cada uno, los tratamientos con *L. tridentata* reportaron ser los mejores al no permitir mayor crecimiento micelial de las cinco cepas del hongo. Mientras que los tratamientos con soluciones de quitosan mostraron una menor eficacia para lograr la inhibición del crecimiento micelial del dicho hongo.

Sin embargo, es necesario destacar que las formulaciones de los dos bioproductos antes mencionados (quitosan-Larrea) aumentaron claramente la eficiencia de estos tratamientos, ya que con estos se logra obtener mayor inhibición sobre el crecimiento micelial del hongo comparado con la actividad antifúngica por separado de cada uno de los agentes inhibidores que conforman la mezcla, lo anterior pone de manifiesto el efecto sinergista obtenido al mezclar ambos productos con propiedades biocidas. Este efecto sinérgico también fue reportado por Romanazzi *et al.* (2002), quienes al promover la interacción de soluciones de quitosan con tratamientos de temperatura, encontraron un efecto sinérgico de ambos factores para reducir la incidencia y severidad de *Botrytis cinerea* en racimos de uvas.

Para la determinación de la eficacia de los 31 tratamientos aplicados en este experimento se utilizó la ecuación de Abbott (1925), la cual se presenta a continuación:

$$ET = RT - rt / RT (100)$$

En donde:

ET = Eficacia del tratamiento (funguicida o extractos)

RT = Diámetro en mm de cada uno de los aislamientos en el testigo absoluto (PDA).

rt = Diámetro en mm de cada uno de los aislamientos en los extractos evaluados.

Cuadro 8. Eficacia de los tratamientos aplicados sobre cinco cepas del hongo fitopatógeno *C. gloeosporioides*.

Tratamientos No.	Dosis aplicadas (ppm)	Eficacia de tratamientos (%) en cinco cepas				
		372	264	322	189	CFG-4
1	Testigo Absoluto (PDA)	0	0	0	0	0
2	Mancozeb	100	100	100	100	100
3	TECTO 60	76.79	86.56	85.19	88.51	92.66
4	Q 1000	9.90	10.79	4.55	20.51	20.91
5	Q 2000	12.95	39.12	1.06	42.00	18.97
6	Q 4000	14.94	45.14	4.95	44.21	20.51
7	Q 6000	18.48	51.46	8.62	45.67	22.06
8	Q 8000	23.39	56.59	9.90	49.16	25.46
9	L 62.5	47.61	60.92	44.47	43.06	33.11
10	L 125	75.33	76.70	56.01	56.94	39.48
11	L 250	93.28	88.73	72.19	89.57	68.08
12	L 500	100	92.00	78.65	91.56	79.31
13	L 1000	100	95.40	81.03	100	83.69
14	L 2000	100	100	82.23	100	85.94
15	L 4000	100	100	91.07	100	91.87
16	L 8000	100	100	100	100	100
17	L 16000	100	100	100	100	100
18	Q-L 1000/62.5	30.42	53.01	23.25	60.21	36.34
19	Q-L 1000/125	61.23	68.74	29.05	62.95	44.12
20	Q-L 1000/250	100	86.34	30.59	100	53.36
21	Q-L 1000/500	100	100	37.53	100	60.17
22	Q-L 1000/1000	100	100	100	100	75.69
23	Q-L 1000/2000	100	100	100	100	85.81
24	Q-L 1000/4000	100	100	71.13	100	79.71
25	Q-L 2000/62.5	65.30	65.12	27.76	60.57	40.58
26	Q-L 2000/125	68.48	79.71	39.92	100	50.35
27	Q-L 2000/250	100	88.9	43.50	100	64.63
28	Q-L 2000/500	100	100	63.93	100	68.70
29	Q-L 2000/1000	100	100	100	100	77.67
30	Q-L 2000/2000	100	100	100	100	100
31	Q-L 2000/4000	100	90.45	71.57	93.24	80.37

Determinación del efecto sinérgico de las formulaciones quitosan-Larrea

Para la determinación del sinergismo de las mezclas de ambos bioproductos se utilizó la ecuación la fórmula de Limpel (1962), la cual se presenta de la siguiente manera:

$$Ee = X + Y - (XY/100)$$

Donde: Ee = Efecto esperado de la respuesta aditiva de dos agentes inhibidores.

X y Y = Porcentajes de inhibición relativa de dos agentes inhibidores usados juntos.

La ecuación de Limpel asume que cuando el efecto esperado (Ee) es mayor al porcentaje de inhibición de la mezcla de los dos agentes inhibidores, no existe efecto de sinergia de los dos bioproductos mezclados contra el microorganismo en cuestión, que en este caso fue *C. gloeosporioides*. A continuación se hace ilustra con un ejemplo el efecto sinergista de las mezclas quitosan-Larrea considerándose que el efecto esperado es 72.0%.

Con base en los resultados tenemos que el efecto del Q a 2000 ppm es 42.0% de inhibición del crecimiento micelial y el efecto de L a 125 ppm es de 56.9% de inhibición; en cambio, el efecto de Q-L 2000/125 fue 100% de inhibición de dicho hongo. En este caso, como Ee de ambos productos fue menor comparado con el porcentaje de inhibición de la mezcla Q-L 1000/250, entonces si hay un efecto sinergista de la mezcla quitosan-Larrea.

Por lo tanto, como $72.0\% < 100\%$, entonces se considera que si hay efecto de sinergismo debido a la mezcla Q-L. Los valores obtenidos al calcular el efecto de sinergia de las formulaciones Q-L con la fórmula de Limpel, indican que la mayoría de las mezclas tuvieron un efecto de sinergia comparado con los valores del porcentaje de inhibición del patógeno obtenidos por separado por cada uno de los productos o agentes inhibidores que conforman la mezcla.

Resultados obtenidos con el quitosan de elevado peso molecular

Debido al interés por contrastar y comparar la actividad antifúngica de soluciones de quitosan de diferentes pesos moleculares, se realizó un bioensayo comparativo utilizando para este propósito la cepa CFG-4, la cual se seleccionó debido a que su mayor velocidad de crecimiento. En el Cuadro 9 se aprecian los resultados del efecto antifúngico obtenidos por el quitosan de elevado peso molecular (800,000 cps) sobre la inhibición del crecimiento micelial del hongo, cabe señalar que la efectividad de las soluciones de este biopolímero fue muy notorio al inhibir completamente al hongo desde bajas concentraciones, comparado con el quitosan de bajo peso molecular (20,000 cps), ya que este último mostró que su efecto antifúngico fue significativamente menor.

Cuadro 9. Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial radial del hongo *C. gloeosporioides* (cepa CFG-4) sometidos a diferentes dosis de soluciones de quitosan de elevado peso molecular (800,000 cps).

Tratamientos aplicados (ppm)	Inhibición (%)
Testigo absoluto	0 d
Q 1000	0 d
Q 2000	7.66 d
Q 4000	100 a
Q-L 1000/1000	55.40 c
Q-L 2000/1000	49.06 c
Q-L 4000/1000	100 a
Q-L 1000/2000	86.25 b
Q-L 2000/2000	51.46 c
Q-L 4000/2000	100 a

Medias seguidas por la misma literal son estadísticamente iguales entre sí, con un nivel de significancia $P \geq 0.01$; DMS = 7.905.

Resultados similares han sido reportados en la literatura por diferentes autores, por ejemplo, Savard *et al.* (2002) estudiando la acción antimicrobial de quitosan hidrolizado contra bacterias y levaduras que afectan diversas hortalizas, encontraron que soluciones de quitosan de peso molecular intermedio (5 kDa) fue más eficiente contra los microorganismos

en comparación del quitosán de bajo peso molecular (0.5 kDa). De manera similar, No *et al.* (2002), analizando la actividad antibacterial de oligómeros de quitosán de diferentes pesos moleculares encontraron que las soluciones de quitosán de 746 kDa fueron más efectivas contra *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens*, en comparación con el menor efecto antibacterial de las soluciones de quitosán de peso molecular intermedio (470 kDa).

Resultados *in vivo*

Con base en los resultados obtenidos en el experimento *in vivo* se generó la información que se presenta en el Cuadro 10, en el cual se muestra el efecto de los tratamientos evaluados. En este cuadro se destaca que el extracto etanólico de *L. tridentata* a 4000 ppm es el que reportó la menor incidencia del patógeno sobre los frutos de papaya que previamente se habían inoculado con una suspensión de esporas a la concentración de 5×10^5 , de la cepa 372 de *C. gloeosporioides*. En función del efecto antifúngico mostrado, el segundo mejor tratamiento fue la formulación de los bioproductos quitosán-Larrea, a la concentración de 2000/2000 ppm, ya que esta mezcla permitió solo el 50% de incidencia del hongo en los frutos. En cambio el tratamiento menos eficiente fue el quitosán a 8000 ppm, debido a que este permitió una incidencia del 66.6% de antracnosis en el fruto, en comparación con el testigo (agua destilada) que reportó un 100% de incidencia de la antracnosis.

En un trabajo similar al aquí reportado, realizado por Bautista-Baños *et al.* (2003), se estudió el efecto del quitosán y extractos de plantas en el crecimiento de *C. gloeosporioides*; dichos autores analizaron el efecto de este biopolímero y extractos de manzana, así como de hojas y semillas de papaya en los niveles de antracnosis y la calidad de frutas de papaya. En el trabajo de estos investigadores se reporta una tendencia a lograr una mayor firmeza de papaya cuando fueron tratados solamente con los extractos de semillas de este fruto, así como cuando fueron mezclados con quitosán. Mientras que el quitosán al ser utilizado como tratamiento preventivo en frutos de papaya contra *C. gloeosporioides* a la concentración de 15000 ppm resultó ser el mejor tratamiento por mantener una baja incidencia y severidad de la enfermedad en el fruto.

Cuadro 10. Valores promedio de incidencia de la antracnosis en frutos de papaya ocasionados por el hongo *C. gloeosporioides* (cepa 372), sometidos a dosis preventivas de quitosan, extracto etanólico de *L. tridentata* y una mezcla quitosan-Larrea.

Tratamientos aplicados (ppm)	*Incidencia (%)
Testigo (agua destilada)	100.00
Q 8000	66.66
L 4000	41.66
Q-L 2000/2000	50.00

*No se realizó la comparación de medias debido a que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos aplicados.

En relación con la severidad del daño causado por la inoculación de *C. gloeosporioides* en los frutos de papaya, el cual se evaluó con base en una escala del 1 al 5 (Bautista-Baños *et al.*, 2003), en el Cuadro 11 se aprecia el efecto de los tratamientos aplicados. En este cuadro se aprecia claramente que el extracto etanólico a 4000 ppm de *L. tridentata* y la formulación Q-L 2000/2000 ppm, fueron los tratamientos que reportaron el menor grado de severidad en los frutos de papaya con un valor de 2.0. El segundo mejor tratamiento fue el mostrado por quitosan a la concentración de 8000 ppm, ya que reportó un grado de severidad de la enfermedad de 2.6. También se comportaron igual los tratamientos L 4000 y la formulación Q-L 2000/2000 ppm por mantener un bajo grado de severidad del patógeno, los cuales fueron estadísticamente iguales entre sí, en cambio el testigo (agua destilada) reportó un grado de severidad igual a 5.0. En el trabajo realizado por Hassan *et al.* (2004), en el que se estudió la manera de prolongar la vida de anaquel de frutos de plátano, encontraron que la severidad de la enfermedad causada por *Colletotrichum musae*, responsable de la más importante enfermedad de poscosecha (antracnosis) en este fruto, fue significativamente reducida por inmersiones de los plátanos en tratamientos de agua caliente (50+/-2°C por 5 minutos) y aplicación de un fungicida sintético (prochloraz a 250 ppm), estos autores también encontraron que además, el fungicida redujo la incidencia de la enfermedad.

Por otro lado, Almada-Ruiz *et al.* (2003) estudiando *in vitro* el potencial fungicida de flavones obtenidos de aceite de naranja sobre el hongo *C. gloeosporioides*, agente causal de daños muy significativos en numerosos cultivos en regiones tropicales, subtropicales y templadas, encontraron que a medida que la concentración de flavones se incrementó, el crecimiento micelial de este hongo decreció. Estos autores reportan que el hexamethoxyflavone de aceite de naranja a la concentración de 100 µg ml⁻¹ inhibió completamente a *C. gloeosporioides*.

Cuadro 11. Comparación de medias de severidad del daño por antracnosis en frutos de papaya después de haber sido inoculados con una suspensión de esporas de *C. gloeosporioides*, y efecto inhibitorio de la enfermedad por aplicaciones preventivas de quitosan, extracto etanólico de *L. tridentata* y una formulación de Q-L.

Tratamientos (ppm)	Severidad (%)
Testigo(agua destilada)	5.0 a
Q 8000	2.6 b
L 4000	2.0 b
Q-L 2000/2000	2.0 b

Medias seguidas por la misma literal son estadísticamente iguales entre sí.
DMS: (P≥0.01)=2.092.

En la Figura 7 se presenta el comportamiento del tratamiento con quitosan (Q), extracto etanólico de *L. tridentata* (L) así como la formulación quitosan-Larrea (Q-L) en la incidencia progresiva de la antracnosis sobre frutos de papaya inoculados en el laboratorio durante un periodo de 6 días. Después de haber aplicado los tratamientos e inocular los frutos de papaya con la cepa 372 de *C. gloeosporioides*, se midió a las 24 horas la incidencia por antracnosis en los frutos, no habiéndose detectado síntomas visibles de la enfermedad, incluyendo el testigo, posteriormente, a las 48 horas después de la inoculación los frutos se comenzaron a ver notablemente afectados, lo cual mostraba la incidencia clara de la enfermedad, pero sobre todo en el testigo.

El comportamiento del quitosan sobre la incidencia de la antracnosis en frutos de papaya, fue notorio durante el periodo de las 48 a 96 horas, transcurrido este lapso de tiempo hasta las 144 horas la incidencia de la enfermedad se mantuvo estable, debido probablemente al efecto antifúngico del quitosan. El extracto de gobernadora se comportó de manera similar a la solución de quitosan, solo que este extracto fue más eficaz en su actividad antifúngica debido a que redujo en 60% la incidencia de la antracnosis. En relación con la mezcla Q-L comparado con los demás tratamientos, este reportó un control moderado en la incidencia de la antracnosis durante las primeras 96 horas, transcurrido este tiempo, se estabilizó la incidencia de la enfermedad. Cabe señalar que los frutos de papaya con maduración de consumo y sin tratamientos (testigo), el hongo *C. gloeosporioides* pudo incidir a mayor escala en un lapso de tiempo de 48 horas después de la inoculación. De manera similar a lo encontrado en este trabajo relacionado con el desarrollo de la enfermedad después de haber inoculado a los frutos de papaya con una suspensión de esporas o conidias, el trabajo de Casarrubias-Carrillo *et al.* (2002), en el que se evaluó la histopatología de frutos de papaya infectados por *C. gloeosporioides* y el proceso de infección del mismo hongo en frutos de papaya cv. Maradol, encontraron que la germinación de los conidios del hongo y la infección de los frutos ocurre entre las 48 horas y 72 horas después de la inoculación.

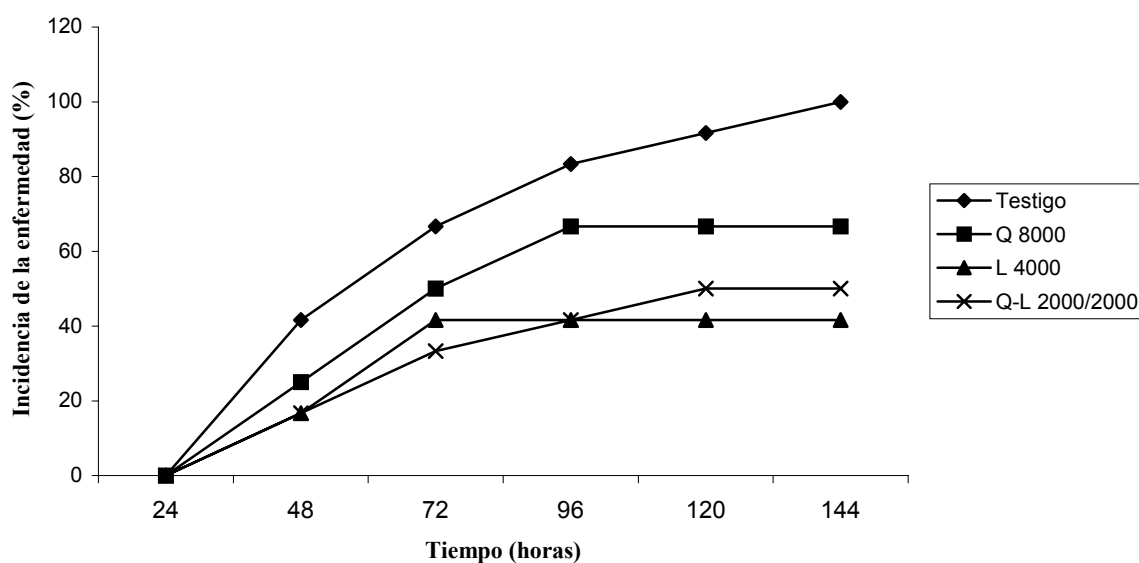


Figura 8. Incidencia progresiva de la antracnosis causada por el hongo *C. gloeosporioides* en frutos de papaya cv. Maradol.

En relación con la severidad de la antracnosis en frutos de papaya, en la Figura 8 se aprecia el comportamiento de los tratamientos aplicados. En este gráfico se observa que a las 24 y 48 horas después de la inoculación no fue notoria la presencia de la antracnosis en todos los tratamientos, pero a las 72 horas el quitosan mostró ser el bioproducto más eficaz para inhibir *in vivo* el ataque del hongo, ya que el fitopatógeno mostró ser menos severo en su grado de infección, en cambio los tratamientos con Larrea y la mezcla Q-L resultaron ser similares en cuanto a la inhibición de la enfermedad. En cambio, a las 96 horas los mejores tratamientos resultaron ser el extracto de Larrea y la formulación Q-L, debido a que estos no permitieron que se evidenciara marcadamente la infección del hongo, sin embargo, con el quitosan la infección del hongo fue más notoria comparado con los tratamientos con base en L y Q-L.

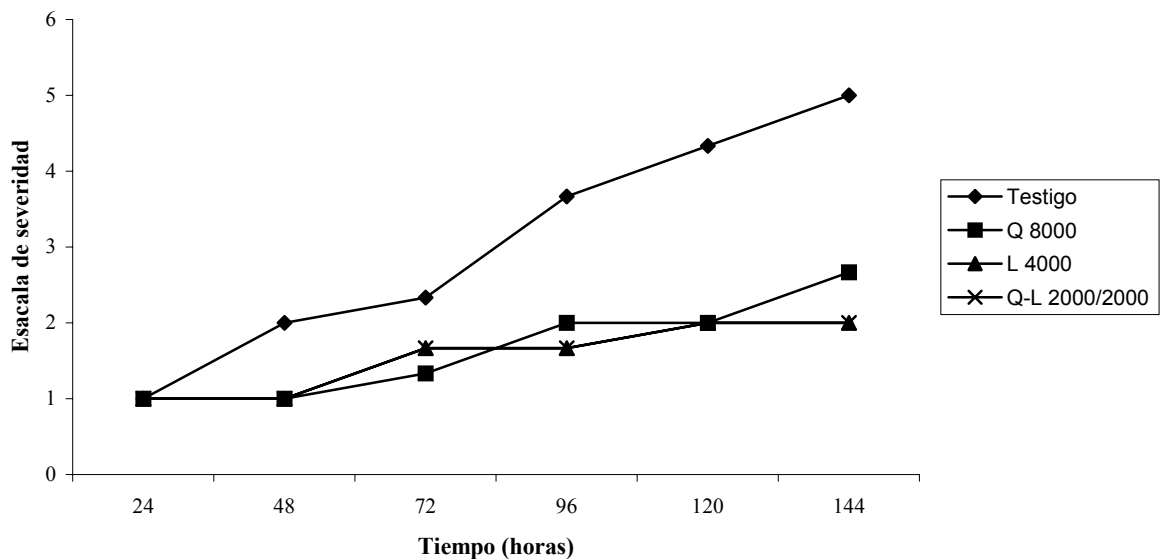


Figura 9. Grado de severidad de la antracnosis causada por el hongo *C. gloeosporioides* en frutos de papaya cv. Maradol.

CONCLUSIONES

Teniendo como referencia la información generada en el presente trabajo se arribó a las siguientes conclusiones:

1.- La actividad antifúngica del extracto etanólico hidrosoluble de *L. tridentata* contra el hongo fitopatógeno *C. gloeosporioides* resultó ser muy clara, debido a que en mayor o menor medida este producto botánico inhibió el crecimiento micelial *in vitro* de las cinco cepas analizadas. En cuanto a las respuestas específicas de las cepas al extracto utilizado se detectó lo siguiente: las cepas 372 y 187 fueron inhibidas más fácilmente, mientras que la 322, CFG-4 y 264 resultaron ser más tolerantes al efecto antifúngico del extracto.

2. La efectividad antifúngica del biopolímero quitosan de bajo peso molecular observado en este trabajo, fue poco eficaz en las cinco cepas evaluadas.

3. Con relación al efecto combinado del quitosan más el extracto de *L. tridentata*, los resultados *in vitro* claramente evidenciaron en varias formulaciones un efecto sinérgico superior al encontrado cuando se aplicaron ambos productos por separado.

4. En cuanto a la eficiencia del efecto antifúngico del quitosan de bajo peso molecular comparado con el quitosan de elevado peso molecular, los resultados permiten concluir que este último biopolímero fue significativamente más eficaz para inhibir el crecimiento de *C. gloeosporioides*.

5. Referente al bioensayo realizado *in vivo* para corroborar el efecto antifúngico de los tratamientos Q 8000, L 4000 y la mezcla Q-L 2000/2000 ppm que se aplicaron como tratamientos preventivos, se concluye que el extracto de *L. tridentata* a la dosis de 4000 ppm logró mantener una baja incidencia de la antracnosis en frutos de papaya durante el periodo experimental.

6.- Con base en los resultados generados en los experimentos *in vitro* y posteriormente corroborados *in vivo*, los productos elaborados a partir del biopolímeros quitosan y de extracto de resina de gobernadora, aparentan ser una buena opción para la prevención de la antracnosis en frutos de papaya ocasionados por el hongo *C. gloeosporioides*, por lo tanto, los resultados sugieren que estos productos pudiesen ser útiles para el manejo orgánico o sustentable de los cultivos frutícolas.

LITERATURA CITADA

- Abbott, 1925. Journal of Economic Entomology 18: 265-267.
- Acosta-Ramos, M; Nieto, A. D. 2003. Control químico *in vitro* de seis aislamientos de *C. gloeosporioides* de Mango(*Mangifera indica* L.) cv. Haden. Conferencia Panamericana de Fitopatología. South Padre Island, Texas, U.S.A. p. 93.
- Agrios, N. G. 2001. Fitopatología. Editorial Limusa. Segunda Edición. Departamento de Fitopatología. Universidad de Massachussets. USA. p. 393-405.
- Alahakoon, P.W., Sreenivasaprasad, S., Brown, A. E., and Millis, P.R. 1992. Selection of a genetic variant within *Colletotrichum gloeosporioides* isolates pathogenic on mango by passaging through wounded tomato fruit. Physiological and Molecular Plant Pathology 41:227-240.
- Alamada-Ruiz, E; Martinez-Tellez, MA; Hernández-Alamos, MM; Vallejo, S; Primo-Yufer, E; Vargas-Arispuro, I. 2003. Fungicidal potential of methoxylated flavones from citrus for in vitro control of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of anthracnose disease in tropical fruits. Article. Pest Management Science, 59(11):1245-1249.
- Alexopoulos, C.J; Mims, C.J; Blackwell, M.1979. Introductory Mycology. Editorial Jhon Wiley&SONS, INC. Fourth Editions, New York, EUA. p 867.
- AMIFAC (Asociación Mexicana de la industria de Plaguicidas y Fertilizantes A.C.) 1993. Las plaguicidas en México. p. 29-31.
- Arredondo, *et al.* 2003. Determinación de la capacidad Inhibitoria de Compuestos Biológicos activos sobre el crecimiento de hongos fitopatogenos. Memorias. X Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas. Chapingo, México. p. 71
- Bailey, A.J. and Jeger, J.M. 1992. *Colletotrichum*: Biology, pathology and control. Britis Society for Plant Pathology. C. A. B. International. p.388.
- Barnett, H. L. and Hunter, B.B. 1986. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. Mc Millan Publishing Company. USA. p.218.
- Bautista- Baños S; Hernández, L.M.; Bosquez M.E; Wilson, C.L. 2003. Effects of Chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. Journal. Crop Protection 22:1088-1092.

- Becerra, N. L.; Bautista, B. S. 2003. Evaluación del Potencial antifúngica de Extractos Vegetales Crudos en la Germinación de Esporas de *C. gloeosporioides*. Memoria. X Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas. Chapingo. México. p 168.
- Becerra-Leor, E. N. 1995. Enfermedades del cultivo de Mango. En: Mata, B.I. y Mosqueda, V.R. 1995. La producción de mango en México. Noriega editores. México. p. 84-86.
- Becerra-Necha, L., Bautista-Baños, S. 2003. Evaluación del potencial antifúngico de extractos vegetales crudos en la germinación de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides*. X congreso Nacional de Ciencias Hortícolas. p 168.
- Benhamou, N., 1992. Ultrastructural and cytochemical aspects of chitosan of *Fusarium oxysporum* f. sp. Radicis-lycopersici, agent of tomato crown and root. Phytopathology 82, 1185-1193.
- Benhamou, N., Lafontaine, P.J., Nicole, M., 1994. Induction of systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. Phytopathology 84, 1435-1444.
- Bhaskara Reddy, M.U. Essaid, A.B. Castaigne, F., Arul, J., 1997. Effect of chitosan on growth and toxin production by *Alternata* f. sp. Lycopersici. 94th. Int. Conf. Am. Soc. Hort. Sci. Vol. 32, Salt. Lake City, Utah, USA, 237pp.(Abs).
- BIOCAMPO.2002. Nematicidas orgánicos. BioCampo S.A. DE C.V. Coahuila, México. S/p.
- Bonde, M.R., Peterson, G.L., and Maas, J. L. 1991. Isozyme Comparisons for Identification of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. Phytopathology 81:1523-1528.
- Bravo, L.L., Corona, R., Villa, A.P., Hernández, A.R., Becerra, N., Bautista, B.S., Bermúdez, T.K. 2003. Efecto de extractos vegetales crudos sobre el crecimiento micelial de tres cepas de *Colletotrichum gloeosporioides*. X Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas p 90.
- Brown, G. E. 1975. Factors affecting postharvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits. Phytopathology 65:404-409.
- Casarrubias-Carrillo, U., Gonzáles-Chavira, M., Cruz-Hernández, A., Cárdenas-Soriano, E., Nieto-Ángel, D., Guevara-González, R.G. 2003. Variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. aislado frutos de papaya (*Carica*

- papaya* L.) mediante el uso de marcadores moleculares RAPD. Revista Mexicana de Fitopatología 21:338-345.
- Casarrubias-Carrillo, U; Cardenas-Soriano, E; Nieto-Angel, D. y Gutiérrez-Alonso, J.G. 2002. Histopatología de Frutos de Papaya (*Carica papaya* L.) Infectados por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Revista Mexicana de Fitopatología 20:88-93.
- Chandra. R.R. Biodegradable Polymers. Prog. Polym Sci. 1998, Vo.23. 1273-1335.
- Chanler, W.H. 1958. Evergreen Orchards, Filadelfia.
- Chau, K.F. and Alvarez, A.m.1983. A histological study of anthracnose on *Carica papaya*. Phytopathology 73:1113-1116.
- Chitwood, D.J. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. Annual Review Phytopathology 40:221-249.
- Daquioag, V.R. and Quimio, T.H. 1978. Latent infection in mango caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Philippines Phytopathology 15: 35-46
- Daykin, M.E. and Milholland, R.D. 1984. Histopathology of ripe rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides* son muscadine grape. Phytopathology 74: 1339-1341.
- de Capdeville, G., Wilson, L.C., Beer, V. S; and Aist, R. 2002. Alternative Disease Control Agents Induce Resistance to Blue Mold in Harvested 'Red Delicious' Apple Fruit. Phytopathology 92:900-908.
- Dickman, M. B. and Alvarez, A. 1983. Latent infection of Papaya caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Plant Disease 67:748-750.
- Dickman, M.B. and Alvarez, A.M. 1983. Latent infection in mango caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Plant Diseases 67:748-750.
- E Ghaouth, A., Ponnampalam, R., Castaigne, F., Arul, J., 1992b. Chitosan Coating to extend the storage life of tomatoes. Hort Sci. 9:1016-1018.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Wilson, C., Benhamou, N., 1997. Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. Postharv. Biol. Technol. 12, 183-194.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J., Asselin, A., 1992a. Antifungal activity of Chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. Phytopathology 82:398-402.
- El Ghaouth, A; Arul, J; Pannampalam, R; Boulet, M. (1991). Chitosan Coating effect on Storability and quality of fresh Strawberries. J. Food Sci. 56(6) 1618-1620.

- FAO. 1983. Production Yearbook 1982. Roma.
- Finch, H. C. ph. D. Finch, M.A. 1990. Los Hongos comunes que atacan cultivos en América Latina. Editorial Trillas. Segunda Edición. San Luis Obispo,, California. EUA. PP. 187:34-35.
- Fitzell, R.D. 1979. *Colletotrichum ocutatum* as a cause of anthracnose of mango in New South Wales. Plant Diseases Repoter 63:1067-1070.
- García, R. E. y Becerra, N.L. 1987. Taller de Fitopatología Tropical. Industria Editorial. Segunda Edición. Mexico. p. 451
- Gutiérrez-Alonso, J.G., Nieto-Angel, D., Teliz-Ortiz, D., Zavaleta-Mejia, E., Vaquera-Huerta,H., Martinez-Damian, T. y Delgadillo-Sanchez, F. 2001. Características del Crecimiento, Germinación, Esporulación y Patogenicidad de Aislamiento de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Obtenidos de frutos de mango (*Mangifera indica* L.) Revista Mexicana de Fitopatología 19:90-93.
- Hassan, MK; Shipton, WA; Coventry, R; Gardiner, C. 2004.Extension of banana Shelf life.Article. Australasian Plant Pathology, 33(2):305-308.
- Hirano, A., Nagao, N., 1989. Effects of Chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several Phytopathogens. Agric. Biol. Chem. 11, 3065-3066.
- Hirano, A., Nagao, N., 1989. Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several Phytopathogens. Agric. Biol. 11, 3065-3066.
- Hu, X; Cao, N.B.; Hu, G; He, J; Yang, Q.D. and Wan, S.Y. 2002. Attenuation of cell migration and induction of cell death by aged garli extract in rat sarcoma cells. International Journal of Medicine 9:641-643.
- Iglesias A.M; Paniagua, P.A; Larralde, C. C.P; Shirai, K.O. 2002. Inducción de enzimas degradadoras de pared celular de hongos *Verticillium fungicola* y sus interacciones con hongos fitopatogenos. Libro de Resúmenes. Sociedad Polimérica de México AC. VIII Simposio Latinoamericano de Polímeros. Acapulco, Guerrero, México. p.679-680.
- K. Ohakawa, M. Yamada, A. Nishida, N. Nishi, H. Yamamoto. Biodegradation of chitosan-gellan and Poly (lisien)-gellan polyion complex fibres by pure cultures of soil filamentous fungi. Journal of Polymers and Environment. 2000. vol.8. No. 2.
- Kitajima, E.W., C.R.F. Martins, and A.A. Santos. 1993. Identification of a rhabdo-virus in soursop (*Annona muricata*). Plant Disease 77:276-278.

- Lason-Tsigos; Martinou, A; Kafetzopoulos, D. and Bouriotis, V. Chitin desacetylases: new, versatile, tool in Biotechnology. Tibtech July 2000 (vol. 18). p.305-310.
- Li, H., Yu, T., 2000. Effect of Chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit J. Sci. Food Agric. 81, 269-274.
- Lira, S., R..H.2003d. Estudio actual del conocimiento sobre las propiedades biocidas de la gobernadora *Larrea tridentata* (D.C.) Coville. Revista Mexicana de Fitopatología 21:215-223.
- Lira, S.,R.H., Balvantin, G.F. Hernández, CF.D. y Jiménez, D. Jasso de R.D. 2003b. Evaluation of resin content and the antifungal effect of *Larrea tridentata* (Sesse and Moc. Ex. DC) Coville extracts from two Mexican deserts against *Pythium* sp. Pringsh. Revista Mexicana de Fitopatología 21:115-119.
- Loaiza, J. E. y Rivera, G. 1996. Estudio preliminar del efecto fungicida de extractos de diez plantas sobre el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, mediante pruebas in vitro y sobre arboles de guanábana (*Annona muricata*) en invernadero. Resumen. X Congreso Agronomico Nacional y de Recursos Naturales y III Congreso Nacional de Fitopatologia del Colegio de Ingenieros Agrónomos de Costa Rica. P. 86.
- Lorito, M., Di Pietro, A. Hayes, C. K., Woo, S.L. and Harman, G. E. 1993b. Antifungal, synergistic interaction between chitinolytic enzymes for *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*. Phytopatology, 83: 721-728.
- Maas, J.L. 1983. Anthracnose of strawberry fruit in Mayland. Plant Diseases Reporter 62: 488-492.
- Masel, A., Braithwaite, K., Irwin, J. 1990. Highly variable molecular karyotypes in the plant pathogen *Colletotrihum gloeosporioides*. Current Genetics 18:81-86.
- Miranda, C.P; Barajas, G.H; Cardenas, T. G. 2002. Identificación de la actividad de Quitin deacetilasa microbiana. Libro de Resúmenes. Sociedad Polimérica de México AC.VIII Simposio Latinoamericano de Polímeros. Acapulco, Guerrero, México. p:677-678
- Montes-Belmont, R., Cruz-Cruz, U., Martinez-Martinez, G., Sandoval-Garcia, G., Garcia-Licona, R., Zilch-Domínguez, S., Bravo-Luna L., Bermúdez-Torres K., Flores-Moctezuna, H.R., Carvajal- Moreno, M., 2000. Propiedades anfifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. Rev. Mex. Fitopatol. 18:125-131.

- Mora, J. y Arauz, L.F. 1996. Efecto de los residuos vegetales de la poda sanitaria, sobre la incidencia de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en la guanábana. Resumen. X Congreso Agronomico Nacional y de Recursos Naturales y III Congreso Nacional de Fitopatología del Colegio de Ingenieros Agrónomos de Costa Rica. P. 86.
- Morales-Garcia, J. 1996. Caracterización cultural, morfológica patogénica y molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Causante de la antracnosis del aguacate Michoacán. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. De México. 96 p.
- Morton, J.F. 1987. Fruits of Warm Climates. Media Incorporated. University of Miami. USA. 506 p.
- Mosqueda, V. R. 1987. Taller de Fitopatología Tropical. C.P. Segunda Edición. Sociedad Mexicana de Fitopatología. p. 319-344.
- Nava-Díaz, C; Osada, K.S; Rendón, S.G; Ayala, E. V. 2000. Organismos Asociados a Chirimoyo (*Annona* spp.) en Michoacán. México. Agrociencia 34:217-226.
- No, H.K, and Meyers, S.P. 1995. Preparation and characterization of chitosan-A review. J. Aquatic Food Tech. 4:27-52.
- No, H.K., Park, N.A., Lee, S.O., Meyers, S.P. 2001. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. International Journal of Food Microbiology 74:65-72.
- Ohta, K., Taniguchi, A., Konichi, N. and Hosoki, T. 1999. Chitosan treatment affects plant growth and flower quality in *Eustoma grandiflorum*. Hort Science 34:233-234.
- Orozco-Santos, M. 1984. estimación del daño causado por la caída de frutos pequeños y su control químico en naranja valencia. En: XI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. San Luis Potosí, San Luis Potosí, México. p.64
- Palti, J., Pinkas, Y., and Chorin, M. 1974. Powdery mildew of mango. Plant Disease Reporter 58:45-49.
- Paulin-Nava, T. 2000. Situación y Perspectiva del Mango en México. CD: Memorias del Simposium Latinoamericano del mango. México s/p.
- Pérez, W; Bernal, B; Martín, A; 2003. Estudio de dos extractos vegetales para el control in vitro del hongo *Corynespora cassiicola*. Resúmenes. Conferencia Panamericana de Fitopatología. South Padre Island, Texas. U.S.A. p.261.

- Plascencia, M; Olayo, R; Larralde, P; Castillo, O; Shirai, K. 2001. Effect of Chitosan of fungal growth using morphometric evaluation. En: Chitin y Chitosan in Life Science. Uragami, T; Kurita, K. Y. Fukamiso, T. (editores), Kodansha Scientific LTD. Tokio, pp. 256-259
- Ploetz, R.C; y Prakash, O. 2000. Foliar, Floral and Uses. Litz, E.R. (editor). CAB. International. London, UK.PP.281-285.
- Prusky, D. 1991. Mango Diseases: An Overview. Acta Horticulturae 291:279-289.
- Rivas-Figueroa, E. y Edwin-Gakegne, R. 2001. Nueva enfermedad foliar del mango (*Mangifera indica*) en Cuba. Revista ,Mexicana de Fitopatología 19:104-106.
- Roller, S., and Covill, N. 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. Int. J. Food Microbiol. 47:67-77.
- Romanazzi, G. Nigro, F. Hipólito, A. Di Venere, D. And Aalerno, M. 2002. Effects of pre and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. Journal of food Science 67:1862-1867.
- Salvador, L; Miranda, P.S; Aragón, N. y Lara, V. 1999. Recubrimiento de quitosan en aguacate. Rev. Soc. Quim. Mex. 43:18-23.
- Samson, J.A. 1991. Fruticultura Tropical. Limusa Editoriales; Grupo Noriega. Primera edición. México p. 396.
- Sandoval, E.A; Hernández, O.J; Montecillo, T.J.L. y Quilantan, C.J. 1993. Manual de Producción de Mango en la Costa de Chiapas. INIFAP. Ocozocoautla, Chiapas, México. 21 p.
- Savard, T; Beaulieu, C; Boucher, I and Champagne P. C. 2002. Antimicrobial Action of Hydrolyzed Chitosan against Spoilage Yeasts and Lactic Acid Bacteria of Fermented Vegetables. Journal. Food Protection. Agri Food 65:828-833.
- Schoeman, M.H., Manicom, B.Q., and Wingfield, M.J. 1995. Epidemiology of powdery mildew on mango blossoms. Plant Disease, 79:524-528.
- Storey, W.B. 1969. Tropical Crops. Dicotyledons, Longman. Perennial Crop breeding in the tropics, Wageningen.
- Tovar, S.A. 2002. Escala Logarítmica Diagramática de Severidad de la Mancha Negra (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) en Chirimoyo. *Annona* spp. Revista Mexicana de Fitopatología 20:103-109.

- Trujillo, E.E. and Obrero, F.P.1969. Anthracnose of Papaya leaves caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Plant Dis. Report. 53:323-325
- Valdez, N. C. 1989. Etiología de la enfermedad “Mancha Negra de la Chirimoya” *Annona* spp. En la región de Uruapan Michoacán. México. 46 p.
- Vidales, J.A. 1997. Sensibilidad de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) a diferentes funguicidas usado en aguacate (*Persea americana*) en poscosecha. Memorias del XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Resumen 50.
- Zamora, J. M. 1984. Cytotoxic, Antimicrobial and Phytochemical Properties of *Larrea tridentata* Cav. (Tesis).University Microfilms Intenational Editorial Alburn, Alabama. p. 216.

APENDICE

Equipos de laboratorio y Materiales empleados

- Autoclave automática Yamato, modelo 5M510.
- Balanza analítica Scientech, modelo SA410.
- Balanza granataria ACCULAB
- Campana de flujo laminar Precision Scientific, Inc. modelo 815.
- Cámara de extracción
- Incubadora precision Scientific, modelo 815.
- Microscopio compuesto, marca UNICO, modelo 200301878
- Microscopio óptico, marca OLYMPUS, modelo BX60
- Parrilla eléctrica CORNING PC-500
- Potenciómetro eléctrico Thermo Orión 420.
- Refrigerador, marca Tor Rey, modelo A-28
- Reactor Brighthon modelo X 1000
- Rotavapor, marca BÜCHNI, modelo R-215

Material

- Agitador de vidrio
- Aguja de disección
- Algodón
- Asa bacteriológica
- Atomizador
- Bisturí
- Bulbo de succión para pipetas
- Cámara de Neubauer marca Marienfeld
- Cajas petri desechables
- Charolas
- Cubetas de plástico de 20 litros
- Cubre y portaobjetos
- Cubre bocas

- Embudo de filtración
- Envases de plástico para extractos
- Espátula
- Gasas estériles
- Gradillas
- Guantes de asbesto
- Guantes de látex estériles
- Plástico
- Mascarilla
- Matraces Erlenmeyer
- Matraces volumétricos
- Mecheros Fisher
- Micropipetas marca Rainin
- Navajas tipo exacto
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Papel estraza
- Pissetas
- Pipetas
- Probetas
- Puntas para micropipeta
- Sacabocados
- Termómetros
- Termopar
- Tubos de ensaye
- Vasos de precipitados
- Vernier

Reactivos

- ❑ Acetona
- ❑ Azul de Metileno
- ❑ Ácido acético glacial al 99.9 %
- ❑ Agua destilada
- ❑ Alcohol etílico al 70%
- ❑ Hipoclorito de Sodio
- ❑ Etanol
- ❑ Extracto resinoso de *Larrea*
- ❑ Hidróxido de sodio
- ❑ Lactofenol
- ❑ Metanol
- ❑ Medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) marca BIOXON
- ❑ Funguicida Mancozeb
- ❑ Quitosan de bajo y alto peso molecular de la compañía SIGMA Aldrich
- ❑ Funguicida Tecto 60
- ❑ Tween 80

Análisis de varianza realizados con el programa computacional estadístico de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Versión 2.5.

Bioensayos *in vitro*

Cuadro 1. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial radial a las 240 horas (10 días) del hongo *C. gloeosporioides* (cepa 372) sometido a diferentes dosis de la solución de quitosan de bajo peso molecular y dosis del extracto etanólico de *L. tridentata* así como los testigos químicos.

F.V.	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	14	125207.437500	8943.388672	9064.2451**	0.000
Error	75	74.000000	0.986667		
Total	89	125281.437500			

C.V. = 1.53 % y altamente significativo**

Cuadro 2. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial radial a las 240 horas (10 días) del hongo *C. gloeosporioides* (cepa 372) sometido a diferentes dosis de la formulación de quitosan-Larrea y un testigo absoluto(PDA) sin extracto.

F.V.	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	14	81154.500000	5796.750000	1872.9402**	0.000
Error	75	232.125000	3.095000		
Total	89	81386.625000			

C.V. = 2.15 % y altamente significativo**

Cuadro 3. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial radial a las 240 horas (10 días) del hongo *C. gloeosporioides* (cepa 264) sometido a diferentes dosis de la solución de quitosan de bajo peso molecular y dosis del extracto etanólico de *L. tridentata* así como los testigos químicos.

F.V.	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	14	65420.343750	4672.881836	799.0109**	0.000
Error	75	438.625000	5.848333		
Total	89	65858.968750			

C.V. = 3.29 % y altamente significativo**

Cuadro 4. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial radial a las 240 horas (10 días) del hongo *C. gloeosporioides* (cepa 264) sometido a diferentes dosis de la formulación de quitosan-Larrea y un testigo absoluto(PDA) sin extracto.

F.V.	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	14	62638.937500	4474.209961	1098.8645**	0.000
Error	75	305.375000	4.071667		
Total	89	62944.312500			

C.V. = 2.46 % y altamente significativo**

Cuadro 5. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial radial a las 240 horas (10 días) del hongo *C. gloeosporioides* (cepa 322) sometido a diferentes dosis de la solución de quitosan de bajo peso molecular y dosis del extracto etanólico de *L. tridentata* así como los testigos químicos.

F.V.	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	14	124771.687500	8912.263672	3340.5330**	0.000
Error	75	200.093750	2.667917		
Total	89	124971.781250			

C.V. = 2.99 % y altamente significativo**

Cuadro 6. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial radial a las 240 horas (10 días) del hongo *C. gloeosporioides* (cepa 322) sometido a diferentes dosis de la formulación de quitosan-Larrea y un testigo absoluto(PDA) sin extracto.

F.V.	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	14	92518.125000	6608.437500	1247.7579**	0.000
Error	75	397.218750	5.296250		
Total	89	92915.343750			

C.V. = 4.12 % y altamente significativo**

Cuadro 7. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial radial a las 264 horas (11 días) del hongo *C. gloeosporioides* (cepa 187) sometido a diferentes dosis de la solución de quitosan de bajo peso molecular y dosis del extracto etanólico de *L. tridentata* así como los testigos químicos.

F.V.	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	14	68972.343750	4926.596191	1687.6721**	0.000
Error	75	218.937500	2.919167		
Total	89	69191.281250			

C.V. = 2.39 % y altamente significativo**

Cuadro 8. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial radial a las 264 horas (11 días) del hongo *C. gloeosporioides* (187) sometido a diferentes dosis de la formulación de quitosan-Larrea y un testigo absoluto(PDA) sin extracto.

F.V.	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	14	67415.250000	4815.375000	146.5421**	0.000
Error	75	2464.500000	32.860001		
Total	89	69879.750000			

C.V. = 6.73 y altamente significativo**

Cuadro 9. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial radial a las 192 horas (6 días) del hongo *C. gloeosporioides* (cepa CFG-4) sometido a diferentes dosis de la solución de quitosan de bajo peso molecular y dosis del extracto etanólico de *L. tridentata* así como los testigos químicos.

F.V.	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	14	92960.406250	6640.028809	408.9212**	0.000
Error	75	1217.843750	16.237917		
Total	89	94178.250000			

C.V. = 6.86 % y altamente significativo**

Cuadro 10. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial radial a las 192 horas(6 días) del hongo *C. gloeosporioides* (cepa CFG-4) sometido a diferentes dosis de la formulación de quitosan-Larrea y un testigo absoluto(PDA) sin extracto.

F.V.	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	14	52564.218750	3754.587158	291.9207**	0.000
Error	75	964.625000	12.861667		
Total	89	53528.843750			

C.V. = 5.90 % y altamente significativo**

Cuadro 11. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial radial a las 192 horas (8 días) del hongo *C. gloeosporioides* (cepa 372) sometido a diferentes dosis de la soluciones de quitosan de alto peso molecular.

F.V.	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	9	76956.187500	8550.687500	402.2670	0.000
Error	40	850.250000	21.256250		
Total	49	77806.437500			

C.V. = 8.39 % y altamente significativo**

Bioensayos *in vivo*

Cuadro 12. Análisis de varianza de datos del porcentaje de incidencia a las 144 horas (6 días) de la antracnosis en frutos de papaya ocasionado por el hongo *C. gloeosporioides* (cepa 372) sometido a una dosis de la solución de quitosán de bajo peso molecular y dosis del extracto etanólico de *L. tridentata* así como una formulación de ambos bioproductos (Q-L).

F.V.	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	5989.582031	1996.527344	1.9167 ^{NS}	0.205
Error	8	8333.335938	1041.666992		
Total	11	14322.917969			

C.V. = 49.97 % y altamente significativo^{NS}

Cuadro 13. Análisis de varianza de datos del Grado de severidad a las 144 horas (6 días) de la antracnosis en frutos de papaya ocasionado por el hongo *C. gloeosporioides* (cepa 372) sometido a una dosis de la solución de quitosán de bajo peso molecular y dosis del extracto etanólico de *L. tridentata* así como una formulación de ambos bioproductos (Q-L).

F.V.	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	18.250000	6.083333	10.4286**	0.004
Error	8	4.666664	0.583333		
Total	11	22.916664			

C.V. = 26.19 % y altamente significativo**