

**Universidad Autónoma Agraria
Antonio Narro**

División de Agronomía



**Efecto Antifúngico de Extractos Etanólicos y Clorofórmicos de
Resina de Gobernadora (*Larrea tridentata*) de los Desiertos
Chihuahuense y Sonorense sobre *Rhizoctonia solani* y
Fusarium oxysporum.**

Por:

José Lorenzo Guzmán Galindo

Tesis

Presentada Como Requisito Parcial Para Obtener el Título de:

**Ingeniero Agrónomo Parasitólogo
Buenvista, Saltillo, Coahuila, México
Febrero de 2002**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

DIVISIÓN DE AGRONOMIA

**Efecto antifúngico de Extractos Etanólicos y Clorofórmicos de Resina de¹
Gobernadora (*Larrea tridentata*) de los Desiertos Chihuahuense y
Sonorense sobre *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*.**

Realizado por.

José Lorenzo Guzmán Galindo

Tesis

**Que Somete a Consideración del H. Jurado Examinador
Como Requisito Parcial para Obtener el Título de:**

Ingeniero Agrónomo Parasitólogo

DR. Alberto Flores Olivas
Presidente del Jurado

Dr. R. Hugo Lira Saldivar
Asesor (CIQA)

M. C. Jesús García Camargo
Sinodal

Dr. Abiel Sánchez Arizpe
Sinodal

M. C. Reynaldo Alonso Velasco
COORDINADOR DE LA DIVISION DE AGRONOMIA

¹Este material está basado en el proyecto "Plasticidad Fenotípica y Genotípica de *Larrea Tridentata* y Relación con su Actividad Biocida y en la Germinación de Semillas" apoyado por una subvención del Instituto México - Estados Unidos de la Universidad de California (UC - MEXUS y CONACYT).

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México
Febrero de 2002

CONTENIDO

	Pag.
INDICE DE CUADROS.....	III
INDICE DE FIGURAS.....	IV
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos.....	3
Hipótesis.....	3
REVISION DE LITERATURA.....	4
Antecedentes sobre el uso de extractos vegetales en México.....	4
Respuesta de los hongos a los extractos vegetales.....	4
Descripción y clasificación botánica de <i>L. tridentata</i>	7
Distribución y adaptación geográfica de <i>Larrea</i>	9
Importancia económica de <i>Rhizoctonia solani</i>	10
Clasificación y etiología de <i>Rhizoctonia solani</i>	10
Clasificación taxonómica.....	10
Etiología.....	11
Sintomatología de <i>R. solani</i> en las plantas.....	12
Control cultural de <i>R. solani</i>	12
Clasificación y etiología de <i>Fusarium oxysporum</i>	13
Clasificación taxonómica.....	13
Etiología	13
Síntomas de <i>F. oxysporum</i> en la planta.....	14
Ciclo del hongo <i>F. oxysporum</i>	15
Control.....	16
MATERIALES Y METODOS.....	17
Ubicación del área experimental.....	17

Sitios de colecta de <i>Larrea tridentata</i>	17
	Pag.
Extracción de la resina con equipo soxhlet.....	18
Extracción de la resina por inmersión en los solventes.....	18
Obtención de los aislados de <i>R.solani</i> y <i>F.oxysporum</i>	19
Realización de los bioensayos <i>in vitro</i>	19
Diseño experimental y variables de estudio.....	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
Concentración de resina en el follaje.....	21
Efecto de las dosis de los extractos etanólicos y clorofórmicos sobre <i>R. solani</i>	23
Efecto de las dosis de los extractos etanólicos y clorofórmicos sobre <i>F. oxysporum</i>	27
RESUMEN.....	36
CONCLUSIONES.....	40
LITERATURA CITADA.....	41

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Pag.
1	Comparación de valores promedio de la concentración de resina en el follaje de <i>L. tridentata</i> extraída con los solventes etanol y cloroformo de las muestras colectadas en el Desierto Chihuahuense.....	22
2	Comparación de valores promedio de la concentración de resina en el follaje de <i>L. tridentata</i> extraída con los solventes etanol y cloroformo de las muestras colectadas en el Desierto Sonorense.....	22
3	Comparación de medias del porcentaje de inhibición <i>in vitro</i> de <i>Rhizoctonia solani</i> Kühn con dosis de resina etanólica de <i>L. tridentata</i> obtenida de cuatro sitios de muestreo en los desiertos Chihuahuense y Sonorense.....	25
4	Comparación de medias del porcentaje de inhibición de <i>R. solani</i> Kühn con dosis de resina clorofórmica de <i>L. tridentata</i> obtenida de cuatro sitios de muestreo en los desiertos Chihuahuense y Sonorense.....	27
5	Comparación de medias del porcentaje de inhibición <i>in vitro</i> de <i>Fusarium oxysporum</i> con dosis de resina etanólica de <i>L. tridentata</i> obtenidas de cuatro sitios de muestreo en los Desiertos Chihuahuense y Sonorense.....	29
6	Comparación de medias del porcentaje de inhibición de <i>F. oxysporum</i> con dosis de resina clorofórmica de <i>Larrea tridentata</i> obtenida de cuatro sitios de muestreo en los desiertos Chihuahuense y Sonorense.....	31
7	Comparación general de medias del porcentaje de inhibición de <i>R. solani</i> . con extractos etanólico y clorofórmico de <i>L. tridentata</i> provenientes de cuatro sitios de muestreo de dos zonas desérticas del norte de México.....	33

8	Comparación general de medias del porcentaje de inhibición de <i>F. oxysporum</i> con extractos etanólico y clorofórmico de <i>L. tridentata</i> provenientes de cuatro sitios de muestreo de dos zonas desérticas del norte de México.....	35
---	---	----

INDICE DE FIGURAS

Figura		Pag.
1	Inhibición <i>in vitro</i> del desarrollo micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> Kühn con dosis de extractos hidrosolubles etanólicos de resina de <i>L. tridentata</i> obtenidos de dos regiones desérticas del norte de México.....	24
2	Inhibición del desarrollo micelial de <i>R. solani</i> Kühn con dosis de extractos hidrosolubles clorofórmicos de resina de <i>L. tridentata</i> obtenidos de dos regiones desérticas del norte de México.....	26
3	Inhibición del desarrollo micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> con dosis de extractos hidrosolubles etanólicos de resina de <i>L. tridentata</i> obtenidos de dos regiones desérticas del norte de México.....	28
4	Inhibición del desarrollo micelial de <i>F. oxysporum</i> con dosis de extractos hidrosolubles clorofórmicos de resina de <i>L. tridentata</i> obtenidos de dos regiones desérticas del norte de México.....	30
5	Comparación general de medias del porcentaje de inhibición de <i>R. solani</i> y <i>F. oxysporum</i> evaluado con seis dosis de resina hidrosoluble de <i>L. tridentata</i> proveniente de dos regiones desérticas y extraída con dos solventes.....	32

INTRODUCCIÓN

El incremento constante de la población en México y la incorporación del país al tratado de libre comercio con Estados Unidos, Canadá y otros países, exigen que la agricultura nacional sea más rentable y eficaz, por lo que se deben buscar nuevas alternativas de producción que le permitan a los productores ser autosuficientes y obtener cosechas de calidad que puedan ser competitivas a nivel internacional.

El uso indiscriminado de plaguicidas desde inicios del siglo pasado y debido al uso generalizado e irracional de éstos en el campo, poblaciones de insectos y microorganismos fitopatógenos han desarrollado resistencia a los productos más comúnmente usados, con la consecuente contaminación del suelo, agua y aire. Además, se ha provocado la intoxicación de numerosos trabajadores del campo y se ha eliminado a enemigos naturales, por lo que ahora se buscan alternativas menos tóxicas para el medio ambiente y las personas, que permitan desarrollar sistemas de producción sostenibles, más amigables con el medio ambiente, sin provocar un detrimento de la calidad de vida del hombre y para mejorar los ecosistemas. (Montes-Belmont, 1996).

Las enfermedades constituyen una de las principales limitantes en la actividad agrícola, su control se hace básicamente con compuestos químicos inorgánicos con el consecuente incremento en los costos de producción y contaminación. Durante los últimos 30 años se ha generado un creciente interés por el uso de productos orgánicos para ser empleados como microbicidas agrícolas. Esto puede eliminar varios efectos adversos causados por el uso de compuestos sintéticos debido a la rápida biodegradabilidad de los metabolitos orgánicos, ya que éstos desaparecen con facilidad del medio ambiente

aéreo y del suelo después de que son aplicados en el campo (Tanaka y Omura, 1993).

Debido a lo antes mencionado y a la tendencia mundial por encontrar productos alternativos para el control de plagas y enfermedades en los cultivos, es necesario detectar y estudiar aquellas plantas que tengan un potencial uso como agroquímicos naturales vegetales, debido a los metabolitos secundarios que biosintetizan y que tienen un efecto fungicida contra hongos fitopatógenos.

Una de estas plantas que se encuentra ampliamente distribuida en las zonas semidesérticas del norte de México es la gobernadora (*Larrea tridentata*), la cual ha demostrado tener interesantes propiedades, destacándose entre éstas, su acción antifúngica. Los trabajos pioneros realizados en el CIQA por Fernández et al., en 1979 consignaron las propiedades antifúngicas de diversos extractos obtenidos de esta abundante planta de la que casi no se conocen insectos ni enfermedades que la ataquen.

Una característica fitoquímica de esta especie es que produce una gran cantidad de resina que se acumula en sus hojas, ramas y tallos. Esta resina constituye hasta más del 26 % del peso seco de hojas jóvenes y el 10% de hojas maduras (Rhoades, 1977). El principal componente en la resina de las hojas de *Larrea tridentata* es el ácido nordihidroguayarático (NDGA), el cual es un fuerte antioxidante que ha demostrado tener propiedades antimicrobiales y fungistáticas contra numerosos microorganismos fitopatógenos (Garza et al., 1996; García et al., 1997 y Lira et al., 2001).

Objetivos

Con base en lo antes expuesto en este trabajo se plantean los siguientes objetivos:

- Determinar cuantitativamente la posible diferencia en la concentración de resina del follaje de gobernadora colectada en diferentes sitios localizados en un gradiente latitudinal del Desierto Sonorense y de dos gradientes (latitudinal y altitudinal), de una porción del Desierto Chihuahuense ambos localizados en las zonas áridas del Norte de México.
- Estudiar el efecto antifúngico de diversas dosis de extractos etanólicos y clorofórmicos de *Larrea tridentata* o gobernadora obtenidos en una porción de los desiertos Chihuahuense y Sonorense sobre los hongos *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*.

Hipótesis

- Los extractos obtenidos de la resina de la Gobernadora (*Larrea tridentata*) se verán modificados por las condiciones del medio ambiente de los desiertos Chihuahuense y Sonorense, por lo que tendrán un efecto fungicida diferencial en los hongos *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*.
- Los solventes utilizados para la extracción de la resina del follaje de la gobernadora tienen polaridad diferente, debido a esto su efecto inhibitorio en el desarrollo micelial *in vitro* en los dos hongos fitopatógenos.
- Debido a las diferentes características fisiológicas de los dos hongos objeto de este estudio, se verán afectados en su desarrollo de manera

diferente, en función de las dosis a evaluar en los bioensayos.

REVISIÓN DE LITERATURA

Antecedentes sobre el uso de extractos vegetales como fungicidas

Desde hace muchos años el uso de extractos vegetales acuosos o material molido y hecho polvo de plantas se ha usado para la prevención y control de enfermedades. Recientemente, Montes (2000), publicó un artículo en el que hace un análisis retrospectivo de las investigaciones realizadas sobre las propiedades antifúngicas de las plantas superiores.

En los pasados 12 años de investigaciones sobre plantas con propiedades antifúngicas se han evaluado un total de 206 especies de plantas contra la actividad de 26 especies de hongos fitopatógenos, incluyendo pruebas de germinación de esporas, desarrollo micelial, esporulación y pruebas de invernadero y campo en algunos casos. La formulación de productos vegetales utilizados han sido: extractos acuosos y hexánicos, polvos, aceites esenciales y metabolitos secundarios antifúngicos. Los resultados han indicado que entre 32 y 51 % de las plantas evaluadas interactúan con los hongos y la respuesta de los patógenos varía desde la estimulación biológica hasta su total inhibición (Montes, 2000).

Respuesta de diversos hongos fitopatógenos a los extractos vegetales

Un estudio realizado por Garza, et.al., (1996), demostraron que los

extractos de la gobernadora a base de etanol, cloroformo e hidróxido de sodio inhibió el desarrollo del hongo *Rhizoctonia solani* bajo condiciones *in vitro* con los tres extractos de *L. tridentata*.

Un estudio realizado por Salazar, et al (1990), mostró que la resina de la planta rastrera conocida comúnmente como alfombrilla (*Drimaria arenarioides*) al ser aplicada sobre los hongos *Alternaria solani* y *R. solani* inhibió su crecimiento, sin embargo, no mostró ser un producto fungicida para su control, este extracto fué más eficiente contra *F. solani*, ya que fue inhibido hasta en un 85% a dosis de 5000 ppm; mientras que al hongo que menos afectó fue *A. solani*.

Los trabajos realizados por Morín (1987), mostraron la eficacia de extractos *in vitro* de crucíferas sobre el crecimiento micelial del hongo *R. Solani*; este autor señala que el extracto de coliflor inhibió moderadamente el crecimiento micelial de *R. solani*, seguido de la col y por último el de brócoli. Después de 80 días los extractos de coliflor y brócoli inhibieron más el crecimiento del patógeno, en cambio el de col lo estimuló, mientras que el desarrollo micelial de *R. solani* decreció a una mayor dosis; esto mostró que hubo diferencias entre los extractos de las partes de las plantas que fueron usadas, ya que el extracto que más restringió al patógeno fue el que se obtuvo de las hojas, seguido por el de planta completa y la raíz.

Los estudios realizados por Maciel (1979), Granados (1989) y Quiroga (1990) (Citados por Hernández y granados 1992) reportaron que las plantas llamadas comúnmente nescafé (*Stizolobium deeringianum*), cudzú (*Pueraria phaseoloides*) y frijolón (*Canavalia ensiformes*), tienen acción fungicida ó fungistática, pero no demostraron que tuvieran algún efecto sobre *Aspergillus*, *Penicillium* y *Monilia*. Los extractos redujeron en mas del 50 % el crecimiento de *Alternaria* y *Fusarium* a dosis de 2000 y 4000 ppm.; sin embargo, *Pueraria phaseoloides* mostró su mejor efecto con 4000 ppm, ya que con esta dosis

se logró una inhibición del 86.7 % en el crecimiento de *Alternaria* sp.

En el estudio realizado por Sandoval, (1993), se menciona que el extracto de semilla de toronja es usado como desinfectante, conservador de alimentos y para prolongar la vida de anaquel de frutos y verduras. El trabajo de este autor tuvo como objetivo evaluar la efectividad *in vitro* contra *R. solani* y *Erwinia carotovora* del extracto de semilla de toronja (“Citrucidal”). Sus resultados indican que este producto inhibió al 100% el crecimiento micelial de los hongos en el medio de cultivo PDA a concentraciones desde 600 hasta 4,800 ppm de ingrediente activo. Este extracto también inhibió el desarrollo de colonias bacterianas en el medio de cultivo agar nutritivo a concentraciones de 30 a 240 ppm.

Un trabajo realizado por Zavaleta, (1987), relacionado con la incorporación de residuos de gobernadora (*Larrea tridentata*) y epazote (*Chenopodium ambrosioides*) en suelos infestados con *Pythium aphanidermatum* y *Rhizoctonia solani*, se sembró frijol bajo condiciones de invernadero; los tratamientos que reportaron un mayor porcentaje de germinación al disminuir muertes por marchitez, fueron los que resultaron de las combinaciones de epazote más *R. solani*, gobernadora + *R. solani* y el testigo.

Con base en lo descrito por García, et.al., (1997), indican que el efecto de las hojas de gobernadora en polvo para el control de las enfermedades de la raíz en jitomate redujo su efecto patológico de los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum* y *Phytophthora capsici* cuando se le adiciono *L. tridentata* en polvo al suelo infectado.

Descripción y clasificación botánica de *Larrea tridentata*

Gobernadora (*Larrea tridentata*) es un arbusto nativo perenne, ecológicamente dominante y ampliamente distribuido en las zonas semiáridas de los desiertos Chihuahuense y Sonorense del norte de México; así como en el Desierto Mojave en la zona árida de California y Suroeste de Estados Unidos (Rundel, et al., 1994). Se estima que el 25% (500000 km² de la República Mexicana está cubierta con este arbusto del semidesierto (Belmares, et al., 1979), el cual ha desarrollado diversas adaptaciones para tolerar las sequías y las altas temperaturas.

De acuerdo con la descripción de Brinker (1994), *L. tridentata* es un arbusto xerófito muy ramificado, perennifolio, de 0.6 a 3m de altura, con hojas formadas por 2 folíolos unidos entre sí en la base. Los folíolos oblicuamente ovados a lanceolados o falcados, divaricados, de 4 a 15 mm de largo por 3 a 8 mm de ancho, enteros, coriáceos, resinosos, de olor penetrante, verde o verde amarillentos.

Los arbustos de gobernadora no tienen tronco común, si no que están formados de ramas delgadas que crecen verticalmente o de manera oblicua desde la corona de la raíz. La copa de los arbustos tiene un volumen promedio de 0.124 m³ por planta, sus flores son solitarias con un tamaño de 2.5 cm de diámetro, sépalos elípticos de 6 mm de largo por 4 mm de ancho, pubescentes, caedizos; pétalos de color amarillo fuerte, oblongos a lanceolados, de 1.0 cm de largo por 3 a 5 mm de ancho y caedizos.

El fruto es subgloboso a obovoide, de 7 mm de largo, coriáceo, con pelos blancos, sedosos, que se vuelven café rojizos con el tiempo, tienen 5 mesocarpios y con una semilla cada uno. Las semillas son de color café a negras, algo curvadas, de 2 a 4 mm de largo, con contornos triangulares, en forma de “boomerang”, embrión con dos cotiledones paralelos al plano longitudinal.

La descripción de *L. tridentata* que hizo Brinker (1994), señala que el sistema radical es relativamente superficial; sin embargo, llega a crecer hasta 170 cm de profundidad y puede ser muy extenso, creciendo lateralmente hasta cuatro metros y llegando a ocupar casi el total del espacio que hay entre un arbusto y otro. El tamaño de la planta varía en el rango de 0.5 a 4 metros de altura dependiendo de la cantidad de lluvia que se presente en la región y varía su promedio de altura, de acuerdo a su número cromosómico: las plantas diploides alcanzan hasta 86 cm, las tetraploides 138 cm y las hexaploides 112 cm o más.

Las condiciones climáticas modifican el número cromosómico de las plantas de *Larrea*. Yang (1970), describe que las plantas de gobernadora del desierto Chihuahuense son diploides ($2n=26$), las plantas del desierto Sonorense son tetraploides ($2n=52$) y las del desierto Mojave son hexaploides ($2n=78$).

Distribución y adaptación geográfica de *Larrea*

La gobernadora (*Larrea tridentata*) también llamada hediondilla o creosote bush perteneciente a la familia *Zygophyllaceae* es una de las plantas más abundantes en las zonas semiáridas de los Desiertos Chihuahuense y Sonorense del norte de México; zonas áridas de California y el Suroeste de Estados Unidos (Rundel et al, 1994), se estima que el 25% (500,000 Km²) de la Republica Mexicana esta cubierta con este arbusto (Belmares et al, 1979). La abundancia de esta planta leñosa del semidesierto es tal que en ciertas localidades se ha encontrado una densidad de población de 1700 arbustos o más por hectárea (Downum et al, 1988). Esta característica combinada con su habito perenne de crecimiento hace de *Larrea* uno de los recursos vegetales más importantes y predecibles en muchos ambientes de las zonas áridas.

Esta especie del semidesierto se distribuye abundantemente en el norte de México y suroeste de Estados Unidos. Brinker (1994), señala que desde el oeste de Texas hasta California ocupa cerca de 35 millones de acres. Por otro lado, Belmares et al. (1979), menciona que en las zonas desérticas de nuestro país la gobernadora crece en aproximadamente 500,000 km².

Larrea crece y se adapta en los sitios más secos de México, en terrenos planos, laderas, lomeríos bajos (originados de materiales geológicos del cretácico superior e inferior y en planicies aluviales. Se desarrolla en lugares con temperaturas de 14 a 28 °C y presencia de 8 meses de sequía, en climas áridos (BS) y muy áridos (BW) y en precipitaciones de 150 a 500 mm anuales. Los suelos en los que se desarrolla son de profundidad variable, textura franco arenosa, estructura granular, drenaje interno medio de consistencia friable,

de color café grisáceo, compacto arcilloso, calcáreo, blanco arenoso, aluvial con pH de 6.8 a 7.6.

Importancia económica de *R. solani*

Rhizoctonia solani fue descubierto y descrito por Kün en Alemania en 1858. En 1901 Dugar Y Stewart lo reportaron por primera vez en América atacando papa (Rich, 1983). El género *R. solani* es un agente causal que por si sólo o asociado con otros patógenos provocan la muerte de plántulas o plantas adultas debido a la pudrición que causan en las raíces (Sandoval, 1993).

En el caso del cultivo de papa el hongo causante de la costa negra es *R. solani*, el cual se presenta en casi todos los suelos porque tiene una amplia gama de hospedantes y puede considerarse uno de los fitopatógenos de mayor importancia. Algunas investigaciones reportan reducciones en la protección, con pérdidas del 45-68% en el periodo de infección de la germinación. Otro autores mencionan que las pérdidas que causa esta enfermedad en rendimiento en papa va de 10 a 15 % (Parmeter, 1970).

Clasificación y etiología de *Rhizoctonia solani*.

Clasificación taxonómica

Con base en el trabajo de Alexopoulos y Mims (1979), ellos clasifican a *Rhizoctonia solani* Kühn de la siguiente forma:

Reino	Mycetae
División	Amastigomycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Deuteromycetes
Subclase	Hyphomycetidae
Orden	Agonomycetales

	Mycelia (Sterilia)
Género	<i>Rhizoctonia</i>
Especie	<i>solani</i>

Etiología

En el libro de Agrios (1988), se menciona que *R. solani* vive principalmente en forma de micelio, el cual es incoloro en su etapa joven pero se torna amarillo o de color café claro conforme madura. La hifa mide de 6 a 12 micras de diámetro, consta de largas células y produce ramificaciones que crecen casi en ángulos rectos con respecto a la hifa principal, se estrechan ligeramente a nivel de la bifurcación y poseen un septo cerca de ella. Produce esclerocios los que al principio son de color blanco, que luego se oscurecen hasta llegar a distintos tonos; son irregulares, grandes midiendo de 1 a 8 mm siendo visibles a simple vista, variables en forma según las condiciones en que se producen, de consistencia dura y en cortes microscópicos muestran una constitución de hifas entrelazadas de diámetro variable.

Los estudios realizados por Ogoshi (1987), mencionan que *R. solani* es considerado un hongo imperfecto, el que se caracteriza por originar una ramificación cercana del septo distal de las células en las hifas jóvenes.

Walker (1965), indica que la fase basidial de este hongo pasa fácilmente inadvertida durante la vida saprofítica del patógeno. El estudio pionero de Patovillard en 1891 fue el primero en describir la fase basidial con el nombre de *Hypochnus filamentosus*; Prillieux y Delacroix (1891), la clasificaron como *filamentosa* Rogers, (1943); *Ceratobasidium olive* (1957), y finalmente fue clasificada como *Thanatephorus cucumeris* (Frank) por Donk (1956).

Se ha demostrado por Anguiz y Martín (1989), que *Thanatephorus cucumeris* (Frank) es el estado sexual de *R. solani*. Los basidios son subcilíndricos o claviformes con cuatro esterigmas que salen a manera de

verrugas adoptan más tarde la forma de un cuerno, las basidiosporas son elipsoides u oblongas, paredes delgadas aplanadas en el lado interno, un poco más ancha debajo de la posición media (Gilman, 1963).

El hongo *R. solani* se encuentra dividido en grupos basados en la anastomosis hifal. La anastomosis es la fusión de hifas con intercambio de núcleos y recombinación genética (Anderson, 1982).

Sintomatología de *R. solani* en las plantas

Romero, (1993), menciona que en condiciones favorables ataca plántulas antes de que emerjan o poco después de la emergencia. Las lesiones son hundidas de tamaño variable, con coloraciones de café canela a café rojizo. Las áreas oscuras y necróticas son más evidentes cuando el tejido atacado es grande, si las condiciones son favorables las lesiones se extienden y adquieren un aspecto hundido y puede llegar a cubrir toda la base del tallo y destruir raíces debilitando la planta o causándole un acentuado amarillamiento. En plantas de más de 15 cm de altura ocasiona marchitez, en las raíces se observan áreas necróticas que varían en tamaño de acuerdo al desarrollo de la enfermedad. En la parte aérea se manifiesta clorosis, marchitez y por ultimo la muerte de la planta. En el cuello provoca una pudrición no compacta, por lo que se desprende fácilmente la epidermis.

Control cultural de *R. solani*

Con base en los resultados de campo obtenidos por Crispín y Sifuentes (1970), ellos recomiendan utilizar medidas culturales que pueden reducir los daños causados por *R. solani* entre estos se pueden mencionar los siguientes:

- Efectuar rotación de cultivos (gramíneas, leguminosas, o bien hortalizas diferentes) con el fin de reducir la cantidad de inóculo en el suelo.
- Evitar el exceso y encharcamiento de agua, sembrando en terrenos bien drenados y nivelados.
- No dañar las raíces de las plantas al cultivarlas, pues las heridas son

puertas de entrada al organismo patogénico.

- Sembrar a la profundidad adecuada para proporcionar a la semilla condiciones favorables para su germinación.
- Quemar los residuos de plantas, procurando no sembrar inmediatamente después, en el caso de que dichos residuos se hayan enterrado.

Clasificación y etiología de *Fusarium oxysporum*

Clasificación taxonómica

Con base en el trabajo de Alexopoulos y Mims (1979), ellos clasifican a *Fusarium oxysporum* en la siguiente ubicación taxonómica:

Reino	Mycetae
División	Amastigomycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Deuteromycetes
Subclase	Hyphomycetidae
Orden	Moniliales
Familia	Moniliaceae
Género	<i>Fusarium</i>
Especie	<i>oxysporum</i>

Etiología

Holliday, (1980), menciona que el hongo presenta micelio tabicado, al principio es incoloro y posteriormente toma una coloración cremosa al envejecer, finalmente color ocre a través de la colonia. El hongo produce microconidios unicelulares, hialinos de forma ovoide a elipsoidal. Los macroconidios son relativamente escasos, fusiformes, hialinos, generalmente con 3-5 septas, puntiagudos, de pared delgada en el micelio más viejo

suelen formarse clamidosporas.

Las condiciones que favorecen la incidencia de la enfermedad son exceso de humedad en el suelo una temperatura alrededor de 18 °C. Este hongo ocasionalmente produce estructuras de resistencia llamados microesclerocios como piedrecillas negras las cuales quedan adheridos a la raíz dando el aspecto de que estuviera impregnado de lodo y estos se producen al inicio de las lluvias, este patógeno sobrevive también en residuos de cosecha y se disemina en la semilla (Mendoza y Pinto, 1983).

Este hongo sobrevive en residuos de cosecha y se disemina por movimiento del suelo Robert y Boothroyd (1978). Los esclerocios germinan produciendo micelio. Este crece en el suelo, en los tallos y brotes del cultivo. La penetración consiste en el crecimiento de cordones de micelio a lo largo de la superficie del brote, las ramas de las hifas atacadas penetran directamente por la punta del brote y crecen intercelularmente a extracelulares.

Síntomas de *F. oxysporum* en la planta

El marchitamiento causado por este hongo se caracteriza por el achaparramiento de las plantas, clorosis y en poco tiempo se marchitan y finalmente mueren, mostrando también una coloración café en el xilema.

Los primeros síntomas que causa este fitopatógeno en las plantas se manifiestan en un ligero aclaramiento de las nervaduras de los folíolos jóvenes más externos, después de lo cual ocurre la epinastía de las hojas senescentes ocasionada por el debilitamiento de los pecíolos. Es más frecuente que en las plantas adultas ocurra epinastía foliar y un previo aclaramiento de las nervaduras de sus hojas antes de que se produzca el achaparramiento; también se observa un amarillamiento de las hojas inferiores, formación ocasional

de raíces adventicias y marchitamiento de las hojas inferiores.

Es también común ver la formación ocasional de raíces adventicias, marchitamiento de los tallos y hojas jóvenes, defoliación, necrosis marginal de sus hojas persistentes y finalmente su muerte. Con frecuencia, estos síntomas aparecen sólo en uno de los costados del tallo y avanzan hasta la parte superior de la planta hasta que destruyen el follaje y ocasionalmente la muerte del tallo (Agrios, 1988).

Ayvar, (1988), al hacer un corte transversal del tallo infectado observó los haces vasculares de color oscuro formando un anillo. La pudrición del sistema radical de la planta antecede a todos los síntomas del follaje descritos, ya que la mayoría de éstos son una consecuencia de la infección de las raíces de las plantas por el hongo. La marchitez de las plantas es ocasionada probablemente por la obstrucción de los vasos xilemáticos, producida por el micelio, esporas, geles, gomas y tilosas; así como por la acción individual o combinada de toxinas, enzimas hidrolíticas y reguladores de crecimiento

Ciclo del hongo *F. oxysporum*

Investigaciones realizadas por (Agrios, 1988), han mostrado que el patógeno inverna en el suelo en forma de micelio y en cualquiera de sus formas de esporas, pero lo hace con mayor frecuencia en forma de clamidospora. Se propaga a cortas distancias a través del agua y el equipo agrícola contaminado, y a grandes distancias principalmente en los trasplantes infectados o en el suelo que va en ellos. Es frecuente que una vez que un área haya sido infectada por *Fusarium* se mantenga así por tiempo indefinido.

Cuando las plantas sanas se desarrollen en un suelo contaminado,

los tubos germinales de las esporas o el micelio penetran directamente en las puntas de las raíces o entran en estas últimas a través de heridas a nivel de la zona donde se forman las raíces laterales. El hongo se propaga intercelularmente a través de la corteza de la raíz y cuando llega a los vasos xilemáticos, entra en ellos a través de punteaduras. Se mantiene entonces exclusivamente en los vasos y viaja a través de ellos, principalmente en sentido ascendente hacia el tallo y la corona de la planta. Cuando se encuentra en los vasos dicho micelio se ramifica y produce microconidios que son desprendidos y llevados hacia la parte superior del vaso y el hongo produce más microconidios en el siguiente vaso. El micelio del hongo avanza también lateralmente en los vasos adyacentes, en los que penetra a través de punteaduras (Agrios 1988).

Control

Mendoza y Pinto (1985), recomiendan para la prevención de este hongo tratar la semilla con agua caliente por 20 minutos a 50 °C, con lo que según ellos se elimina al patógeno y recomiendan, además, fertilizar adecuadamente y aplicar riegos frecuentes para tener una buena humedad en el suelo, sin llegar al exceso; usar semilla sana o tratada, rotación de cultivos, esterilización de suelos y tratar la plántula antes del transplante con un fungicida sistémico (por inmersión de la planta), tal como el benomil, o tiabendazol. También recomiendan no fertilizar con demasiado nitrógeno y sí con más potasio; aplicar al suelo cal hidratada; rotación de cultivos por 3 a 4 años, y eliminar plantas que hayan sido enfermadas

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del área experimental

Este trabajo se realizó en los laboratorios de Estudios Ambientales del Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), localizado en Saltillo Coahuila, México, durante el periodo que comprendió del 15 de noviembre del año 2000 al 31 de mayo del 2001.

Sitios de colecta de *Larrea tridentata*

Se realizó una colecta de hojas y ramas pequeñas de *Larrea tridentata* de poblaciones naturales en diversos sitios del norte de México localizados a través de un gradiente latitudinal (24°, 25°, 26° y 27°) y altitudinal desde los 2020 msnm en el norte de Zacatecas hasta los 530 msnm en el norte de Coahuila, de una porción del Desierto Chihuahuense, y a través de un gradiente latitudinal en los paralelos 24°, 25°, 26° y 27° en la Baja California Sur, en una porción del Desierto Sonorense. Las muestras colectadas se secaron en una estufa con recirculación de aire durante cinco días a 65° C; Posteriormente se defoliaron y cribaron con una malla metálica con orificios de 0.5 cm²;

Extracción de la resina con equipo soxhlet

Con la finalidad de hacer la extracción de la resina para su cuantificación por sitio de muestreo se utilizo un equipo soxhlet de refuljo el cual consiste

de los siguientes componentes: Condensador cartucho de extracción de celulosa, tubo para elevación de los vapores, extractor de vidrio o corneta, sifón, matraz bola de fondo redondo y una manta de calentamiento con lana de vidrio, con base en los procedimientos descrito por la ASTM (1993). Todos estos componentes debidamente ensamblados dentro de una campana de extracción de vapores constituyeron el equipo soxhlet. Las hojas molidas de *Larrea* se colocaron en los cartuchos de extracción o contenedores de celulosa de 8 cm de largo por 3 cm de diámetro a tres cuartas partes de su capacidad, los que se taparon con algodón para colocarlos en la cámara de sifón, estos fueron embonados a matraces de fondo plano los cuales contenían el solvente (etanol o cloroformo), y después se conectaron en serie. Los matraces se colocaron sobre mantas de calentamiento a una temperatura de 50°C y en la parte superior de los sifones se conectaron tubos refrigerantes a través de los cuales se hacia pasar agua helada mediante hielo para evitar un sobrecalentamiento del sistema de extracción; teniendo ya colocados todos los materiales se hizo funcionar el equipo soxhlet durante varias horas hasta que el líquido resultante ya era incoloro, lo cual indicaba que había concluido la extracción de resina de la muestra seleccionada.

Al final de este período se apagó el sistema quitando los matraces en los cuales estaba la resina más el etanol o cloroformo, enseguida se procedió a separar el solvente de la resina a través de un rotavapor; al término de este período la resina se vació en charolas de cristal, las cuales posteriormente se colocaron en una estufa para evaporar los residuos del solvente, después se retiraron las charolas y se taparon con papel aluminio, quedando de esta manera la resina sólida de gobernadora.

Extracción de la resina por inmersión en los solventes

Para obtener resina en cantidad suficiente para los bioensayos, las hojas secas y cribadas de gobernadora (*Larrea tridentata*) se utilizó la técnica de

inmersión en dos tipos de solventes: etanol y cloroformo. Con cada uno de los dos solventes mencionados la técnica consistió en sumergir el follaje en un recipiente de dicho solvente durante 24 horas, al término de este tiempo el licor resultante se separó de las impurezas del follaje a través de un filtro de vacío conectado a un embudo Büchner de cerámica de 30 cm de diámetro.

Una vez obtenido el licor de cada extracto se determinó el porcentaje de sólidos en la balanza de determinación de humedad para posteriormente llevarse a un sistema de destilación simple con matraz bola de 3 litros y refrigerante de vidrio para concentrar el extracto y obtener la resina con una consistencia muy espesa y alcalinizar al 3 %.

La resina espesa se secó a la estufa durante 7 a 8 días a 65°C para obtener así los extractos etanólicos y clorofórmicos ya sólidos, para posteriormente molerlos en un mortero hasta obtener un polvo cuya característica es ser hidrosoluble (Villarreal et al.,1998).

Obtención de los aislados de *R.solani* y *F.oxysporum*

Las cepas de *R. solani* y *F. oxysporum* que se utilizaron en la ejecución de los bioensayos aquí reportados fueron proporcionadas por el Centro Internacional de Servicios Fitosanitarios, S. A. de C. V. (CISEF) localizado en Saltillo, Coahuila.

Realización de los bioensayos *in vitro*

Una vez obtenida la resina en polvo de cada uno de los extractos, se estudiaron en los bioensayos el efecto de las siguientes concentraciones 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 ppm en los hongos *Rhizoctonia solani* y *Fusarium*

oxysporum. Además se evaluaron un testigo absoluto (0 ppm) y el testigo químico prozicar (Carbendazim). Para la realización del bioensayo se utilizó la técnica del medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). Cuando este se encontraba en estado líquido con una temperatura aproximada a los 40°C; la solución se agitó constantemente hasta que la resina se disolvió por completo, después se vaciaron a las cajas petri debidamente identificadas, al solidificar el medio de cultivo se realizó la siembra mediante la transferencia de una pequeña porción de PDA con micelio de los hongos, una vez realizada la siembra se sellaron las cajas petri con cinta plástica adherente para evitar la contaminación, todo el material se mantuvo dentro de una cámara bioclimática a una temperatura de 25° C.

Diseño experimental y variables de estudio

Para la realización de este trabajo se utilizó un diseño experimental factorial completamente al azar con tres variables de estudio: A) Solventes, B) 8 Paralelos de las dos zonas desérticas y C) Dosis; en el cual se distribuyeron los tratamientos completamente al azar dentro de la incubadora. El efecto de los tratamientos se determinó mediante la medición con un vernier del crecimiento micelial del hongo en cuestión dentro de las cajas petri a las 168 horas después de haberse sembrado en el medio de cultivo PDA. Los datos se analizaron estadísticamente, se hicieron comparaciones de medias y mediante la diferencia mínima significativa se hizo la separación entre los valores para su interpretación estadística.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concentración de resina en el follaje

En relación con la resina encontrada en las hojas y ramas pequeñas de *L. tridentata* colectadas en un transecto del Desierto Chihuahuense (desde el paralelo 24° hasta el paralelo 27°), en el Cuadro 1 se aprecian los resultados de las concentraciones de resina obtenidas mediante el proceso de extracción con el equipo soxhlet utilizando los solventes etanol y cloroformo de los sitios muestreados y que se encontraban localizados desde el sur de la ciudad de Concepción del Oro, Zacatecas (paralelo 24°), hasta el norte de Nueva Rosita; Coahuila, en el paralelo 27°. En este Cuadro se observa que el valor de mayor porcentaje de concentración de resina que se obtuvo fue 33.27% extraído con etanol y correspondió al paralelo 26°; por otro lado, el menor porcentaje de concentración de resina que se extrajo fue de 18.22% al usar el solvente cloroformo y correspondió al sitio de muestreo del paralelo 27°.

En términos generales la mayor concentración promedio de resina obtenida en los cuatro sitios muestreados del Desierto Chihuahuense fue con el solvente etanol (29.75%) seguido por el solvente cloroformo con 19.23%, esto posiblemente se debe a que el solvente etanol es más polar que el cloroformo y eso le permite una mayor extracción, debido a la naturaleza química polar de los componentes de la resina de *Larrea*.

Cuadro 1. Comparación de valores promedio de la concentración de resina en el follaje de *L tridentata* extraída con los solventes etanol y cloroformo de las muestras colectadas en el Desierto Chihuahuense.

Concentración de Resina (%) en los Sitios de Muestreo (paralelos)					
Solventes	24°	25°	26°	27°	\bar{X}
Etanol	25.18	32.95	33.27	27.65	29.75
Cloroformo	18.42	20.47	19.86	18.22	19.23
\bar{X}	21.80	26.71	26.56	22.93	24.49

Los datos aquí presentados corresponden a cuatro repeticiones extraídos con el equipo soxhlet.

En el Cuadro 2 se presentan los resultados que se obtuvieron del porcentaje de extracción de las hojas de *Larrea tridentata* con los solventes etanol y cloroformo de los sitios muestreados en el Desierto Sonorense correspondiente a una porción de Baja California Sur.

La mayor concentración de resina que se logró extraer en los cuatro sitios fue con el solvente etanol (30.40%) correspondiendo al paralelo 24°; mientras que el menor porcentaje de extracción (15.20%), se obtuvo con cloroformo en la muestra del paralelo 25°. En general, la mayor concentración promedio de resina (25.45%), en los cuatro sitios muestreados del Desierto Sonorense se extrajo con etanol seguido de cloroformo (16.14%).

Cuadro 2. Comparación de valores promedio de la concentración de resina en el follaje de *L tridentata* extraída con los solventes etanol y cloroformo de las muestras colectadas en el Desierto Sonorense.

Concentración de Resina (%) en los Sitios de Muestreo (paralelos)

Solventes	24°	25°	26°	27°	\bar{X}
Etanol	30.40	28.00	22.40	21.40	25.45
Cloroformo	16.30	15.20	16.75	16.33	16.14
\bar{X}	23.35	21.60	19.57	18.86	20.79

Los datos aquí presentados corresponden a cuatro repeticiones extraídas con equipo soxhlet.

Si comparamos los porcentajes de las concentraciones de resina extraída de *L. tridentata* de los dos desiertos y que se presentan en los Cuadros 1 y 2, se observa claramente que donde se tuvo la mayor concentración de resina fue 24.50%, correspondiendo este valor al Desierto Chihuahuense en comparación con 20.79% del Desierto Sonorense.

Efecto de las dosis de los extractos etanólicos y clorofórmicos sobre *R. solani*.

El efecto de las seis dosis de resina de gobernadora colectada de los desiertos Chihuahuense y Sonorense se presenta en la Figura 1. La información consignada nos muestra que el hongo *R. solani* fue significativamente inhibido en su desarrollo micelial con las dosis más altas estudiadas; ya que con 8000 ppm se tuvo un 100% de inhibición con los extractos etanólicos tanto del D. Sonorense como del D. Chihuahuense.

En cuanto a los extractos provenientes del D. Sonorense estos mostraron un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial del hongo, esto se pudo observar desde la dosis más baja empleada (500 ppm), situación que prevaleció a todas las dosis evaluadas, solo a la dosis mas alta (8000 ppm), se observó que los extractos de ambos desiertos inhibieron al 100% el desarrollo *in vitro* de *R. solani*. En la misma Figura 1 se puede apreciar que consistentemente los extractos etanólicos hidrosolubles de *Larrea* provenientes del D. Sonorense fueron más eficaces para inhibir la actividad del hongo.

A las dosis de 500, 1000, 2000 y 4000 ppm los extractos mostraron una acción fungistática ya que no lograron inhibir por completo el crecimiento micelial del hongo estudiado, lo que solamente se pudo detectar con la máxima dosis estudiada en los bioensayos

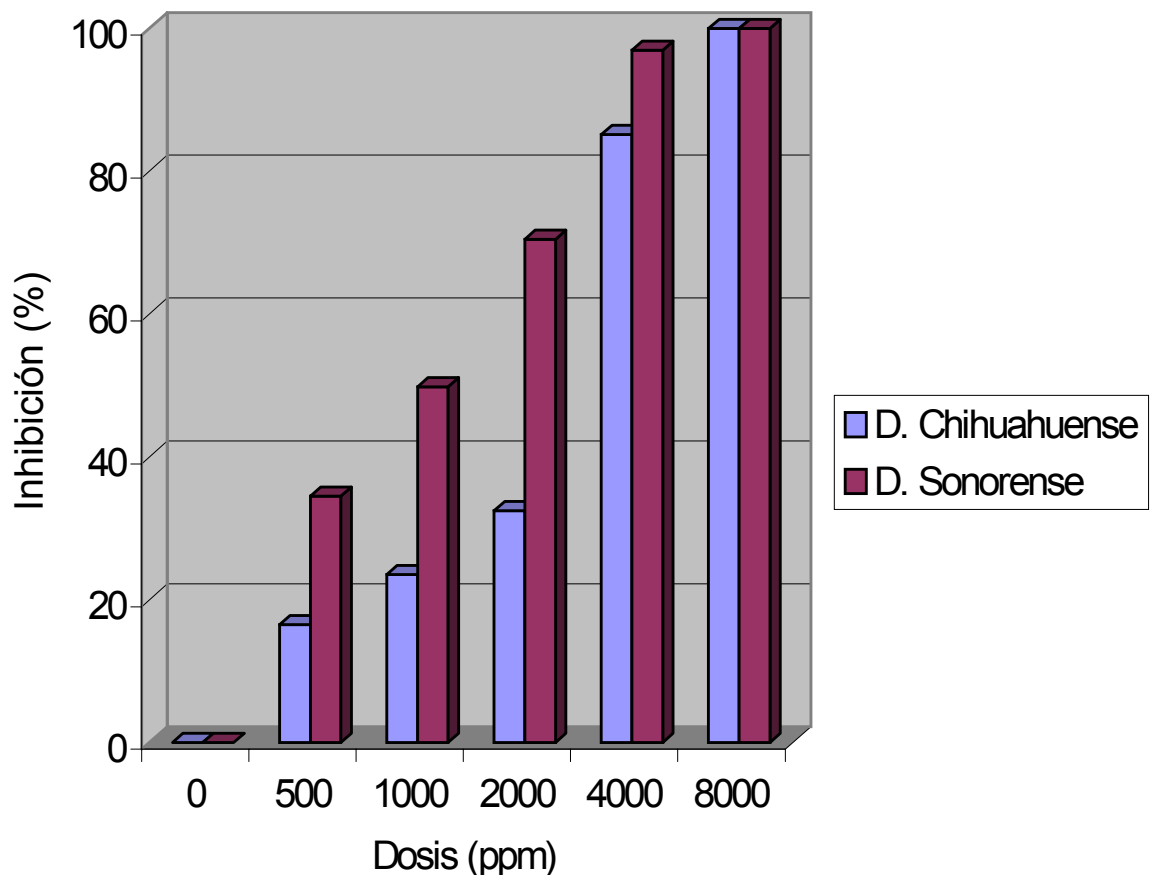


Figura 1. Inhibición del desarrollo micelial *in vitro* de *Rhizoctonia solani* con dosis de extractos hidrosolubles etanólicos de resina de *L. tridentata* obtenidos de dos regiones desérticas del norte de México.

La información presentada en el Cuadro 3 nos sirve para comparar el efecto de las dosis de extractos de resina etanólicos de los diversos sitios de muestreo de los desiertos Chihuahuense y Sonorense; aquí claramente se

muestra que a partir de la dosis de 4,000 ppm no hubo diferencia estadística significativa entre los paralelos o sitios de muestreo, ya que el extracto logró inhibir por completo el crecimiento micelial *in vitro* del hongo con las dosis de 8,000 ppm. Solo con la dosis de 4000 ppm se detectó diferencia estadística significativa entre los extractos provenientes de los cuatro paralelos muestreados; los paralelos 25°, 26° y 27° fueron estadísticamente iguales entre sí pero superiores en su efecto inhibitorio que el paralelo 24°, siendo esta última localidad la de menor efecto inhibitorio en todas las concentraciones; el paralelo 27° fue estadísticamente superior en su efecto inhibitorio a las dosis de 500, 1000 y 2000 ppm.

Cuadro 3. Comparación de medias del porcentaje de inhibición *in vitro* de *Rhizoctonia solani* con dosis de resina etanólica de *Larrea tridentata* obtenida de cuatro sitios de muestreo en los desiertos Chihuahuense y Sonorense.

LATITUD	DOSIS APLICADA (ppm)				
	500	1000	2000	4000	8000
24°	10.92 c	16.51 c	35.32 c	74.75 b	100 a
25°	22.67 b	40.53 b	58.92 b	97.14 a	100 a
26°	16.84 bc	31.27 b	36.72 c	95.44 a	100 a
27°	52.49 a	58.36 a	75.08 a	96.84 a	100 a

Nivel de significancia = 0.01%; DMS = 10.61

* Los valores aquí consignados representan el valor promedio de las muestras obtenidas en cada sitio de muestreo o latitud de las dos regiones desérticas.

Haciendo una comparación entre el efecto de las dosis de los extractos de resina de *L. tridentata* colectada en los desiertos Chihuahuense y Sonorense, se detectó que sí hubo diferencia en la inhibición del crecimiento micelial del hongo desde la dosis más baja empleada (500 ppm), hasta la concentración de 4000 ppm, resultando ser superior el extracto proveniente del D. Sonorense, esto se puede apreciar en la Figura 2; también se puede observar claramente que el hongo *R. solani* fue totalmente inhibido en su

desarrollo micelial *in vitro* con las dosis más altas estudiadas (8000 ppm); mientras que con el extracto del D. Chihuahuense a la dosis de 4000 ppm se redujo el crecimiento del hongo hasta 50.80 %; a este misma concentración la inhibición del hongo con el extracto del D. Sonorense fue 66.51%.

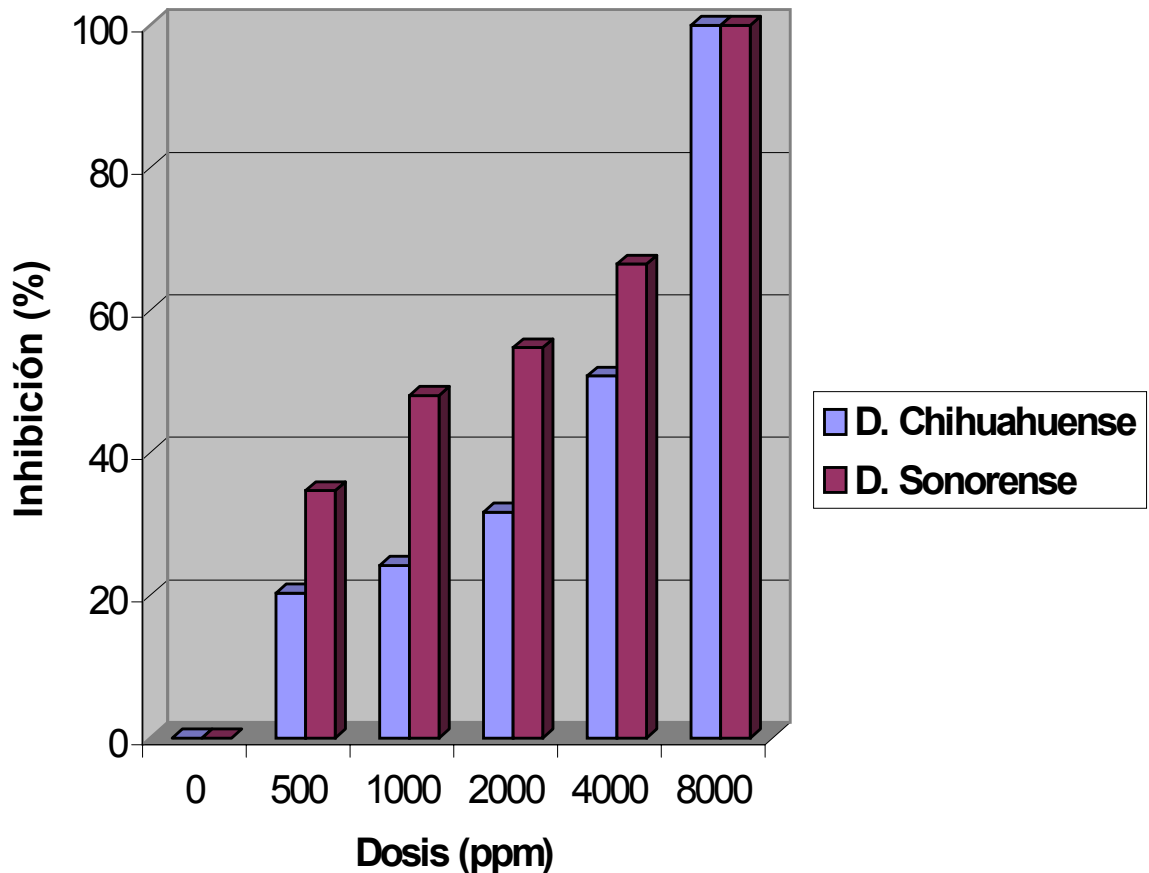


Figura 2. Inhibición *in vitro* del desarrollo micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn con dosis de extractos hidrosolubles clorofórmicos de resina de *L. tridentata* obtenidos de dos regiones desérticas del norte de México.

El efecto inhibitorio por localidad o sitio de colecta (paralelos) y dosis del extracto clorofórmico de gobernadora de los dos desiertos muestreados sobre *R. solani* se consigna en el Cuadro 4; En este cuadro se aprecia que a 500, 1,000, 2,000 y 4,000 ppm, se tuvieron diferencias estadísticas altamente significativas en cuanto a su acción fungicida, además claramente se observa que el valor promedio de inhibición de los extractos del paralelo 26° fueron

menos eficientes para reducir el crecimiento del hongo *in vitro*. De manera general este cuadro nos deja ver que a partir de la dosis de 8,000 ppm se tuvo un claro efecto fungicida de todos los sitios de muestreo, ya que el porcentaje de inhibición de *R. solani* fué del 100%

Cuadro 4. Comparación de medias del porcentaje de inhibición *in vitro* de *Rhizoctonia solani* Kühn con dosis de resina clorofórmica de *Larrea tridentata* obtenida de cuatro sitios de muestreo en los desiertos Chihuahuense y Sonorense.

LATITUD	DOSIS APLICADA (ppm)				
	500	1000	2000	4000	8000
24°	31.15 a	45.92 a	50.80 a	67.76 a	100 a
25°	31.72 a	35.41 ab	42.70 a	62.28 a	100 a
26°	18.21 b	26.33 b	32.08 b	43.69 b	100 a
27°	28.95 a	36.9 ab	47.40 a	60.89 a	100 a

Nivel de significancia = 0.01%; DMS = 10.61

Los valores aquí consignados representan el valor promedio de las muestras obtenidas en cada sitio de muestreo o latitud de las dos regiones desérticas.

Efecto de las dosis de los extractos etanólicos y clorofórmicos sobre *F. oxysporum*.

El efecto inhibitorio del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* con el extracto etanólico de *Larrea* se presentan en la Figura 4, la información nos muestra que en todas las dosis se tuvo una diferencia estadística significativa entre el efecto de los extractos de los desiertos Chihuahuense y Sonorense; ya que a dosis el extracto de resina del D. Sonorense superó en su efecto fungicida a la resina del D. Chihuahuense.

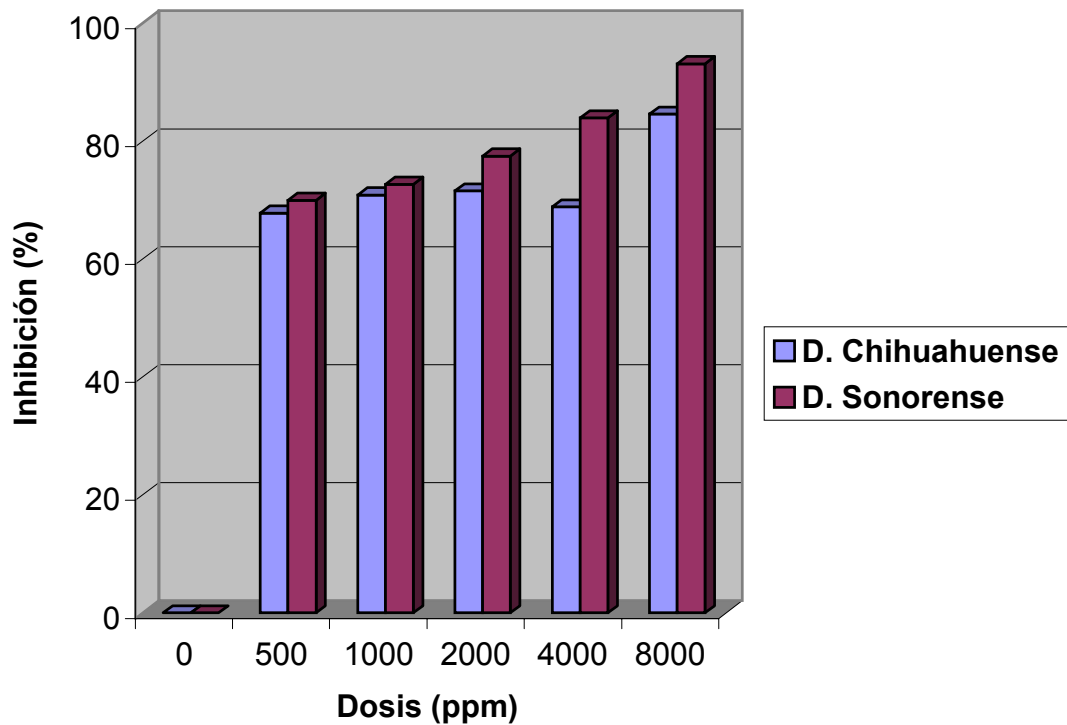


Figura 3. Inhibición *in vitro* del desarrollo micelial de *Fusarium oxysporum* con dosis de extractos hidrosolubles etanólicos de resina de *L. tridentata* obtenidos de dos regiones desérticas del norte de México.

El efecto promedio de los paralelos y dosis del extracto clorofórmico de gobernadora del desierto muestreados sobre *F. oxysporum* se consigna en el Cuadro 5. En este cuadro se aprecia que en todas las dosis aplicadas se tuvieron diferencias estadísticas significativas en cuanto a su acción antifúngica, siendo más eficientes el paralelo 26° a la máxima concentración aplicada.

Cuadro 5. Comparación de medias del porcentaje de inhibición *in vitro* de *Fusarium oxysporum* con dosis de resina etanólica de *Larrea tridentata* obtenidas obtenida de cuatro sitios de muestreo en los desiertos Chihuahuense y Sonorense.

LATITUD	DOSIS APLICADA (ppm)				
	500	1000	2000	4000	8000
24°	65.14 b	69.76 a	69.88 b	69.52 b	83.89 c
25°	64.85 b	72.14 a	76.63 a	82.47 a	85.56 bc
26°	71.84 a	71.72 a	74.88 a	72.85 b	95.92 a
27°	73.81 a	73.61 a	76.81 a	80.89 a	90.17 b

Nivel de significancia = 0.01%; DMS = 4.8752

* Los valores aquí consignados representan el valor promedio de las muestras obtenidas en cada sitio de muestreo o latitud de las dos regiones desérticas.

El efecto sobre *F. oxysporum* de los extractos clorofórmicos de *Larrea* obtenidos de los dos desiertos se presenta en la Figura 4; aquí se observa que los extractos provenientes de los desiertos Chihuahuense y Sonorense no lograron inhibir el crecimiento micelial del hongo aún a la dosis más alta evaluada (8,000 ppm); sin embargo, los extractos sí tuvieron un claro efecto fungistático, porque aún con la dosis más baja (500 ppm), se logró inhibir el crecimiento del hongo en más del 60 %.

En relación con las dosis del extracto clorofórmico estudiadas en los bioensayos se detectaron diferencias estadísticas significativas en todas las concentraciones; observándose que en este caso los extractos del D. Sonorense tuvieron un efecto más inhibitorio que los provenientes del D. Chihuahuense.

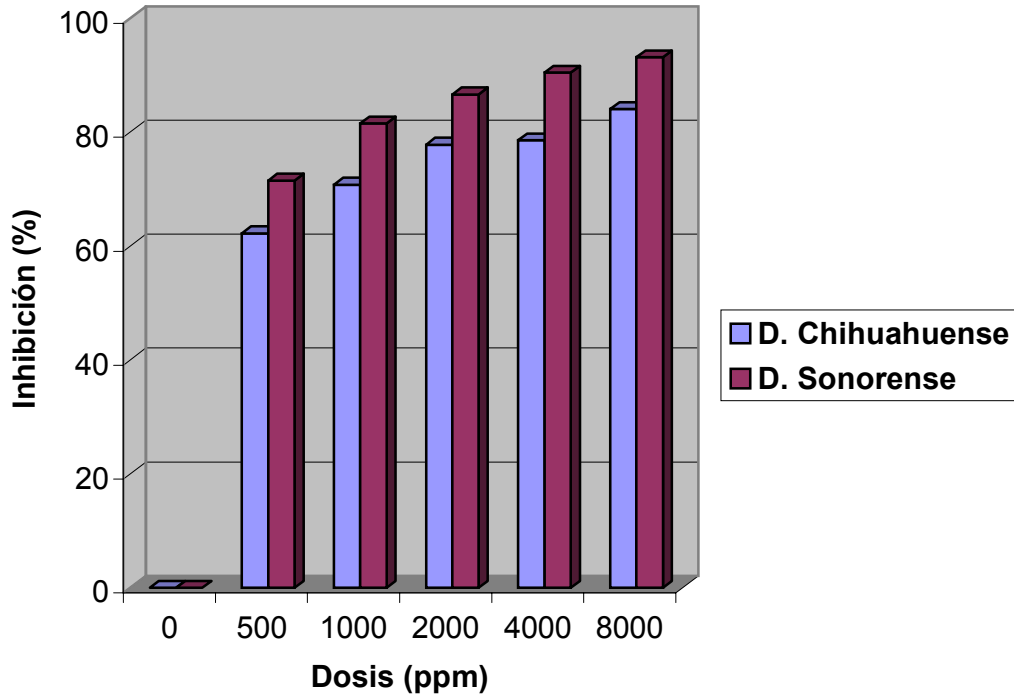


Figura 4. Inhibición *in vitro* del desarrollo micelial de *Fusarium oxysporum* con dosis de extractos hidrosolubles clorofórmicos de resina de *L. tridentata* obtenidos de dos regiones desérticas del norte de México.

El efecto promedio de los paralelos y dosis de los extractos clorofórmicos de gobernadora de los dos desiertos muestreados sobre *F. oxysporum* se consigna en el Cuadro 6. En este cuadro se aprecian las diferencias estadísticas altamente significativas en cuanto a su acción fungistática, siendo menos eficaces en los paralelos 25° y 26° a la concentración de 1000, 2000, 4000 y 8000 ppm; también se observa claramente que los extractos del paralelo 24° fue mas eficientes para inhibir el crecimiento micelial del hongo, ya que con 8,000 ppm se logró reducir su desarrollo *in vitro* el 93.96 %. Por el contrario, el paralelo 26° fue el que tuvo un menor efecto en la inhibición en todas las dosis aplicadas.

Cuadro.6. Comparación de medias del porcentaje de inhibición *in vitro* de *Fusarium oxysporum* con dosis de resina clorofórmica de *Larrea tridentata* obtenida de cuatro sitios de muestreo en los desiertos Chihuahuense y Sonorense.

LATITUD	DOSIS APLICADA (ppm)				
	500	1000	2000	4000	8000
24°	78.24 a	80.86 a	88.21 a	90.38 a	93.96 a
25°	68.89 b	74.7 b	77.82 b	80.47 b	86.87 bc
26°	52.60 c	69.78 c	77.67 b	79.69 b	83.26 c
27°	67.85 b	79.34 ab	85.26 a	87.64 a	90.56 ab

Nivel de significancia = 0.01%; DMS = 4.8752

Los valores aquí consignados representan el valor promedio de las muestras obtenidas en cada sitio de muestreo o latitud de las dos regiones desérticas.

En la Figura 5 se presenta la comparación general del efecto de los dos solventes utilizados para extraer la resina de gobernadora sobre el porcentaje promedio de inhibición de los dos hongos con las seis dosis evaluadas. Aquí se observa que el extracto que resultó estadísticamente más eficaz para controlar el crecimiento micelial de *R. solani* fue el extracto etanólico, con una media general de 60.94%, seguido del clorofórmico con 53.10%, por lo que respecta a *F. oxysporum* el extracto que inhibió más fue el clorofórmico con una media general de 79.69%, seguido del etanólico con 76.11%.

Estos resultados nos indican que a bajas concentraciones ambos extractos aplicados a *R. solani* se comportaron como fungistáticos, mientras que a 8000 ppm se comportaron como un producto fungicida. En el caso de *F. oxysporum* ni aún con la máxima dosis aplicada de los extractos de resina de gobernadora, se logró inhibir por completo el crecimiento micelial de este hongo, debido esto probablemente a características fisiológicas inherentes a este patógeno que lo hacen más tolerante que *R. solani*, al menos a las dosis estudiada en este trabajo.

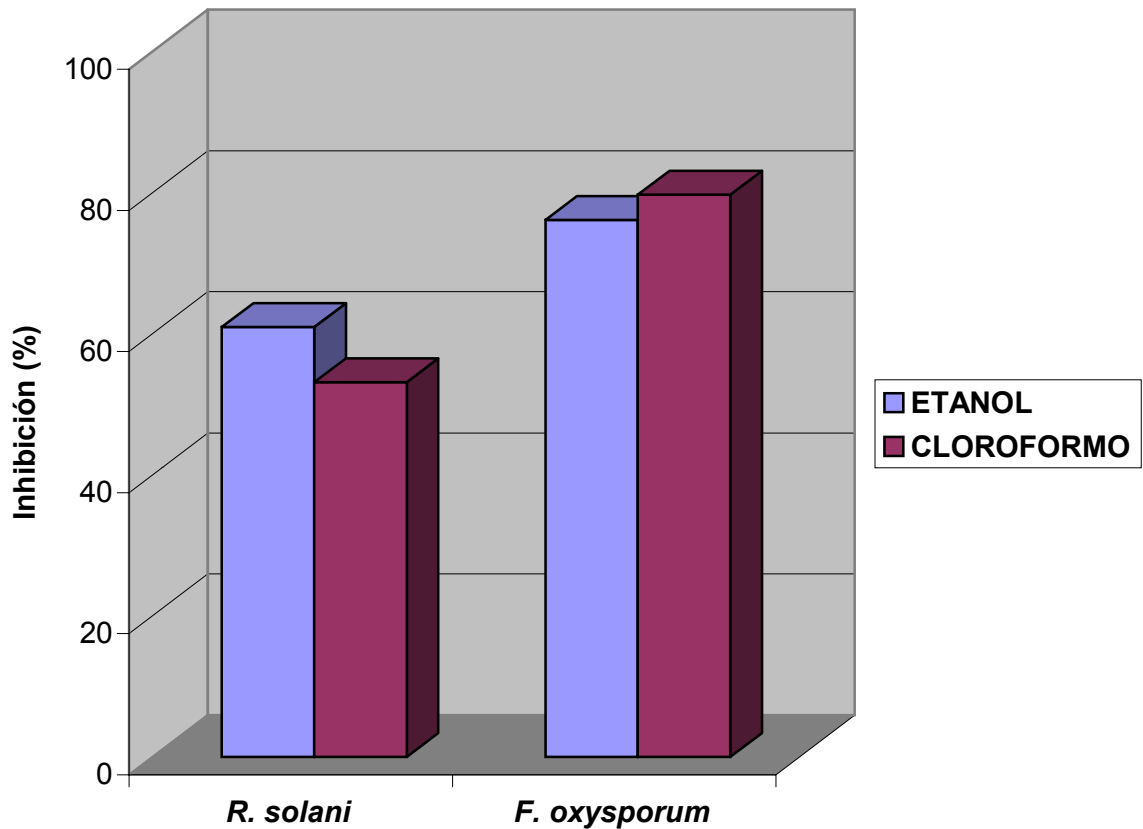


Figura 5. Comparación general de medias del porcentaje de inhibición *in vitro* de *R. solani* y *F. oxysporum* evaluado con seis dosis de resina hidrosoluble de *L. tridentata* proveniente de dos regiones desérticas y extraída con dos solventes.

La comparación del posible efecto latitudinal o geográfico del sitio de colecta de las muestras de follaje de gobernadora en la inhibición del desarrollo micelial *in vitro* del hongo fitopatógeno *R. solani* se presenta en el Cuadro 7.

Es claro que los extractos etanólicos y clorofórmicos de gobernadora colectada en el paralelo 27° tuvo un mayor efecto inhibitorio que los extractos obtenidos de los otros tres sitios de colecta del Desierto Chihuahuense. También en este cuadro se observa que los paralelos 24° y 26° fueron

iguales entre sí, siendo estos dos paralelos los de menor efecto inhibitorio, pero fueron estadísticamente diferentes en su desarrollo micelial que los extractos provenientes del paralelo 25° del D. Chihuahuense.

La muestra de *Larrea* colectada en el paralelo 27° tuvo una mayor inhibición que los otros sitios del extracto provenientes del D. Sonorense, los paralelos 25° y 26° resultaron estadísticamente iguales entre sí, siendo superiores en su efecto inhibitorio que el paralelo 24°, el cual fue significativamente menos eficaz que los demás.

En relación con el efecto inhibitorio sobre *R. solani* de los extractos hidrosolubles de gobernadora de los dos desiertos muestreados, el Cuadro 7 nos muestra que en general, independientemente del solvente usado para obtener la resina, los extractos provenientes del D. Sonorense tuvieron un mayor efecto inhibitorio (68.12%) sobre este hongo en comparación con los extractos del D. Chihuahuense, que en promedio general redujeron el crecimiento micelial en 48.46%.

Cuadro 7. Comparación general de medias del porcentaje de inhibición *in vitro* de *Rhizoctonia solani* con extractos etanólico y clorofórmico de *L. tridentata* provenientes de cuatro sitios de muestreo de dos zonas desérticas del norte de México.

DESIERTOS/PARALELOS	INHIBICIÓN (%)
Chihuahuense	
24°	46.56 e
25°	48.87 de
26°	40.87 e
27°	57.57 cd
\bar{X}	48.46
Sonorense	
24°	60.05 bc
25°	69.40 ab
26°	69.23 ab
27°	73.80 a
\bar{X}	68.12

Nivel de significancia = 0.01; DMS =10.6153

Los valores del % de inhibición presentados corresponden al valor promediado de los dos solventes utilizados para la extracción de la resina de la gobernadora.

En el cuadro 8 se aprecia el efecto latitudinal de los cuatro sitios de colecta de las dos zonas desérticas sobre la inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de *F. oxysporum*.

De los cuatro sitios muestreados del Desierto Chihuahuense, el que mostró una mayor inhibición del crecimiento micelial *in vitro* fue el de los extractos del paralelo 27°; por otro lado, el que mostró ser menos eficaz para inhibir fue el paralelo 26°, lo cual indica que posiblemente las condiciones ecológicas relacionadas con temperatura, precipitación pluvial, altitud y latitud, tienen un efecto en la fisiología y en las propiedades fitoquímicas de *Larrea* y consecuentemente en la producción de resina y de metabolitos secundarios como lignanos, flavonoides y catecoles que en ella se encuentran.

Los paralelos 25°, 26° y 27° del Desierto Sonorense resultaron estadísticamente iguales entre sí, en la inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de *Fusarium oxysporum*, siendo menos eficaces en su efecto inhibitorio que el paralelo 24° el cual fue significativamente superior en la inhibición que los demás. Estos datos ponen una vez en evidencia que los extractos del Desierto Sonorense tienen un mayor efecto inhibitorio en el crecimiento micelial *in vitro* de los dos hongos evaluados, independientemente de los solventes utilizados; como se muestra en el Cuadro 8, el D. Sonorense tuvo un mayor efecto inhibitorio (82.07%) sobre el hongo *F. oxysporum* que los extractos del D. Chihuahuense, que redujeron el crecimiento micelial en 73.73%.

Cuadro 8. Comparación general de medias del porcentaje de inhibición *in vitro* de *Fusarium oxysporum* con extractos etanólico y clorofórmico de *L. tridentata* provenientes de cuatro sitios de muestreo de dos zonas desérticas del norte de México.

DESIERTOS/PARALELOS	INHIBICIÓN (%)
Chihuahuense	
24°	74.13 cd
25°	73.31 de
26°	68.98 e
27°	78.53 bc
\bar{X}	73.73
Sonorense	
24°	83.82 a
25°	80.76 ab
26°	81.06 ab
27°	82.65 ab
\bar{X}	82.07

Nivel de significancia = 0.01; DMS = 4.8752

Los valores del % de inhibición presentados corresponden al valor promediado de los dos solventes utilizados para la extracción de la resina de la gobernadora.

En relación con el testigo químico empleado (carbendazim o prozicar) a la dosis de 375 ppm de ingrediente activo, los resultados generados mostraron una total inhibición del crecimiento micelial de los dos hongos estudiados bajo condiciones *in vitro*.

RESUMEN

Las enfermedades constituyen una de las principales limitantes en la actividad agrícola. Su control se hace básicamente con compuestos químicos inorgánicos, con el consecuente incremento en los costos de producción y contaminación. Durante los últimos 30 años se ha generado un creciente interés por el uso de productos orgánicos para ser empleados como microbicidas agrícolas. Esto puede eliminar varios efectos adversos causados por el uso de compuestos sintéticos debido a la rápida biodegradabilidad de los metabolitos orgánicos, ya que estos desaparecen con facilidad del medio ambiente aéreo y del suelo después de que son aplicados en el campo (Tanaka y Omura, 1993).

Larrea tridentata o gobernadora es una especie endémica de las zonas áridas del norte de México y suroeste de Estados Unidos; una de las principales características fitoquímicas de este arbusto es que produce una gran cantidad de resina que se acumula en sus hojas y tallos. Uno de sus principales componentes es el lignano ácido nordihidroguayarético (NDGA), al cual se le atribuyen efectos antiviricos, antibacterianos y fungicidas y muchas otras propiedades medicinales que han sido explotadas por indígenas de estas zonas semiáridas de Norteamérica.

En el estudio que aquí se reporta se utilizaron dos solventes (etanol y cloroformo) para extraer la resina de gobernadora de 4 sitios de muestreo (paralelos 24°, 25°, 26° y 27°) de los Desiertos Chihuahuense y Sonorense del norte de México, los cuales se trataron con una solución alcalina para que se obtuvieran extractos hidrosolubles de resina de ocho áreas geográficas de los estados de Zacatecas, Coahuila y Baja California Sur. Las muestras de

follaje de gobernadora del Desierto Chihuahuense se colectaron a través de un gradiente latitudinal y altitudinal de sur a norte que fue desde el paralelo 24° a 2080 msnm en el norte de Zacatecas, hasta el paralelo 27° a 530 msnm en el norte de Coahuila. Las muestras de Baja California Sur se colectaron a través de un gradiente latitudinal desde el paralelo 24° al paralelo 27°, estando los sitios de colecta a una altitud cercana al nivel del mar.

El contenido de resina que se extrajo de las hojas de gobernadora (*Larrea tridentata*) de cada uno de los sitios de muestreo se determinó con el equipo soxhlet y posteriormente los extractos hidrosolubles que se emplearon para los biosayos *in vitro* se obtuvieron con cada uno de los solventes por el método de inmersión, de acuerdo con la técnica desarrollada por el Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA).

Para la realización de los bioensayos se utilizó la técnica del medio envenenado, siendo el medio papa-dextrosa-agar (PDA); cuando éste se encontraba en estado líquido a una temperatura de 40°C, el polvo de resina de gobernadora se adicionó a un matraz erlenmeyer con sus respectivas concentraciones. La suspensión se agitó en los matraces constantemente hasta que la resina se disolvió por completo, y posteriormente fue vaciada a las cajas petri debidamente identificadas; al solidificar el medio de cultivo se procedió a sembrar el inóculo de los hongos *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* al centro de cada caja petri. Las cepas de estos fitopatógenos fue proporcionada por el Centro Internacional de Servicios Fitosanitarios, S. A. de C.V. (CISEF), localizado en Saltillo, Coahuila.

Las cajas petri permanecieron incubadas en una cámara bioclimática por un periodo de 168 horas a 25° C; posteriormente se realizó la medición del crecimiento micelial radial de los fitopatógenos con un vernier a partir del centro de cada caja petri hasta el extremo del crecimiento de la colonia sembrado.

El experimento se agrupó de acuerdo a un diseño factorial completamente al azar con tres variables de estudio. Al factor A se le asignaron los dos solventes (etanol y cloroformo) en el factor B se ubicaron los 4 sitios de muestreo de *Larrea* (paralelos 24°, 25°, 26° y 27°) de los Desiertos Chihuahuense y Sonorense; al factor C se le asignaron las seis dosis de resina de *Larrea* (0, 500, 1000, 2000, 4000, 8000) y un testigo químico. Para este diseño experimental se consideraron cuatro repeticiones por cada tratamiento.

El estudio realizado mostró que la mayor concentración de resina obtenida en el follaje de *Larrea tridentata* que se obtuvo de las muestras colectadas en el Desierto Sonorense tuvo un promedio general de 20.79%, comparándose con el Desierto Chihuahuense que mostró una media general de 24.49% de concentración de resina en las muestras obtenidas. Los datos representan la media general de resina contenida en hojas y ramas pequeñas de la gobernadora entre los sitios de muestreo o paralelos y entre los solventes.

Con base en los resultados obtenidos en el porcentaje de inhibición del desarrollo micelial de *Rhizoctonia solani* con los solventes utilizados para la extracción de la resina, se aprecia que los dos solventes inhibieron totalmente a dicho hongo; siendo los extractos con base en etanol los más eficaces en su acción fungicida, seguidos por el cloroformo.

Con base en los resultados obtenidos con *Fusarium oxysporum*, no se logró matar a dicho hongo ni aun con la máxima dosis aplicada: su comportamiento se mostró fungistático en la inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de los dos solventes utilizados.

El estudio realizado en las dos regiones semidesérticas del norte de México, los resultados de los biosayos indican que la mayor efectividad antifúngica de los extractos hidrosolubles de gobernadora contra los dos hongos, correspondió a los extractos muestreados del Desierto Sonorense, sin importar la latitud de donde se muestreó, ni de los solventes utilizados para la extracción de la resina.

Los resultados muestran que los efectos producidos en la inhibición *in vitro* de los hongos se observó una diferencia estadísticamente significativa debido a las condiciones ecológicas a los paralelos o sitios de colecta y esto posiblemente sea debido a los factores ambientales asociados con humedad relativa, profundidad del suelo, temperatura y altitud en los muestreos de las poblaciones de gobernadora.

El sitio de muestreo que mayormente inhibió el crecimiento micelial *in vitro* de *R. solani* en su actividad antifúngica de las dos zonas desérticas, fue el paralelo 27° del Desierto Chihuahuense y Sonorense. Y en el caso del hongo *F. oxysporum*, de los cuatro sitios que inhibieron mejor el crecimiento micelial *in vitro* del Desierto Chihuahuense fue el paralelo 27°, y del Desierto Sonorense fue el paralelo 24°.

CONCLUSIONES

- De las dos regiones desérticas muestreadas, del que se obtuvo una mayor concentración de resina del follaje de la gobernadora con los dos solventes utilizados fue el Desierto Chihuahuense.
- De los dos solventes utilizados, el que extrajo la mayor cantidad de resina fue el solvente etanol.
- De los dos extractos utilizados en los biosayos, se observó claramente y se puede deducir que el que tuvo mayor efecto en la inhibición del crecimiento micelial *in vitro* fue el extracto etanólico para el hongo *R. solani*; en el caso de *F. oxysporum* el extracto clorofórmico mostró una mayor inhibición del crecimiento micelial *in vitro*.
- De las dos zonas desérticas muestreadas, la que tuvo una mayor eficiencia en la inhibición del crecimiento micelial *in vitro* independientemente del solvente utilizado fue el desierto Sonorense.
- El extracto del paralelo 27° mostró una mayor inhibición del crecimiento micelial *in vitro* para el hongo *R. solani*, y para el caso del hongo *F. oxysporum*, el extracto del paralelo 24° obtuvo una mayor inhibición ambos sitios pertenecientes al Desierto Sonorense

LITERATURA CITADA

Agrios, N.G. 1988. Plant Pathology Third Edition Academic Press. London. p 838.

Alexopoulos, C.J. and Mims, C.W. 1979. Introductory Mycology. Third edit. J. Wiley and Sons. p 632.

American Standard Technology Methods 1993. Standard Test Method for Determination of soluble Residual Contamination in Materials and Components by Soxhlet Extraction. pp. 1320-1322.

Anderson, N.A. 1982. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. Ann. Rev. Phytopathol. 20:329-347

Anguiz, R. and Martín, C. 1989. Anastomosis groups pathogenicity and other characteristics of *Rhizoctonia solani* isolated from potatoes in Perú. Plant Disease 73: 199-201.

Ayvar, S.S. 1988. Respuesta de 10 variedades de tomate a la infección individual y combinada de *Meloidogyne incognita* y *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Tesis de Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillos, México 85 p.

Belmares H.; Barrera, A.; Ramos de V., L.F.; Castillo, E. And Motomochi, A. 1979. Research and development of *Larrea tridentata* as a source of raw material. pp 247-276. In: *Larrea*. Campos, L.E.; Mabry, T.J. y Fernández T.S. (Eds.). Centro de Investigación en Química Aplicada, Saltillo, México.

Brinker, F. 1994. *Larrea tridentata* (D.C.) Coville (Chaparral or Creosote Bush) British Journal of Phytotherapy, 3(1):10-31.

Crispín, M.A y Sifuentes, A.S. 1970. Enfermedades y plagas del frijol en México, INIA. SAG. Chapingo, México 22 p.

Downum, K. R. and Rodríguez, E. 1988. Nordihydroguaiaretic acid: Inter.-and intrapopulational variation in the Sonoran Desert creosote bush *Larrea tridentata* (Zygophyllaceae). Biochem Syst. Ecol. 16 (6): 551-555.

Fernández, S., Hurtado, L. M. and Hernández, F. 1979. Fungicidal components of creosote bush resin. Advances in Pesticide Science. Part 2. Síntesis of Pesticides. Natural Products with Biological Activity. pp. 351-355.

García, E. R., Cordobilla, P. M., Vega, S. M. y Tlalpal, B. B. 1997. Alelopatía y control de enfermedades de la raíz en jitomate con la adición al suelo de gobernadora (*Larrea tridentata*) . Colegio de Postgraduados. Avances en la Investigación 1997. pp. 72-74.

Garza, L.J.G.; López, C.G. y González, R.V. 1996. Evaluación *in vitro* de la resina de Gobernadora (*Larrea tridentata*) contra *Rhizoctonia solani*; patógeno de papa. Informe de Investigación del Campo Experimental Saltillo INIFAP-SAGAR 25 p.

Gilman. J.C. 1963 Manual de los hongos del suelo. Ed. Continental, primera edición en español. México, D.F. 572 p.

Hernández, H. L. U., y Granados, A. N. 1992. Actividad de extractos de leguminosas sobre hongos causantes de enfermedades en frutos de postcosecha en condiciones de laboratorio. Memorias del XIX Congreso

Nacional de Fitopatología. Buenavista, Saltillo, Coahuila, p.162.

Holliday, P. 1980. Fungus diseases of tropical crops. Cambridge University Press. London. p 85.

Lira, S. R. H., Gamboa, A. R. y Villarreal, C. L. A. 2001. Plasticidad genotípica de extractos metanólicos de *Larrea tridentata* y su efecto inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum in vitro*. Memorias del XXVIII Congreso Nacional de Fitopatología. Queretaro, Qro. p. F - 58.

Mendoza, Z.C. y Pinto, B. 1983. Principios de Fitopatología y enfermedades causadas por hongos. UACH. Chapingo, México. 311p.

Montes - Belmont, R. 1996. Productos naturales de origen vegetal para el combate de fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología. 14 (1): 1-7.

Montes - Belmont, R. y Flores, M.H.E. 2000. Tratamiento de semillas de sorgo con aceites esenciales para el combate de *Fusarium moniliforme*. XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Puerto Vallarta, Jalisco. p 6.

Morin, L.J.E. 1987. Evaluación de extractos de crucíferas sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn *in vitro*. Tesis licenciatura UAAAN, Saltillo, Coahuila México 47 p.

Ogoshi, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. Phytopathology. 25: 125-143.

Parmeter, J. R. Jr. 1970. *Rhizoctonia solani*, biology and pathology. University of California Press. Berkeley, CA p 27.

Rhoades, D. F. 1977. Integrated antihervivore, antidessiccant and ultraviolet screening properties of creosote bush resin. *Biochem. Syst. Ecol.* 5:281-290.

Rich, A.E. 1983. *Potato diseases*. Academic Press. New York. pp. 63-69.

Robert, A.D. y Boothroyd, C.W. 1978. *Fundamentos de patología vegetal*. Ed. Acribia, Barcelona 392 p.

Romero, S. 1993. *Hongos Fitopatógenos*. Universidad Autónoma Chapingo. Dirección General del Patronato Universitario. Chapingo, Méx. 347 p.

Rundel, P. W, Rasoul, S. M. and Gonzalez, C.A. 1994. Resource availability and herbivory in *Larrea tridentata*. pp 115-114 in: M. Arianoutsou and R. H. Groves, (Eds). *Plant- Animal Interactions in Mediterranean Type Ecosystems*, Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.

Salazar, H. F. J., García, E. R., y Tlapal, B. B. 1990. Efecto de la incorporación de residuos secos de las plantas de Gobernadora (*Larrea tridentata*) y epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.) en suelos infectados con *Pythium aphanidermatum* y *Rhizoctonia solani*, en la germinación y crecimiento de plantas de frijol. *Rev. Mex. Fitopatología* 9 (2): 74-76.

Sandoval, J. 1993. Chile. pp.125-136 En: Díaz Franco, A. (ed.). *Enfermedades infecciosas de los cultivos*. Trillas, México.

Tanaka, Y. T. And Ómura, S. 1993. Agroactive compounds of microbial origin. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:57-87.

Villarreal, C. L. A, López, C. R. G., Infante, M. J. R., Cisneros, F. A. y Ramírez, C. J. C. 1998. Proceso para la producción de resina de gobernadora (*Larrea*) soluble o dispersable en agua. CIQA. (Patente en trámite No. 9810828, IMPI)

Walker, J. C. 1965. Patología Vegetal. Ed. Omega. Barcelona 818 p.

Yang, T. W. 1970. Major chromosome races of *Larrea divaricata* in North America. J. Ariz. Acad. Sci. 6: 41-45.

Zavaleta, M.E. 1987. Modificaciones orgánicas en el manejo de enfermedades radicales. Rev. Mex. Fitopatol. 5: 159-168.