

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISION DE AGRONOMIA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA AGRICOLA**



**ACTIVIDAD ANTIFUNGICA SINERGICA DE QUITOSAN, *Larrea tridentata* (D. C.) Coville Y MEZCLAS DE AMBOS BIOPRODUCTOS  
SOBRE *Botrytis cinerea* Pers.**

**Por:**

**LUCIO ANGELES MARGARITO**

**TESIS DE LICENCIATURA**

**Presentada como requisito parcial para obtener el título de:**

**INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México**

**Noviembre del 2004.**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISION DE AGRONOMIA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA AGRICOLA**

**ACTIVIDAD ANTIFUNGICA SINERGICA DE QUITOSAN, *Larrea tridentata* (D. C.) Coville Y MEZCLAS DE AMBOS BIOPRODUCTOS  
SOBRE *Botrytis cinerea* Pers.**

por:

**LUCIO ANGELES MARGARITO**

**T E S I S   D E   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**

**APROBADO**

**Presidente del jurado**

**Sinodal**

**Dr. F. Daniel Hernández Castillo**

**Dr. R. Hugo Lira Salivar  
Director de Tesis (CIQA)**

**Sinodal**

**Sinodal suplente**

**Dr. Eugenio Guerrero Rodríguez**

**Dr. Gabriel Gallegos Morales**

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE AGRONOMIA**

**M. C. Arnoldo Oyervides García**

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

## RESUMEN

En la búsqueda de alternativas orgánicas para prevenir y controlar el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* y con el objetivo de evaluar el efecto antifúngico de los biocompuestos quitosan, *Larrea tridentata* y la mezcla de ambos sobre este importante hongo de postcosecha, se estructuró y se llevó al cabo el presente trabajo.

Para el desarrollo de este trabajo se analizaron bajo condiciones *in vitro* el efecto de un total de 70 tratamientos en 9 bioensayos diferentes, los cuales se realizaron por separado y en los que los productos antes mencionados fueron evaluados en medio de cultivo PDA a diferentes concentraciones (ppm) sobre el crecimiento micelial del patógeno.

Se analizaron dos diferentes productos de quitosan, siendo uno de ellos de bajo peso molecular y el otro de elevado peso molecular, lo anterior para contrastar la posible diferencia de ambos en el grado de eficacia sobre la inhibición del crecimiento micelial del hongo. Para el caso de la resina de gobernadora se evaluaron tres extractos: metanólico, etanólico y sódico. De igual manera, se evaluó el efecto antifúngico del ácido nordihidroguaiarético, el más notable e importante ingrediente activo de la resina de gobernadora. Por último, mediante las formulaciones quitosan de bajo peso molecular más tres diferentes extractos de *L. tridentata*, se evaluó el efecto sinergista entre ambos bioproductos.

Para el análisis de la información generada se utilizó un diseño completamente al azar con cinco repeticiones por cada uno de los tratamientos analizados. Mediante la utilización de ecuaciones matemáticas se determinó el grado de eficacia de los tratamientos, y el efecto sinergista entre mezclas de quitosan y tres extractos de *L. tridentata*. Para determinar la concentración inhibidora 50 (CI<sub>50</sub>) con los datos de porcentaje de inhibición del hongo vs. concentraciones estudiadas se utilizó un programa computacional del análisis probit.

En relación con los resultados obtenidos por el quitosan de bajo peso molecular sobre la inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea*, esta se logró en un 100 % a partir de una

concentración de 12,000 ppm del producto, por el contrario, al utilizar el mismo producto pero de elevado peso molecular la inhibición se logró a una dosis menor (2,000 ppm), estos resultados nos permitieron concluir que se tiene un mayor efecto con el compuesto de elevado peso molecular.

Por otra parte, los resultados arrojados por los tres diferentes extractos de *L. tridentata* demuestran que los dos mejores fueron el metanólico y el etanólico respectivamente, al inhibir el crecimiento micelial del hongo en la misma proporción (100 %) y con la misma concentración (8,000 ppm). En cambio el extracto sódico mostró poca eficacia al inhibir a una concentración relativamente alta (32,000 ppm), con un 93.8 % el desarrollo del patógeno, mientras que el ácido nordihidroguaiarético a una concentración de 8000 ppm, solo logró inhibir al hongo en 73.2 %.

Referente al efecto sinergista entre las formulaciones quitosan-*Larrea*, este último con sus tres extractos, las mezclas que mayor efecto manifestaron al inhibir en un 100 % el crecimiento micelial del patógeno fueron las combinaciones a partir de 500+2,000 ppm con los extractos metanólico y etanólico, cabe señalar que con el primer extracto se demostró un efecto de sinergia, con el segundo extracto se tuvo un ligero efecto sinergista. Por el contrario, las mezclas hechas con el extracto sódico mostraron un efecto antagónico entre los dos biocompuestos.

Los resultados generados sobre la inhibición de *B. cinerea* mediante el análisis probit mostraron que los mejores productos para alcanzar la  $CI_{50}$  fueron el quitosan y el extracto etanólico de *L. tridentata*, esto se debe a que ambos bioproductos requirieron la menor dosis para lograr dicho efecto. Por otra parte, para alcanzar la  $CI_{90}$  el extracto etanólico mostró ser el mejor producto, ya que requirió la menor dosis para tener tal efecto inhibitor sobre el patógeno.

## INDICE DEL CONTENIDO

	<b>Pag</b>
RESUMEN.....	iii
INDICE DE CUADROS.....	vii
INDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE.....	ix
INDICE DE FIGURAS.....	x
INDICE DE FIGURAS DEL APÉNDICE.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISION DE LITERATURA.....	4
Importancia de las Enfermedades de Postcosecha.....	4
Características de <i>Botrytis cinerea</i> .....	4
Generalidades.....	4
Importancia.....	5
Distribución nacional e internacional.....	5
Rango de hospederos.....	5
Ubicación taxonómica.....	6
Morfología.....	7
Proceso de infección en plantas y frutos.....	7
Ciclo biológico.....	9
Sintomatología.....	10
Epifitiología.....	10
Epidemiología.....	11
Predisposición del hospedero a la infección.....	12
Métodos de Control de <i>B. cinerea</i> .....	14
Preventivos y prácticas culturales.....	14
Control biológico.....	15
Control químico.....	15
Generalidades del Quitosan.....	16
Origen.....	17
Propiedades.....	18
Usos y aplicaciones.....	18

Generalidades de <i>Larrea tridentata</i> .....	21
Distribución geográfica.....	22
Descripción botánica.....	23
Constituyentes fitoquímicos.....	24
Propiedades antifúngicas <i>in vitro</i> .....	26
Descripción y Fundamentos Matemáticos del Efecto Sinergista.....	30
 MATERIALES Y METODOS.....	 32
Localización.....	32
Aislamiento y Obtención del Patógeno.....	32
Descripción del Experimento.....	32
Preparación de los Tratamientos con los Bioproductos.....	33
Tratamientos con base en quitosan.....	33
Tratamientos de extractos de resina de <i>L. tridentata</i> .....	34
Tratamientos con quitosan- <i>Larrea</i> .....	35
Tratamientos del ácido nordihidroguaiarético.....	36
Tratamientos de quitosan de elevado peso molecular.....	36
Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Micelial de <i>B. cinerea</i> .....	37
Análisis Estadístico de los Bioensayos.....	38
Análisis Probit para Determinar la CI <sub>50</sub> sobre <i>B. cinerea</i> .....	38
Grado de Eficacia de los Tratamientos Evaluados.....	38
Efecto Sinergista.....	39
 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	 40
CONCLUSIONES.....	58
LITERATURA CITADA.....	59
APÉNDICE.....	70

## INDICE DE CUADROS

Cuadro	Pag
1. Principales constituyentes fitoquímicos de <i>Larrea tridentata</i> (Brinker, 1993).....	25
2. Concentraciones de quitosan aplicados <i>in vitro</i> contra <i>B. cinerea</i> (Bioensayo 1)....	33
3. Concentraciones de extractos de <i>Larrea tridentata</i> aplicados <i>in vitro</i> contra <i>B. cinerea</i> (Bioensayos 2, 3 y 4).....	34
4. Concentraciones de mezclas quitosan- <i>Larrea</i> aplicados <i>in vitro</i> contra <i>B. cinerea</i> (Bioensayos 5, 6 y 7).....	35
5. Concentraciones del ácido nordihidroguaiarético aplicados <i>in vitro</i> contra <i>B. cinerea</i> (Bioensayo 8).....	36
6. Concentraciones de quitosan de elevado peso molecular aplicados <i>in vitro</i> contra <i>B. cinerea</i> (Bioensayo 9).....	36
7. Comparación de medias del porcentaje de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. sometido a diferentes concentraciones de quitosan.....	40
8. Comparación de medias del porcentaje de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. sometido a diferentes concentraciones del extracto metanólico de <i>Larrea tridentata</i> (D.C.) Coville.....	43
9. Comparación de medias del porcentaje de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. sometido a diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Larrea tridentata</i> (D. C.) Coville.....	44
10. Comparación de medias del porcentaje de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. sometido a diferentes concentraciones del extracto sódico de <i>Larrea tridentata</i> (D.C.) Coville.....	45
11. Comparación de medias del porcentaje de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. sometido a diferentes mezclas quitosan- <i>Larrea tridentata</i> (Extracto metanólico).....	46

12. Comparación de medias del porcentaje de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. sometido a diferentes mezclas quitosan- <i>Larrea tridentata</i> (Extracto etanólico).....	47
13. Comparación de medias del porcentaje de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. sometido a diferentes mezclas quitosan- <i>Larrea tridentata</i> (Extracto sódico).....	48
14. Efecto de las mezclas quitosan- <i>Larrea</i> en la inhibición del crecimiento micelial, en el efecto esperado y en la proporción de sinergismo o antagonismo de ambos bioproductos en <i>Botrytis cinerea</i> .....	51
15. Comparación de medias del porcentaje de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. sometido a diferentes concentraciones de ácido nordihidroguaiarético (NDGA).....	52
16. Comparación de medias del porcentaje de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. sometido a diferentes concentraciones de quitosan de elevado peso molecular.....	53
17. Comparación de la actividad antifúngica contra <i>B. cinerea</i> de soluciones de quitosan de diferentes pesos moleculares.....	53
18. Valores de las concentraciones inhibitorias (CI <sub>50</sub> y CI <sub>90</sub> ), límites fiduciales y coeficiente de determinación (r <sup>2</sup> ) de los diferentes productos utilizados contra <i>Botrytis cinerea</i> Pers.....	55



## INDICE DE CUADROS DEL APENDICE

Cuadro	Pag
1. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. sometido a diversas concentraciones de quitosan.....	71
2. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. sometido a diversas concentraciones de extracto metanólico de <i>Larrea tridentata</i> (D. C.) Coville.....	71
3. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. sometido a diversas concentraciones de extracto etanólico de <i>Larrea tridentata</i> (D. C.) Coville.....	71
4. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. sometido a diversas concentraciones de extracto sódico de <i>Larrea tridentata</i> (D. C.) Coville.....	72
5. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. sometido a diversas mezclas quitosan- <i>Larrea tridentata</i> (Extracto metanólico).....	72
6. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. sometido a diversas mezclas quitosan- <i>Larrea tridentata</i> (Extracto etanólico).....	72
7. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. sometido a diversas mezclas quitosan- <i>Larrea tridentata</i> (Extracto sódico).....	73
8. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. sometido a diversas concentraciones del ácido nordihidroguaiarético (NDGA).....	73
9. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. sometido a diversas concentraciones de quitosan de elevado peso molecular.....	73
10. Relación de tratamientos aplicados y parámetros evaluados en el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Botrytis cinerea</i> Pers.....	74

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA	Pag
1. Ciclo biológico del hongo <i>Botrytis cinerea</i> (Tomado de Agrios, 2001.).....	9
2. Estructuras químicas de quitina, quitosan y celulosa.....	17
3. Representación gráfica de las áreas naturales de <i>Larrea tridentata</i> en el norte de México y sur de los Estados Unidos.....	22
4. Placa de PDA con quitosan a 2,000 ppm en la que se aprecia la deformación en el crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> Pers.....	41
5. Efecto de las mezclas quitosan- <i>Larrea</i> (extracto metanólico) en la inhibición total (A) del crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> y efecto de tres concentraciones de quitosan en el crecimiento parcial (B) de este hongo.....	49
6. Efecto de las mezclas quitosan- <i>Larrea</i> (extracto etanólico) en la inhibición total (A) del crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> y efecto de tres concentraciones de quitosan en el crecimiento parcial (B) de este hongo.....	50
7. Líneas de respuesta concentración inhibición sobre <i>Botrytis cinerea</i> de: A) quitosan, tres extractos de <i>Larrea tridentata</i> : B) metanólico, C) etanólico, D) sódico y E) NDGA .....	56

## INDICE DE FIGURAS DEL APENDICE

FIGURA	Pag
1. Inhibición micelial (%) de <i>Botrytis cinerea</i> por diferentes concentraciones de quitosan.....	78
2. Inhibición micelial (%) de <i>Botrytis cinerea</i> por diferentes concentraciones del extracto metanólico de <i>Larrea tridentata</i> .....	78
3. Inhibición micelial (%) de <i>Botrytis cinerea</i> por diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Larrea tridentata</i> .....	79
4. Inhibición micelial (%) de <i>Botrytis cinerea</i> por diferentes concentraciones del extracto sódico de <i>Larrea tridentata</i> .....	79
5. Inhibición micelial (%) de <i>Botrytis cinerea</i> por diferentes mezclas de quitosan -Larrea (Extracto metanólico).....	80
6. Inhibición micelial (%) de <i>Botrytis cinerea</i> por diferentes mezclas de quitosan -Larrea (Extracto etanólico).....	80
7. Inhibición micelial (%) de <i>Botrytis cinerea</i> por diferentes mezclas de quitosan -Larrea (Extracto sódico).....	81
8. Inhibición micelial (%) de <i>Botrytis cinerea</i> por diferentes concentraciones del ácido nordihidroguaiarético (NDGA).....	81
9. Inhibición micelial (%) de <i>Botrytis cinerea</i> por diferentes concentraciones de quitosan de elevado peso molecular.....	82
10. Efecto de las concentraciones de quitosan en el crecimiento micelial diario de <i>Botrytis cinerea</i> .....	82
11. Efecto de las concentraciones del extracto metanólico de <i>Larrea tridentata</i> en el crecimiento micelial diario de <i>Botrytis cinerea</i> .....	83
12. Efecto de las concentraciones del extracto etanólico de <i>Larrea tridentata</i> en el crecimiento micelial diario de <i>Botrytis cinerea</i> .....	83
13. Efecto de las concentraciones del extracto sódico de <i>Larrea tridentata</i> en el crecimiento micelial diario de <i>Botrytis cinerea</i> .....	84

14. Efecto de las mezclas quitosan-Larrea (Extracto metanólico) en el crecimiento micelial diario de <i>Botrytis cinerea</i> .....	84
15. Efecto de las mezclas quitosan-Larrea (Extracto etanólico) en el crecimiento micelial diario de <i>Botrytis cinerea</i> .....	85
16. Efecto de las mezclas quitosan-Larrea (Extracto sódico) en el crecimiento micelial diario de <i>Botrytis cinerea</i> .....	85
17. Efecto del ácido nordihidroguaiarético (NDGA) en el crecimiento micelial diario de <i>Botrytis cinerea</i> .....	86

## INTRODUCCION

*Botrytis cinerea* es el agente causal de una de las enfermedades más comunes y más ampliamente distribuidas de hortalizas, plantas de ornato, frutales y de muchos cultivos de gran importancia económica en todo el mundo tanto de campo como de invernadero. Esta enfermedad aparece principalmente en forma de tizones en inflorescencias, pudriciones del fruto de anaquel, también ocasiona cáncros, o pudriciones del tallo, ahogamiento de plántulas, manchas foliares y pudriciones del tubérculo, de bulbos y raíces. *Botrytis* ocasiona también las pudriciones blandas secundarias de frutos y hortalizas cuando se almacenan, transportan y venden en el mercado (Agrios, 2001).

Dentro de las plantas de ornato de gran importancia económica a nivel mundial *Botrytis* es el principal agente causal de las pérdidas pre y postcosecha de rosas (*Rosa híbrida* L.) (Tatagiba *et al.*, 1998). En México y en todas las áreas productoras de rosas, el patógeno también produce lesiones necróticas en hojas, tallos y cañas de renuevo. *B. cinerea* ha sido reportado como un verdadero problema en EUA, Japón, India, Canadá, Colombia, Holanda y muchos otros países (Barnes *et al.*, 2002).

La producción agrícola en México se ha caracterizado por la gravedad de sus problemas fitosanitarios y el uso intensivo de plaguicidas para tratar de controlarlos. El control químico ha sido y seguirá siendo por varios años un medio de lucha valioso para reducir las pérdidas causadas por la incidencia de plagas, enfermedades y malezas. Desgraciadamente el uso impropio, indiscriminado y unilateral de los plaguicidas ha provocado una gama de efectos colaterales negativos como: desarrollo de resistencia de plagas, aumento de las desinfecciones, y frecuencias de aplicación, eliminación de los enemigos naturales, rápida resurgencia de plagas primarias, inducción de altas poblaciones de plagas secundarias, daños a la vida silvestre, contaminación de suelos y aguas, efectos en la salud pública derivadas de las intoxicaciones y la presencia de residuos indeseables en los alimentos y por último los costosos daños económicos por rechazos de productos agrícolas de exportación contaminados por residuos que sobrepasan las normas establecidas (FAO, 1990).

A pesar de lo antes mencionado, los fungicidas sintéticos son de uso cotidiano y en México se usan más de 20,000 toneladas anuales (IMIPFAC, 1993). El círculo vicioso que provoca el empleo abusivo de los plaguicidas químicos debe romperse porque no son la única solución, ya que existen otras alternativas amplias y ecológicamente más aceptables; entre ellas se puede mencionar la resistencia genética de los cultivos, el control biológico, las buenas prácticas agrícolas, la rotación de los cultivos, las siembras mixtas, el manejo apropiado de los restos de cosechas y de los hospederos alternos, las feromonas, los controles físicos, mecánicos y manuales, así como los plaguicidas de origen sintético pero de gran efecto selectivo. (FAO, 1990).

Por otro lado, el elevado costo de los plaguicidas y el desarrollo de resistencia han obligado a los investigadores a buscar nuevos ingredientes activos biodegradables, para la implementación de medidas de manejo con menor impacto ambiental y económico, pero con un efecto similar o mayor en el control de las plagas y enfermedades. Ante esta situación, una alternativa prometedora es el uso de los productos naturales derivados de las plantas o de otras especies. Existe información acerca de 400 plantas con propiedades fungicidas y se estima que es una característica que se presenta frecuentemente en algunos metabolitos secundarios (IMIPFAC, 1993).

Las enfermedades causadas por *Botrytis* se encuentran entre las de control más difícil (Mahaffee, 2004, citado en Productores de Hortalizas, Enero, 2004). Lo anterior se debe principalmente a la rápida evolución de la resistencia a los agroquímicos sintéticos (Barnes *et al*, 2002). Esto ha ocasionado un inevitable incremento en las dosis empleadas por los productores para su control, por lo tanto, una buena alternativa a esta problemática lo constituyen los biopéctidas con base en compuestos orgánicos, debido a su biodegradabilidad, porque son inocuos para los humanos y animales, y porque desaparecen rápidamente del medio ambiente después de aplicarse (Lira-Saldivar *et al*, 2003).

Actualmente la tendencia global se ha enfocado a encontrar nuevos productos compatibles con el medio ambiente, para el control de las enfermedades. En los EUA la EPA ha retirado el registro de muchos pesticidas que han demostrado ser de gran riesgo, lo que ha incrementado

la necesidad de encontrar nuevas alternativas que sean efectivas y que se puedan convertir en productos comerciales, ya que la demanda de productos orgánicos se ha incrementado dramáticamente (Duke et al, 2003).

Uno de los productos orgánicos es el quitosan, el cual es un biopolímero no tóxico obtenido del exoesqueleto de los crustáceos (cangrejos, jaibas, langostas y camarones), que ha demostrado una eficaz acción biocida contra diversos patógenos. Otra alternativa orgánica lo constituyen los extractos de resina obtenidas de hojas de un arbusto endémico de las zonas áridas de México llamada gobernadora (*Larrea tridentata*). Esta se caracteriza porque sus hojas y tallos producen una espesa resina rica en lignanos y flavonoides quien también ha demostrado tener propiedades antifúngicas (Lira-Saldivar *et al*, 2003). Con base en lo antes mencionado, en este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

Determinar el efecto antifúngico de dos soluciones de quitosan (bajo y elevado peso molecular); tres extractos de *L. tridentata* (metanólico, etanólico y sódico) y del ácido nordihidroguaiarético sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*.

Analizar el efecto de sinergismo o antagonismo entre las soluciones de quitosan y los extractos de *L. tridentata* en la inhibición *in vitro* de *B. cinerea*.

Estimar la concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>), de los productos quitosan, tres extractos de *L. tridentata* y el NDGA sobre *B. cinerea*.

## **REVISION DE LITERATURA**

### **Importancia de las Enfermedades de Postcosecha**

Las enfermedades en postcosecha de productos hortofrutícolas ocurren después de la cosecha, desde la finca del productor hasta el consumidor final, pasando por todas las etapas de transporte, empaque, almacenamiento y comercialización (Henz, 1992).

Las pérdidas debido a enfermedades de postcosecha alcanzan de 10 a 30 por ciento de la producción total de los cultivos percederos, aunque en ocasiones estas son superiores al 30 por ciento, sobre todo en países en vías de desarrollo. Estas pérdidas son directas, es decir, disminuyen la calidad y cantidad de los productos afectados. Las enfermedades de postcosecha son causadas generalmente por los hongos de las clases Ascomycetes, Deuteromycetes, Oomycetes y Basidiomycetes y algunas especies de bacterias; dentro de estos se considera que son los agentes causales más comunes e importantes de las pudriciones de postcosecha (Agrios, 2001).

*B. cinerea* puede comenzar el proceso de la enfermedad de dos formas distintas: infección en precosecha e infección en postcosecha, sobrevive y esporula en lesiones de tallos, hojas y partes florales de frutas y hortalizas (Arauz, 1992).

### **Características de *Botrytis cinerea***

#### **Generalidades**

El moho gris, *Botrytis cinerea*, deriva su nombre de la palabra griega *botrys*, que significa racimo de uvas, lo cual describe el característico arreglo de las esporas. Este hongo imperfecto pertenece al estado telomórfico de *Botryotinia fuckeliana* (Jarvis, 1977). *B. cinerea* es un importante patógeno, pero su incidencia depende mucho del manejo fitosanitario que se le proporcione al cultivo (Mendoza, 1993).



## **Importancia**

*B. cinerea* es uno de los patógenos más comunes y más ampliamente distribuidas en hortalizas y frutales en campo, invernadero, transporte y almacenamiento. Este patógeno reduce notablemente los rendimientos al impedir que se formen los frutos cuando el ataque ocurre durante las primeras fases de su desarrollo. Además causa la pudrición de los frutos ya desarrollados, tanto en campo como durante su transporte y almacenamiento, ocasionando pérdidas considerables que pueden llegar a ser totales si las condiciones ambientales le son favorables (Agrios, 2001; Martínez y Del Río, 1975; Mendoza y Pinto, 1985).

## **Distribución nacional e internacional**

En México el hongo se encuentra distribuido en todas las zonas florícolas de los estados de México, Michoacán, Puebla, Veracruz, Morelos, Hidalgo, Coahuila y el D.F. (Mendoza, 1993), sin embargo, su severidad es diversa en cada zona.

A nivel mundial este hongo se encuentra en muchos países como Canadá, Estados Unidos, México, Colombia, Ecuador, España, Holanda, Alemania, Francia, Italia, Nueva Zelanda, Groenlandia, Lituania, Egipto, Japón e Irak entre otros, presentándose en zonas que van desde muy tropicales a templadas (Jarvis, 1977).

## **Rango de hospederos**

Este género presenta más de 235 hospederos entre los que destacan los siguientes: rosal, clavel, gerbera, crisantemo, lilis, gloxinia, violeta africana, cóleo, begonia, dracena, ficus, vid, frambuesa, cereza, lechuga, camotes, frijol, cebolla, ajo, tomate, pepino y manzano (Mendoza, 1993); además de cinco hospederos en cereales como el trigo, seis forrajeros (pastos) y seis forestales como *Picea mariana* (Mc Farlane, 1968).

La habilidad para afectar diversos cultivos es debida a que presenta una fase saprofítica y otra parasítica, pues su ataque puede iniciar en tejidos dañados o senescentes, iniciando la

producción de metabolitos tóxicos que matan tejidos sanos al avance de su movimiento (Jainer, 1981). Por otra parte, aunque no es precisamente un habitante del suelo, se asocia con residuos de cosecha posiblemente degradando celulosa, pectina y cutina; donde puede producir esclerocios (Hudson, 1968 y Mendoza, 1993).

Diplez *et al.* (1995) menciona que aunque *B. cinerea* cuenta con un amplio rango de hospederos, no se ha detectado ningún tipo de especialización; sin embargo, existe en su secuencia genética un tramo característico, al que se le ha llamado Boty, el cual se ha encontrado en aislamientos de vid y tomate, pero no en lenteja, y es posible que este patógeno presente dos líneas diferentes en su secuencia genética, una donde su secuencia presenta un Boty y otras cepas donde el Boty está ausente.

### **Ubicación taxonómica**

La taxonomía de este hongo según Alexopoulos y Mims (1979), es la que a continuación se describe:

Reino:	Mycetae
División:	Amastygomycota
Subdivisión:	Deuteromycotina
Forma Clase:	Deuteromycetes
Forma subclase:	Hyphomycetidae
Forma Orden:	Moniliales
Forma Familia:	Moniliaceae
Forma Género:	<u>Botrytis</u>
Forma Especie:	<u>cinerea</u>

## **Morfología**

Smith *et al.* (1995) indican que *B. cinerea* en su estado anamórfico o conidial, produce una densa capa afieltrada sobre la superficie del hospedero de color café a gris, constituida por conidióforos septados, café oscuros ramificados en su parte distal, con una longitud de 500 a 1000  $\mu$ ; las ramificaciones son cortas y presentan un hinchamiento en su ápice, de donde emergen esterigmas productoras de conidias; estas son lisas, unicelulares de 9.0 a 15 x 6.5 a 10  $\mu$  de color café claro en masa y hialinas individualmente, de forma elipsoide a ovoides, semejando un conjunto de racimos en cada ápice de las ramificaciones (como racimos de uvas).

Este hongo forma estructuras de forma irregular, por lo general aplanadas y de color negro llamados esclerocios, cuya función es la de sobrevivencia de las especies en condiciones adversas y de las cuales se puede formar la fase sexual o ascal (Jarvis, 1977, Kenneth, 1989 y Mendoza, 1993). Un dato importante es que en células del mismo talo y menormente en células subterminales, la condición heterocariótica puede deberse a la habilidad de anastomosis de las hifas, ya que hay intercambios de núcleos a través de un poro septal (Kohler, 1930, Hansen y Smith, 1932).

## **Proceso de infección en plantas y frutos**

El proceso de infección se inicia con la penetración de los tubos germinativos a la planta, las condiciones para su penetración son dadas por la cutícula del huésped, una gota de agua o solución nutritiva, que se vuelve sustrato por la formación de un mucílago adhesivo con diámetro de 10 – 15  $\mu$  (McKeen, 1974). Lo anterior permite que el tubo germinativo dañe la cutícula, emitiendo enzimas que la degradan, haciendo orificios sobre la superficie, ocurriendo generalmente por la punta del tubo germinativo, que a continuación presiona la cutícula rompiendo una pequeña área 0.2  $\mu$  de diámetro (Pfaff, 1925), posteriormente la actividad enzimática de las esterases se incrementa en la punta del tubo germinal y aproximadamente 7 horas después de la inoculación inicia la penetración (McKeen, 1974).

En el caso del cultivo de fresa, el proceso es un poco diferente, ya que las conidias germinan a los 90 min de la inoculación, aunque la mayoría germina entre las 3 y 5 h a una temperatura óptima de 20 °C, mientras que la penetración ocurre 20 h después de inoculado, iniciando la segunda fase, que es germinación y crecimiento del tubo a 30 °C. El intervalo entre la inoculación y la aparición del primer síntoma es de alrededor de 48 h en frutos de fresa (Sutton y Peng, 1993).

Este patógeno se ha encontrado también en cotiledones senescentes de frijol (Johnson y Powelson, 1983). En el caso de flores se cree que las secreciones del néctar y estigmas podrían ser mayormente infectivos, el hongo puede infectar el estilo y el ovario penetrándolos, pero no es el mismo caso en todas las especies.

La adhesión de conidias en diferentes sustratos como tomate, requieren de hidratación inmediatamente, lo que ocurre con conidias vivas y muertas de *B. cinerea*; y además de ser son ligeramente influenciadas por lecitinas, azúcares, sales o tratamientos con proteasas, existiendo un efecto hidrofóbico entre el sustrato del hospedero y la superficie de la conidia (Doss *et al*; 1993). El caso de infección por microconidias no se ha reportado, pues aparecen solo durante la espermatización (reproducción sexual).

La infección por conidias es más débil que por tubos germinativos del micelio, ya que este siempre tiene una base de nutrientes almacenados, así el potencial del micelio es mucho mayor que la de conidias germinativas, y es más independiente de factores externos ambientales. *B. cinerea* causa degradación excesiva de las paredes del hospedero y las lamelas medias de las células, así como alteraciones en paredes distantes de las hifas invasoras, pero se sabe que con tratamientos con quitosán a los tejidos las células hifales fueron principalmente restringidas a cavidades de las heridas y células epidérmicas rotas y aún con la presión de las hifas, los tejidos del hospedero se preservaron en buen estado sin alteraciones en tejido (Doss *et al*; 1993).

## Ciclo biológico

El hongo inverna como micelio y esclerocios sobre o dentro de los residuos de cosecha y en el suelo, estos germinan y producen conidióforos que después forman conidios que al ser liberados pueden atacar plantitas al nivel del cuello, también infectan flores (pétalos), hojas y frutos; en donde los conidios germinan, penetran e invaden los tejidos, desintegrando las células a su alcance, ocasiona las pudriciones sobre las cuales se desarrollan conidióforos y conidios que forman la capa o moho gris, estos se liberan de nuevo y atacan otras plantas (Figura 1); cuando las condiciones son favorables forman sobre las pudriciones los esclerocios los cuales les sirven como estructuras de sobrevivencia (Agrios, 2001; Mendoza, 1991).

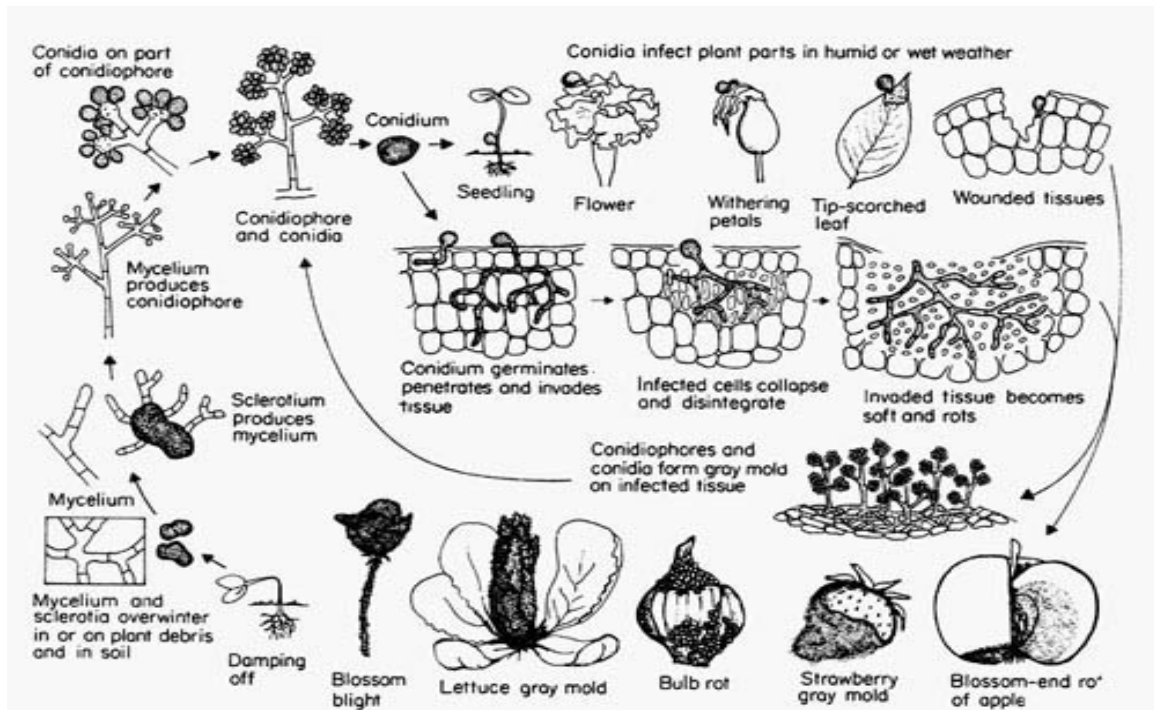


Figura 1. Ciclo biológico del hongo *Botrytis cinerea* (Tomado de Agrios, 2001.).

También se hace mención que los esclerocios de *B. cinerea* germinan para producir conidióforos, pero pueden también producir una fase perfecta de *Botryotinia*, en la que las ascosporas se forman en un apotecio, pero esta fase se encuentra raramente en la naturaleza (Agrios, 2001; Mass, 1984).

## **Sintomatología**

En los frutos en maduración el síntoma típico es una lesión café claro, oval o redondeada, ligeramente blanda, pero no acuosa que después se torna café rojizo y cubierta por un crecimiento grisáceo y polvoso; al avanzar la enfermedad puede llegar a cubrir todo el fruto y posteriormente secarlo y momificarlo (Mendoza, 1991).

Cuando el ataque ocurre durante el estado de flor o fruta muy pequeña, la infección generalmente se extiende hacia el cáliz y pedúnculo, produciendo una deshidratación total y posteriormente la muerte. En frutos desarrollados, próximos a madurar, los síntomas empiezan con la pérdida de su firmeza y posteriormente aparecen manchas descoloridas y opacas (Martínez y Del Río, 1975).

Cuando induce una pudrición seca, la enfermedad es altamente destructiva pudiendo manifestarse en el fruto en dos formas características: una es comenzando a atacar por el extremo del pedúnculo y la otra es en la parte apical del fruto. El tejido del fruto cuando comienza a ser atacado, es ligeramente de color café y blando (Powelson, 1960).

## **Epifitiología**

Según Devaux (1978) citado por Paulus (1990), la humedad es el factor más importante que regula el suceso del moho gris. Las lluvias frecuentes inducen la máxima incidencia de la enfermedad. Las condiciones óptimas en campo para el desarrollo de este patógeno son una temperatura de 15 a 20 °C con 90 por ciento de humedad relativa.

Agrios (2001), cita que el moho gris muestra mayor severidad en ambientes húmedos y moderadamente fríos (18 a 23 °C); bajo estas condiciones el hongo esporula, libera y germinan sus esporas produciendo la infección. Sin embargo se ha observado que el patógeno muestra actividad a temperaturas bajas, ocasionando pérdidas considerables en cosechas que se almacenan durante largos periodos, aun cuando las temperaturas estén entre 0 y 10 °C.

Con respecto a luminosidad, *B. cinerea* presenta gran adaptabilidad tanto a luz como a oscuridad; pero el micelio decrece en presencia de luz roja y por el contrario la luz anaranjada estimula germinación de conidias. Con ciclo continuo de luz o 12 h de oscuridad se promueve esporulación y se suprime la formación del esclerocio. El proceso para inducción de esclerocio se encontró opuesto al de inducción de esporulación. El moho gris presenta diferentes necesidades en varios procesos de crecimiento (Jarvis, 1977 y Kenneth, 1989).

En un trabajo realizado por Zhang y Sutton (1994) en *Picea mariana*, inoculando *B. cinerea* y sometiéndolo a diferentes temperaturas y humedades relativas se observó, que las condiciones de luz y oscuridad no tuvieron ninguna influencia sobre la esporulación.

El fototropismo negativo fue notado en tubos germinativos de *B. cinerea*, ya que se forman pigmentos carotenoides u otros fotoreceptivos en esporas y tubos germinativos; el fotorreceptor en las puntas de tubos germinativos es la riboflavina (Jarvis, 1977).

Respecto al pH, las conidias de *B. cinerea* presentan un amplio rango de adaptación dependiendo de su hospedero, por ejemplo: variando de 2.0 a 9.8, aunque es preciso señalar que a pH de 2.1 los tubos germinativos son anormales en apariencia e inician su desintegración; el pH óptimo para la formación de esclerocios es de 4.0 (Jarvis, 1977).

## **Epidemiología**

De acuerdo a Deacon (1988) *B. cinerea* se conoce mejor como un parásito de las frutas blandas, no especializado que ataca a una amplia gama de plantas, pero solo si sus tejidos comienzan a envejecer o han sido dañados, con frecuencia coloniza los pétalos de las flores en proceso de envejecimiento y los puntos donde estas se desprenden del fruto subyacente (es decir, “heridas naturales”). Este mismo autor menciona que se ha demostrado que las esporas de *B. cinerea* no germinan en presencia del micelio progenitor. Esto se puede interpretar como una estrategia para asegurar que las esporas sean dispersadas antes de germinar y se considera como un invasor secundario común de los tejidos dañados por parásitos primarios.

Martínez y Del Río (1975) citan que la infección causada por el patógeno se lleva al cabo de diferentes maneras: por el acarreo de esporas por el viento, agua y por el contacto de los frutos con el suelo o con otros que estén enfermos. Si las condiciones son favorables, el daño ocurre no importando en que estado de desarrollo se encuentre el fruto.

Sommer (1981) menciona que si la fruta entra en contacto con el suelo, esta se puede invadir por el micelio del hongo y si esta fruta se empaca, el micelio invade al fruto sano adyacente. Funt *et al.* (1997), reportan que la infección también ocurre durante la floración, entrando las conidias a la fruta a través de las partes florales donde es inactiva y cuando el fruto madura, generalmente el hongo llega a ser activo y ocurre la descomposición.

### **Predisposición del hospedero a la infección**

De acuerdo a Jarvis (1977) algunas de las condiciones que predisponen al hospedero al ataque de *B. cinerea*, son:

- a. Tejidos moribundos. Este factor es asociado a la predisposición de plantas dañadas o moribundas y en estos casos el hongo las prefiere en lugar de tejido sano.
- b. Heladas. Afecta el crecimiento y los procesos de defensas de las plantas, por medio de la temperatura, por ejemplo: papa almacenada a 3 °C, se predispuso al ataque de *B. cinerea*.
- c. Heridas. Cualquier agente que pueda dañar físicamente los tejidos de las plantas puede predisponerlas al ataque del hongo; por ejemplo: *Aphis fabae* es un insecto que predispone a la infección de *B. cinerea* en campo, incrementando su incidencia, presumiblemente por el contenido de sacarosa en su mielecilla; también pueden causar heridas la maquinaria y el equipo.



- d. Contenido de agua. Esta evita barreras, facilitando la penetración del patógeno, dándole un ambiente ideal, así el contenido de agua en frutos, facilita su ruptura.
- e. Contenido de carbohidratos. El contenido de azúcar en los tejidos influye en su susceptibilidad, *B. cinerea* prefiere altos contenidos de azúcares en los tejidos de flores, frutos y hojas, reduciendo la fotosíntesis. Algunas enzimas producidas por este patógeno son: polygalacturonasa, xylanasa, celulasa y pectin metil esterasa (Jarvis, 1977).
- f. Influencia de los pesticidas. Varios insecticidas, herbicidas y reguladores de crecimiento alteran el metabolismo del hospedero, modificando la susceptibilidad, ya que induce cambios en las concentraciones de azúcares, algunos estimulantes del hongo son: zineb, maneb, 2,4-6 tricloro y ácido pentaclorofenoxiacéticos, entre otros mientras que otros interfieren dando resistencia al cultivo contra el patógeno. Un ejemplo de susceptibilidad es la aplicación de Bayleton 25 W aplicada a flores de *exacum* matando la planta a los 5 días (Pfleger, 1984a).
- g. Nutrición. El estado nutricional de las plantas afecta grandemente la incidencia de *B. cinerea* en ellas; por ejemplo: las deficiencias de N, P, K, Mg y Ca; este último bloquea la penetración de la cutícula cuando abunda, decreciendo la habilidad del moho gris a utilizar pectatos (Volpin y Elad, 1991; Hamer y Evensen, 1994).
- h. Microorganismos. La presencia anterior de otros microorganismos puede influir en la incidencia de *B. cinerea*, así como la presencia de insectos que pueden vectorear el hongo (Giblin *et al.* 1993).
- i. Polen. Afecta la germinación de conidias, así como la presencia de bacterias que compiten por nutrientes con efectos antibióticos, en estigmas de trigo y pistache el polen incrementa la susceptibilidad a *B. cinerea* (McLelland y Hewitt, 1973 y Bolkan *et al.* 1984).

- j. Genética de las variedades. Según las características de estas; por ejemplo: al grosor de la cutícula, capas cerosas o muy suculentas, las cuales están asociadas a la susceptibilidad (Hammer y Evensen, 1994; Zhang y Sutton, 1994; Tuomi *et al.* 1993; Sirjusingh *et al.* 1996).

## **Métodos de Control de *Botrytis cinerea***

Los procedimientos de control de *B. cinerea* son complejos e inciertos en sus resultados en condiciones muy favorables para el parásito, pero se puede resumir de la siguiente manera (<http://www.infoagro.com/abonos/botrytis2.asp>):

### **Métodos preventivos y prácticas culturales**

Es uno de los aspectos más importantes para el control de esta enfermedad y debería de condicionar el tamaño y tipo de invernadero donde *B. cinerea* es un problema grave. Se sugiere lo siguiente:

Evitar las siembras demasiado densas en condiciones de baja luminosidad.

Desinfectar las semillas.

Solarizar los suelos ya que es efectivo para el control de esclerocios.

Manejar la aireación, calefacción y el riego en invernadero con el fin de reducir la duración de los periodos diarios que combinan humedad a saturación y condensaciones y temperaturas de 15-17° C.

Realizar podas y deshojados a ras del tallo para no dejar tocones que sirvan al desarrollo del parásito aplicando una pasta fúngica en las heridas.

Controlar los niveles de nitrógeno en el suelo, ya que niveles elevados favorecen el desarrollo de la enfermedad.

Retirar restos de cultivo y plantas afectadas por la enfermedad tanto del exterior del invernadero como de los alrededores.

Aplicar cubiertas plásticas de invernadero con absorción de luz ultravioleta ya que reducen la esporulación y la tasa de colonización epidermal.

Proteger los órganos almacenados, como es el caso de los bulbos de cebolla, los que deben mantenerse de 2 a 4 días a una temperatura de 32 a 50 °C a fin de eliminar el exceso de humedad y posteriormente a 3 °C en un ambiente lo más seco posible.

### **Control biológico**

Se han descrito diversos hongos (*Trichoderma* spp., *Coniothyrium* spp., *Gliocladium* p., *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Verticilium* spp.), bacterias y nematodos como antagonistas de *B. cinerea*, citando a los primeros como los más importantes en los cultivos hortícolas. Para el control biológico del moho gris de las manzanas se ha descrito el hongo antagónico *Trichoderma harzianum*. Estos agentes de control todavía no se aplican de forma comercial en estos cultivos.

### **Control químico**

El control de *Botrytis* en los terrenos de cultivo mediante aspersiones químicas aún no ha tenido el éxito deseado, especialmente en los climas húmedos y fríos. En el caso de la pudrición de la lechuga por *Botrytis*, se recomienda llevar al cabo aspersiones con diclorán o zineb.

Otros fungicidas como el difolatán, dyrene, maneb-zinc, maneb o el clorotalonilo, parecen ser más adecuados en cultivos como la cebolla y el tomate. Para el control de las pudriciones del fruto, como es el caso del moho gris de la fresa, se recomiendan las aspersiones o espolvoreaciones con captán, thiram o benomyl. Sin embargo, se han descrito regiones donde la resistencia de *B. cinerea* a fungicidas es un hecho, por lo que es recomendable realizar prácticas como las siguientes (<http://www.infoagro.com/abonos/botrytis2.asp>):

Tratar la parte aérea de las plantas con aspersiones a base de iprodiona, vinclozolina o procimidona en alternancia o mezcla con fungicidas de amplio espectro, especialmente con los que tienen una acción contra-*Botrytis*: tiram, diclofluanida o clorotalonil.

Tratamientos preventivos durante la floración, o cuando las condiciones ambientales sean favorables para el desarrollo de la enfermedad.

Sobre los tallos donde se inicie un chancro aplicar pastas fúngicas con base de tiram + iprodiona + éter de petróleo, y también triadimefon.

El tratamiento químico debe ir acompañado de medidas culturales.

En general, las materias activas recomendadas para el control de *B. cinerea* son benomilo, diclofluanida, clozolinato, iprodiona, procimidona, tiabendazol, vinclozolina+metiram, metil-tiofanato, procimidona+dietofencarb, etc.

## **Generalidades del Quitosan**

El quitosan es un aminopolisacárido catiónico formado por unidades de glucosamina (Shahidi *et al.*, 1999); Este biopolímero es muy abundante en la naturaleza y es el segundo después de la celulosa.

## Origen

El quitosan es un polisacárido de origen natural absolutamente inocuo para la vida vegetal y animal y además de ser biodegradable y biocompatible (Nishioka *et al.*, 1990). Es un biopolímero, no tóxico que se obtiene por la desacetilación parcial o total de la quitina, polímero natural muy abundante que se extrae comercialmente a partir de los caparazones de crustáceos generados como desechos de la industria pesquera (Cabrera *et al.*, 2002).

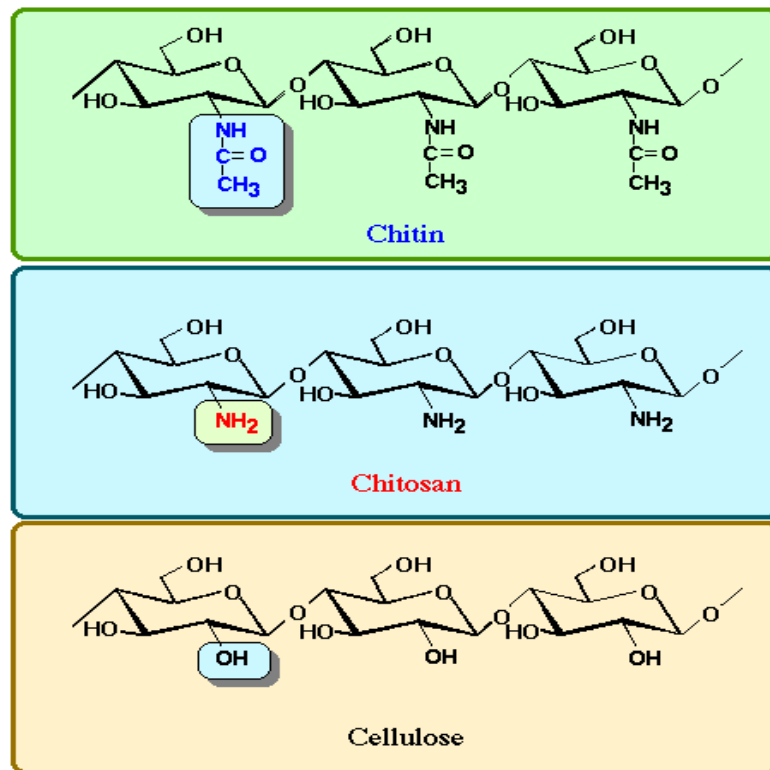


Figura 2. Estructuras químicas de quitina, quitosan y celulosa.

La estructura de los biopolímeros, quitina, quitosan y celulosa, son muy similares entre sí (Figura 2) ya que los tres tienen unidades repetitivas de los grupos hidroxilos, pero además la quitina tiene un éster, el cual es convertido por desacetilación en la amina que caracteriza al quitosan. La celulosa en cambio, solo tiene unidades con tres grupos hidroxilos.

## **Propiedades**

El quitosán, posee propiedades que dependen del grado de desacetilación y de polimerización, que están muy relacionadas a su vez con el peso molecular y con propiedades fisicoquímicas como la solubilidad, entre otras. El quitosán es un material heterogéneo cuya desacetilación varía desde un sesenta hasta un noventa por ciento y los pesos moleculares (MW) se reportan de 50 hasta 2000 KDa (Hirano, 1999; Rege y Block, 1999).

El peso molecular de las quitinasas microbianas se encuentra entre 20 a 120 KDa, este va a depender del sustrato y microorganismo utilizado para la producción. El peso molecular de las quitinasas de hongos se encuentra por arriba de 30 KDa (Sang-Lang y Isu-Chang, 1997). La presencia en el quitosán de los grupos NH<sub>2</sub> y OH, posibilitan la derivación de la misma (Hirano, 1997).

## **Usos y aplicaciones**

El quitosán y sus propiedades en la agricultura se han investigado desde hace varios años (Nishioka *et al.*, 1990). La presencia de grupos amino libres en el quitosán, lo hacen que sea muy activo biológicamente (Shahidi *et al.*, 1999). Entre las múltiples propiedades del quitosán, es bien conocida su actividad antimicrobiana sobre bacterias, levaduras, nemátodos y hongos.

Un ejemplo de ello es el reciente trabajo reportado por Ortega *et al.* (2003) en el que se estudio el uso de complejos interpolielectrolíticos de poly (ácido acrílico)-quitosán (PAA-CS) como inductores de tolerancia contra hongos patogénicos que afectan al tomate, concluyó que: el tratamiento a la semilla de tomate con PAA-CS mostraron un efecto positivo en el crecimiento y producción de biomasa de plántulas de tomate en presencia de *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capsici*. En la ausencia de estos patógenos, el uso de PAA-CS incrementaron el peso de las plántulas, por lo tanto dichos autores consideran que el uso de estos tratamientos a las semillas permiten incrementar la tolerancia al estrés biótico.

Estudiando los efectos antifúngicos de recubrimiento con quitosán en fresas y frambuesas frescas durante el almacenamiento Zhang y Quantick (1998) encontraron que el recubrimiento con este biocompuesto fue casi tan efectivo como el proporcionado por el fungicida tiabendazol para controlar la pudrición causada por *Botrytis cinerea* y *Rhizopus* sp de los frutos almacenados a 13 °C. El recubrimiento con quitosán también tuvo efectos benéficos en la firmeza de los frutos, en la acidez, contenido de vitamina C, así como en el contenido de antocianinas en fresas y frambuesas almacenadas a 4 °C.

El quitosán derivado de la quitina obtenida de conchas de cangrejo fue aplicado como recubrimiento de semillas y también se aplicó al sustrato de siembra de un invernadero antes de proceder a la inoculación con el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopercisi* por Benhamou *et al.* (1994). Estos autores estudiaron la inducción de resistencia sistémica al *Fusarium* de la corona y pudrición de las raíces de tomate después de que fueron tratadas con quitosán. Sus resultados indican que después de examinar las raíces de tejido de tomate en los sitios de penetración del hongo se encontró que el pretratamiento con quitosán se asoció siempre a la expresión de reacciones de defensa de las plantas. En la epidermis las células mostraron signos típicos de necrosis caracterizada por una marcada desorganización en el citoplasma. Las células fungosas sufrieron de un serio daño y fueron frecuentemente circundadas por un material denso en electrones, los cuales se determinó que eran de naturaleza fenólica. Estas observaciones proporcionan más evidencias de que el quitosán actúa como un inductor de reacciones de defensa en las plantas y por lo tanto, este biopolímero tiene el potencial de convertirse en una poderosa alternativa para el manejo de enfermedades en los cultivos.

Por otra parte, los oligómeros de quitosán también han sido estudiados por su actividad antifúngica en *Fusarium solani* por Kendra y Hadwiger (1984). El trabajo de estos investigadores mostraron que el quitosán tuvo una máxima actividad antifúngica y en la inducción de pisatina, cuando el quitosán y sus derivados no mostraron actividad antifúngica y solo una leve actividad en la formación de pisatina. Estos resultados muestran que el quitosán de elevado peso molecular es más activo en su actividad antifúngica y en su actividad de

producción de pisatina que las soluciones de quitosan de pesos moleculares intermedios y bajos.

Otro de los usos del quitosan por ser un biopolímero natural, biodegradable y no tóxico es en el empleo como agente antimicrobiano en alimentos, aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) (Hirano, 1999).

En otros estudios el quitosan también se ha venido utilizando ampliamente para estudiar diversos aspectos relacionados con la microbiología de alimentos procesados sólidos y líquidos. La información consignada por Roller y Covill (1999) relacionada con las propiedades antifúngicas del quitosan en jugos de manzana contra 15 levaduras y hongos asociados con la pudrición de alimentos indica que la adición de 5 g/L fueron requeridos para inactivar a *Zigosaccharomyces bailii* y una cepa de *Saccharomyces ludwigii* en jugo de manzana durante 14 días a 25 °C. La inhibición del crecimiento e inactivación de hongos y levaduras filamentosas respectivamente fue dependiente de concentración del quitosan, pH del medio y temperatura. Los autores de este trabajo concluyeron que el quitosan tiene potencial para ser empleado en jugos de frutas y merece ser estudiado en el futuro como un preservativo natural en alimentos y bebidas con tendencias a la descomposición por hongos.

La literatura también reporta el uso de derivados de la quitina en el control ambiental. Ellos actúan como matriz adsorbentes de iones metálicos tales como:  $Cd^{++}$ ,  $Cr^{++}$ ,  $Pb^{++}$ , y otros iones presentes en efluentes acuosos (Maurelia *et al.* 2000; Ferreira, *et al.* 2000; Sag ; Aktay. 2000). El quitosan se caracteriza por su alta afinidad por los iones metálicos debido a la gran cantidad de los grupos amino presentes en su estructura. El mecanismo de extracción depende del grado de protonación del quitosan así como de las especies predominantes de los iones metálicos en solución ( Dzul *et al.* 2001).

El uso del quitosan en aplicaciones farmacéuticas ha sido también ampliamente estudiado. En particular en lo que se refiere a la liberación de droga se ha aprovechado su naturaleza catiónica para formar complejos con drogas y/o excipientes de carga opuesta alterando las características fisicoquímicas de la formulación (Singla y Chawla 2001).



En estudios previos en mezclas quitosan-alginato se ha encontrado que el mayor grado de interacción entre los primeros es entre 40–50 % lo cual corresponde aproximadamente a una relación molar 1:1 entre quitosan y alginato debido a la interacción electrostática entre un grupo carboxilato de una unidad de anhidromanurónico o anhidrogulurónico de alginato y un grupo amonio de quitosan. La incorporación de la mezcla quitosan/alginato en un 20 % en el comprimido permitió obtener una forma farmacéutica de liberación prolongada con un tiempo de disolución de 4,3 horas (Tapia *et al.* 2002).

### **Generalidades de *Larrea tridentata***

Las zonas áridas representan un gran potencial porque guardan una riqueza basada no tanto en su densidad, como en su especialización biológica, donde la flora y la fauna son el producto de miles de años de adaptación fisiológica para su sobrevivencia. Un caso típico 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 de gobernadora por su dominación 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 olor que tiene, sobre todo después de una lluvia (Brinker, 1993).

Las hojas de este arbusto xerófito están envueltas 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 más (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 más que la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> (Meinzer *et al.* 1990; González *et al.* 1994). Se considera que la resina funciona como un filtro contra la radiación solar UV, y

protege a la planta contra el herbivorismo de insectos y animales (Barbour *et al.* 1977; Downum *et al.* 1988). Los arbustos de *L. 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 fenólicos y el ácido nordihidroguaiarético (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* domina aproximadamente 17.5 millones de hectáreas desde el oeste de Texas hasta el 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 (Figura 3), limitado por heladas invernales o lluvias excesivas de invierno.

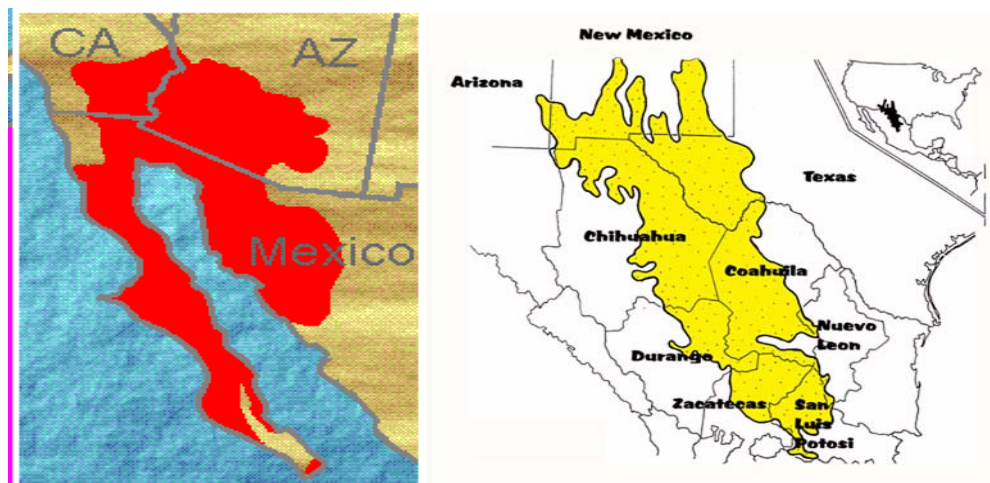


Figura 3. Representación gráfica de las áreas naturales de *Larrea tridentata* en el norte de México y sur de los Estados Unidos.

En la República Mexicana, la gobernadora se encuentra en 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 (Figura 3). Se estima que el 25 % (500,000 Km<sup>2</sup>) del territorio Nacional está cubierto con este arbusto de las zonas áridas (Belmares *et al.* 1979).

Las razas de esta especie se caracterizan por ser diferentes en su número cromosómico, ya que las plantas del Desierto Chihuahuense son diploides ( $n = 13$ ), las del 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 Davender, 1990). Crece bien en planicies secas, 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 forraje seco 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 la corona radicular. La raíz crece solo cerca de 170 cm hacia abajo, pero se ramifica hasta más de 4 m lateralmente (Brinker, 1993).

El tamaño de la planta varía de 0.5 a 4 m en altura dependiendo de la lluvia de invierno o verano, y la altura promedio varía 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 dicotómica lateralmente (Coyle y Roberts, 1975).

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 crecen al final del invierno o a principios de la primavera, pero pueden florecer en cualquier momento después de una lluvia; crecen, cerca de las terminaciones de los retoños jóvenes como capullos solitarios con cinco pétalos 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**

Los principales compuestos en la resina de *L. tridentata* reportados en la literatura son numerosos. Destacan por su mayor contenido con base al peso seco del follaje los lignanos fenólicos, seguidos por las saponinas, flavonoides, aminoácidos y minerales (Cuadro 1).

El compuesto más importante que se encuentra en la resina de las células cercanas a las capas epidermales superior e inferior de las hojas y tallos es el ácido nordihidroguaiarético (NDGA), 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 demostrado 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 e híbridos de *Larrea*, habiendo una ligera diferencia en concentración entre las razas de ploidía en lo que se avanza a través del Desierto Chihuahuense (2.62 %) hacia el Sonorense (3.84 %) y hacia el Mojave (4.86 %) (Gisvold, 1948; Downum *et al.* 1988).

Cuadro 1. Principales constituyentes fitoquímicos de *Larrea tridentata* (Brinker, 1993).

Porcentaje del peso seco	Tipo	Compuesto
16-21	Lignanós Fenólicos	Ácido Dihidroguaiarético Hemi-nosisoguaiacín Ácido nordihidroguaiarético Nordihidroguaiacín
5-7.5	Flavonoides	Apigenín Kaempferol
10-15	Saponinas Triterpenos	Larreagenín A Ácido Larréico
0.1-0.2	Monoterpenos Volátiles Hidrocarbonos 35	Alpha penene Delta-3-carene limoneno
	Aromáticos	Benzaldeído Benzilacetato Benzilbutano Metil naftaleno
	Esteroides	Beta-sitosterol Colesterol Campesterol
	Taninos Carbohidratos	Glucosa Sucrosa
70.1 (de tallos) 16.6	Lípidos Aminoácidos	Alkil ésteres (C43-C56) Fenilalanina Isoleucina Ácido glutámico Ácido aspártico Glicina
15.6 mg/lb 19.8 mg/100 g	Vitaminas	Caroteno Vitamina C
13.7	Minerales	Sodio Potasio Calcio Magnesio Hierro Azufre Fósforo

El propósito del NDGA y su derivativo o-quinona es evidentemente un repelente de herbívoros (Janzen *et al.* 1994). El ganado no consume normalmente el follaje de *Larrea* (Kearney y Pebbles, 1951; Zamora, 1988), pero puede hacerlo si se remueve la resina, ya que es una fuente excelente de proteína, comparable a la alfalfa (Duisberg, 1952).

Estudios interoblacionales de *L. tridentata* realizados en el Desierto Sonorense revelaron que las concentraciones de NDGA encontradas en la resina de sus hojas variaron en función de la latitud y de la época del año (Downum *et al.*, 1988), así como con factores ecológicos, ya que la concentración de NDGA puede reducirse por la contaminación ambiental provocada por concentraciones elevadas de ozono (González *et al.* 1988).

La concentración de NDGA es de cerca del 50 % de la resina que forma parte de un 10 a 15 % del peso seco de las hojas. También hay más de 20 flavonoides metil aglyconas que constituyen la otra mitad de la resina. Los posibles efectos de todos los diferentes flavonoides y otros constituyentes son numerosos y variados. Los efectos combinados de estos constituyentes apuntan hacia un sinergismo que amplía el efecto del compuesto activo primario (NDGA), esto sugiere la ventaja de usar un extracto de la estructura entera hoja/ramas en comparación con usar una preparación de NDGA purificado o sintetizado. (Sakakibara *et al.* 1976).

### **Propiedades antifúngicas *in vitro***

Uno de los primeros trabajos sobre el efecto fungicida y/o fungistático de la resina de la gobernadora reporta que al utilizar extractos crudos de cloroformo y etanol los hongos *Rhizoctonia solani* Kühn, *Pythium* sp. Pringsh. y *Rhizopus nigricans* Ehrenb, fueron controlados *in vitro*, tanto con el extracto metanólico como con el clorofórmico; no fue el caso de *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr., ya que con 1,000 ppm de cada extracto, solo se controló en un 76 y 93 %, respectivamente (Fernández *et al.* 1979).

Posteriormente, otros autores han venido corroborando *in vitro* las propiedades antifúngicas de la gobernadora, ya sea con productos obtenidos con diferentes extractantes, o bien con material vegetativo seco y molido. Los resultados obtenidos por Velásquez (1981), indican que el extracto que mejor efecto manifestó en estudios *in vitro* fue la fracción etanólica a dosis de 2,000 ppm, observando un crecimiento nulo a los 15 días después de la inoculación del hongo *Cytosporina* sp. (Sacc.) Sacc., estado asexual de *Eutypa armeniaca* Hansf. y M.V. Carter agente causal del brazo muerto de la vid; además, inhibió la germinación de ascosporas de *E. armeniaca* a la misma dosis, pero con extractos en base a etanol y cloroformo.

Los estudios efectuados por Salazar *et al.* (1990) mostraron que el polvo de hojas y el extracto en acetona de *L. tridentata* también inhibieron *in vitro* el crecimiento de *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. En el trabajo realizado por Vargas *et al.* (1997) sobre la actividad antiaflatoxigénica *in vitro* de 10 extractos vegetales, se destaca el efecto del extracto de *L. tridentata* obtenido con diclorometano, ya que inhibió en 92 y 86 % el crecimiento de *Aspergillus flavus* Link: Fr. y *A. parasiticus* Speare, respectivamente; en cambio los extracto metanólicos tuvieron poco efecto.

En un ensayo realizado por Lara *et al.* (1997), se aplicó gobernadora en polvo y extractos obtenidos con acetona y agua para estudiar el efecto inhibitor *in vitro* de esto productos sobre *Pythium ultimum* Trow. Los extractos se adicionaron al 2 % (v/v) en el medio de cultivo 3P (selectivo a Pythiaceal) antes del vaciado, mientras que el polvo fue adicionado en la proporción antes mencionada a las cajas petri antes del vaciado. Los resultados indicaron que el polvo y el extracto en acetona inhibieron el crecimiento del patógeno, en tanto que el extracto en agua tuvo un comportamiento similar al testigo.

Por su parte, Verástegui *et al.* (1996) determinaron el efecto de extractos etanólicos de *L. tridentata* en el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias que afectan la salud de humanos y animales. Sus resultados mostraron que los extractos inhibieron diversos actinomicetos y hongos entre los que destacan: *Candida krusei* (A. Castellani) Berkhout, *C. albicans* (C.P. Robin) Berkhout, *C. rugosa* (Anderson) Diddens y Lodder, *Cryptococcus*

*albidus* (k. Saito) C.E. Skinner, *C. laurenti* (Kuff.) C.E. Skinner y *C. neoformans* var. *neoformans* Bemis, así como las bacterias *Listeria monocytogenes* (Murray, Webb y Swann) Pirie, *Clostridium perfringens* (Veillon y Súber) Hauduroy, Ehringer, Urbain, Guillot y Magrou, *Shigella dysenteriae* (Siga) Castellani y Chalmers, *Yersinia enterocolitica* (Schleifstein y Coleman) Frederiksen y *Proteus vulgaris* Hauser.

Debido a que existen pocos fungicidas comerciales que han sido efectivos en inhibir la germinación de teliosporas de *Tilletia indica* Mitra el agente causal del Carbón Karnal del trigo, Rivera *et al* (2001) realizaron un trabajo para estudiar el efecto inhibitorio sobre este hongo de varios extractos de plantas del estado de Sonora. Sus resultados indican que la inhibición total *in vitro* del hongo ocurrió con 500 mg/mL del extracto de *L. tridentata* obtenido con diclorometano.

Las teliosporas tratadas con este extracto no mostraron viabilidad cuando se transfirieron a medio de cultivo fresco, por lo que el extracto de gobernadora mostró su potencial como agente de control de *T. indica*. En comparación, los extractos obtenidos de *Chenopodium ambrosioides* L. (Aellen) y *Encelia farinosa* Gray ex Torr. Solo fueron parcialmente efectivos contra *T. indica*.

Al comparar el efecto de extractos etanólicos de resina de gobernadora obtenida del follaje colectado en los desiertos Chihuahuense (D. Ch.) y Sonorense (D.S.), Balvantín (2001) encontró que el hongo *Pythium* Pringsh. fue significativamente inhibido en su desarrollo micelial, aun con las dosis más bajas evaluadas, ya que con 500 ppm se logró una inhibición del 100 % con el extracto del D.S., mientras que con esa misma dosis del extracto del D. Ch. se redujo el crecimiento en un 70 % en comparación con el testigo. En cuanto a los extractos provenientes del D. Ch. se observó un leve crecimiento del micelio con 1,000 y 2,000 ppm, pero a partir de 4,000 ppm el hongo fue totalmente inhibido.

En un estudio de Lira *et al* (2002) se encontró que los extractos metanólicos hidrosolubles de resina de *L. tridentata* colectados a diferentes latitudes (paralelos 24, 25, 26, 27, y 28°) en los D. Ch. y D.S. mostraron claramente una acción inhibitoria sobre el



crecimiento del hongo *F. oxysporum*, revelando un marcado efecto diferencial en relación con la región geográfica donde se colectó el follaje de gobernadora, debido a que la mayor inhibición (90.3 %) ocurrió con los extractos de latitudes sur del D.S.

Una respuesta similar sobre el hongo *Phytophthora infestans* con extractos metanólicos obtenidos a través de un gradiente latitudinal ha sido reportada por Gamboa *et al* (2003), quienes encontraron diferencias estadísticas significativas en la inhibición del patógeno con los extractos de ambos desiertos, siendo más eficaces los del Desierto Sonorense. Los resultados anteriores aluden entonces que las condiciones ecológicas donde se desarrollan los arbustos de *Larrea tridentata* tienen un efecto en las características fitoquímicas de la resina y consecuentemente su acción antifúngica.

El efecto fungitóxico sobre *Alternaria solani* Sorauer de los extractos hidrosolubles etanólico, metanólico y clorofórmico obtenidos de poblaciones nativas de *L. tridentata* provenientes de los Desiertos Chihuahuense y Sonorense, también fue consignado por Lira-Saldivar *et al* (2003b), quienes encontraron que el crecimiento micelial del hongo fue significativamente afectado a partir de 2,000 y 4,000 ppm, pero solamente se logró inhibirlo totalmente con los tres extractos de ambos desiertos a las dosis de 8,000 ppm.

Con base en los numerosos avances reportados, queda claro que los compuestos fitoquímicos presentes en la resina de gobernadora tienen una potente actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* contra diversos hongos fitopatógenos de notable importancia económica, incluyendo algunos que han sido señalados en la literatura por tener una gran capacidad metabólica como son los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* (Montes *et al.* 2000).

En los resultados antes documentados también se advierte que independientemente de los solventes usados (etanol, metanol, cloroformo, diclorometano, acetona, agua, etc.) para la extracción de la resina encontradas en hojas de este arbusto, la efectividad para inhibir el crecimiento de hongos invariablemente es consistente, lo cual no deja dudas sobre la seguridad de sus propiedades antifúngicas.

En cuanto a los principios activos encontrados en la resina de *Larrea*, diversos autores (Brinker, 1993; Gnabre *et al.*, 1995; Clark, 1999) señalan a los lignanos fenólicos y especialmente al NDGA que solamente es producido por esta planta, como el metabolito secundario que confiere las propiedades biocidas de la gobernadora; sin embargo, esto no ha sido plenamente demostrado con hongos fitopatógenos quedando también pendiente la realización de trabajos de investigación para documentar en detalle el modo de acción de los extractos de *L. tridentata* sobre diversos microorganismos.

### **Descripción y Fundamentos Matemáticos del Efecto Sinergista**

Desde el punto de vista de la utilización de agroquímicos para el control de plagas y enfermedades en los cultivos el efecto de sinergismo es muy útil debido a las implicaciones de eficacia que esto implica. En el artículo de Richer (1987) se menciona claramente que el sinergismo se define como la acción combinada de dos o mas productos, la cual es mayor que la suma de la acción de cada uno de esos productos usados por separado, Lo anterior tiene su fundamento en el concepto original de sinergismo publicado por Limpel (1962). En otras palabras, este autor describe que el efecto de dos productos puede tener una acción aditiva ( $2+2 = 4$ ), lo cual se describe matemáticamente con la siguiente ecuación:  $E_C = X + Y$ , donde  $E_C$  es la respuesta aditiva esperada; X es el porcentaje de control o inhibición cuando el producto A es aplicado por separado a la tasa usada en la mezcla; Y es el porcentaje de control observado cuando el producto B se aplica por separado a la tasa usada en la mezcla. Si el efecto observado ( $E_O$ ) es mayor que el efecto esperado, entonces se dice que existe sinergismo.

En términos concretos Richer (1987) señala que: si 1 kg del producto “A” mata el 20 % de malezas ( $X = 20$ ), y 1 kg del producto “B” mata el 10 % de malezas ( $Y = 10$ ), entonces el efecto esperado  $E_e$  de una mezcla de 1 kg A y 1 kg B debe ser 30 %. Pero si el efecto observado  $E_O$  es 40 %, entonces  $E_O$  es mayor que el efecto esperado  $E_e$ , y por lo tanto el efecto de sinergismo entre los dos productos existe. Desafortunadamente esta manera simplista de ver el sinergismo aplica en muy pocos casos, y generalmente solo en aquellos en los cuales

uno de los productos no tiene ningún efecto en la especie objetivo, por ejemplo,  $Y = 0$ . Esto es posiblemente la única situación donde el término sinergismo puede ser usado correctamente. Sin embargo, lo que ocurre en la mayoría de los casos es que la suma de  $X$  y  $Y$  excede el 100 %, por ejemplo: 1 kg de “A” mata 60 % de malezas ( $X = 60$ ) y 1 kg de “B” mata 50 % de malezas ( $Y = 50$ ). Claramente se ve que el efecto esperado no puede ser 110 %. Si el efecto observado de la mezcla de los productos es 90 % existe sinergismo, pero ¿cómo puede ser probado esto?. Un argumento que ha sido aprobado por la Suprema Corte de los Estados Unidos es lo que se expresa a continuación: en el ejemplo anterior, si 1 kg de A mata el 60 % de las malezas, entonces habrá un 40 % restante. Lo mejor que 1 kg de B puede esperarse que haga es que elimine el restante 40 %. En otras palabras:

$$E_e = 60 + 50 \times 40 / 100 = 80 \%$$

Si el efecto observado es mayor que 80 %, entonces existe sinergismo. Este efecto es expresado de manera simple y clara por la ecuación de Limpel (1962) que se expresa de la siguiente manera:

$$E_e = X + Y - XY / 100$$

Por lo tanto, y a manera de conclusión se considera de acuerdo con esta ecuación, que si el efecto observado es mayor que el efecto esperado  $E_e$  (calculado con la ecuación de Limpel), entonces se dice que existe sinergismo. De igual manera si el efecto observado es menor que el efecto esperado, entonces la mezcla de los productos A y B tiene un efecto antagónico.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Localización**

El presente trabajo se llevó al cabo en el Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), en el área de Microbiología del Departamento de Estudios Ambientales.

### **Aislamiento y Obtención del Patógeno**

El hongo *B. cinerea* fue aislado de tejido enfermo de rosas provenientes de un invernadero comercial de la sierra de Arteaga, Coah, purificado monosporicamente e identificado a especie de acuerdo a las claves de Barnett y Hunter (1972).

### **Descripción del Experimento**

La estructura del experimento en general consistió de 9 bioensayos. En el primer bioensayo, se tuvieron 12 tratamientos con base en quitosan (de bajo peso molecular) a diferentes concentraciones (ppm). Para un segundo bioensayo se evaluaron los 9 tratamientos de *L. tridentata* con extractos metanólicos, en el tercer bioensayo se trabajó con los extractos etanólicos de *L. tridentata* siendo estos 8 tratamientos. Los tratamientos evaluados en el cuarto bioensayo fueron los extractos de *L. tridentata* con base en hidróxido de sodio, fueron 10. El quinto bioensayo se evaluó el efecto combinado de las mezclas quitosan+*Larrea* (extracto metanólico), con un total de 8 tratamientos. Para el sexto bioensayo se trabajó con las mezclas quitosan+*Larrea* (extractos etanólicos), con un total de 8 tratamientos. Los tratamientos utilizados en la séptima prueba fueron las mezclas formuladas con quitosan+*Larrea* (extractos sódicos), teniendo 6 tratamientos.

En el octavo bioensayo se evaluaron los tratamientos a base de ácido nordihidroguaiarético con un total de 4 tratamientos. En el noveno bioensayo se evaluó el efecto antifúngico de un producto comercial de quitosan (de elevado peso molecular). A todos los bioensayos anteriores se les incluyeron dos tratamientos químicos con fungicidas convencionales que fueron el tiabendazol y mancozeb más un testigo absoluto (PDA). Los anteriores tratamientos se tomaron como base de comparación para el análisis de los

resultados. Los tratamientos utilizados se muestran en los cuadros 2, 3, 4, 5 y 6 respectivamente.

## **Preparación de los Tratamientos con los Bioproductos**

### **Tratamientos con base en quitosan**

Se agregó 10.1 mL de ácido acético glacial al 99.9 % a 90 mL de agua destilada desionizada para obtener una concentración del 10 %, esto con la finalidad de facilitar la dilución del quitosan y debido al bajo grado de solubilidad que manifiesta este biopolímero en agua pura. Posteriormente se agregaron los gramos necesarios, dependiendo de la concentración requerida tomando en cuenta que 1 mg es equivalente a 1 ppm, lo anterior diluido en 1,000 mL de agua pura.

Posteriormente se sometió cada solución por separado a agitación constante durante 24 h. Posteriormente se aforó a un volumen de 1,000 mL para tenerlo diluido en ácido acético glacial al 1 %. La solución se llevó a esterilización a 121 °C durante 20 min, terminado este proceso se ajustó la solución a un pH de 5.6 con una solución de hidróxido de sodio (NaOH), (Romanazzi *et al.* 2002). En el cuadro 2 se presentan los tratamientos elaborados con quitosan que se aplicaron en los bioensayos con *B. cinerea*.

Cuadro 2. Concentraciones de quitosan aplicados *in vitro* contra *B. cinerea* (Bioensayo 1).

Tratamiento	Dosis (ppm)
1	62.5
2	125
3	250
4	500
5	1,000
6	2,000
7	4,000
8	8,000
9	10,000
10	12,000
11	16,000
12	32,000

### Tratamientos de extractos de resina de *L. tridentata*

Para la preparación de las concentraciones de extractos de la gobernadora se pesaron en una balanza analítica los gramos de cada concentración de los extractos hidrosolubles de gobernadora. Lo anterior tomando en cuenta que 1 mg equivale a 1 ppm diluido en 1,000 mL de agua pura. Una vez preparada la suspensión esta se agitó de forma manual durante 5 min para mejorar la dilución. En el cuadro 3 se muestran los tratamientos de los diferentes extractos de *L. tridentata* (9 metanólicos, 8 etanólicos y 10 sódicos), los cuales fueron evaluados en 3 bioensayos contra *B. cinerea*.

Cuadro 3. Concentraciones de extractos de *Larrea tridentata* aplicados *in vitro* contra *B. cinerea* (Bioensayos 2, 3 y 4).

Bioensayo número	Extracto	Tratamiento	Dosis (ppm)
2	metanólico	1	500
		2	1,000
		3	2,000
		4	4,000
		5	5,000
		6	7,000
		7	8,000
		8	12,000
		9	16,000
3	etanólico	1	250
		2	500
		3	1,000
		4	2,000
		5	4,000
		6	8,000
		7	12,000
		8	16,000
4	sódico	1	1,000
		2	2,000
		3	4,000
		4	8,000
		5	12,000
		6	16,000
		7	20,000
		8	24,000
		9	28,000
		10	32,000

### Tratamientos con mezclas de quitosan-*Larrea*

En una solución conocida de quitosan previamente preparada se adicionaron los gramos de *L. tridentata* correspondientes a cada concentración la mezcla así preparada se mantenía en agitación constante para lograr una solución lo más homogénea posible. En el cuadro 4 se presentan las mezclas quitosan-*Larrea* que se evaluaron en tres bioensayos para analizar el posible efecto sinérgico de ambos bioproductos sobre *B. cinerea*.

Cuadro 4. Concentraciones de mezclas quitosan-*Larrea* aplicados *in vitro* contra *B. cinerea* (Bioensayos 5, 6 y 7).

Bioensayo número	Mezclas de	Tratamiento	Dosis (ppm)
5	quitosan + Extracto metanólico	1	500/500
		2	500/1,000
		3	500/2,000
		4	500/4,000
		5	1,000/2,000
		6	1,000/4,000
		7	2,000/2,000
		8	2,000/4,000
6	quitosan + Extracto etanólico	1	500/500
		2	500/1,000
		3	500/2,000
		4	500/4,000
		5	1,000/2,000
		6	1,000/4,000
		7	2,000/2,000
		8	2,000/4,000
7	quitosan + Extracto sódico	1	500/28,000
		2	500/32,000
		3	1,000/28,000
		4	1,000/32,000
		5	2,000/28,000
		6	2,000/32,000

### Tratamiento del ácido nordihidroguaiarético

Debido a que el componente fitoquímico más importante presente en la resina que se obtiene de las hojas de los arbustos de gobernadora es el aglicón flavonoide ácido nordihidroguaiarético (NDGA) y debido a que este antioxidante presenta propiedades biocidas contra hongos (Zamora, 1988), en este trabajo experimental se decidió evaluar por separado su efecto sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*, para su comparación con los extractos de *L. tridentata*. En el cuadro 5 se muestran las concentraciones utilizadas de NDGA contra *B. cinerea*.

Cuadro 5. Concentraciones del ácido nordihidroguaiarético aplicados *in vitro* contra *B. cinerea* (Bioensayo 8).

Tratamiento	Dosis (ppm)
1	1,000
2	2,000
3	4,000
4	8,000

### Tratamientos de quitosan de elevado peso molecular

Con el fin de contrastar la posible diferencia en cuanto al grado de eficacia antifúngica de dos diferentes productos comerciales de quitosan (de bajo y elevado peso molecular), sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*, se realizó el último de los bioensayos con el quitosan de elevado peso molecular. En el cuadro 6 se enlistan las concentraciones evaluadas de este producto.

Cuadro 6. Concentraciones de quitosan de elevado peso molecular aplicados *in vitro* contra *B. cinerea* (Bioensayo 9).

Tratamiento	Dosis (ppm)
1	1,000
2	2,000
3	4,000



## Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Micelial de *B. cinerea*

Para determinar el efecto antifúngico de los tratamientos a base de quitosan, *L. tridentata* y las mezclas de ambos productos, la evaluación se realizó de acuerdo al método del medio envenenado agregando la concentración de cada tratamiento al medio PDA, vaciándolo posteriormente a las cajas Petri.

Una vez solidificado el medio de cultivo, y con la ayuda de un sacabocados se extrajeron explantes de 0.5 mm de diámetro con solo micelio de *Botrytis cinerea* tomados del margen de una colonia vigorosa de cinco días de edad. Dicho explante se depositó al centro de la caja Petri con PDA y la concentración a estudiar. Posteriormente, las cajas Petri se sellaron y se llevaron a incubación a una temperatura de  $24 \pm 1$  °C. El periodo de incubación fue de 5 días tiempo que requirió para llenar las placas del testigo absoluto. Tiempo al que se midió el crecimiento radial micelial en mm de cada una de las unidades experimentales para determinar el efecto antifúngico. Este mismo procedimiento se siguió para cada uno de los bioensayos que antes se señalaron.

Para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial radial de *B. cinerea* en las cajas Petri se utilizó una ecuación que se generó al medir el crecimiento en mm del hongo en cada tratamiento aplicado, así como en el testigo. A continuación se presenta la ecuación matemática desarrollada para determinar este porcentaje debido a los tratamientos con los bioproductos que se emplearon en este trabajo experimental.

$$PI = 100 - [(Cr * 100) / Rp]$$

Donde:

PI = Inhibición del crecimiento del hongo (%)

Cr = Crecimiento micelial radial del hongo (mm)

Rp = Radio de la placa (mm)

## **Análisis Estadístico de los Bioensayos**

Se empleó un diseño experimental completamente al azar, analizado mediante el programa estadístico computacional versión 2.5 de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con el cual se realizó una comparación de medias para determinar la diferencia mínima significativa (DMS) entre tratamientos con un nivel de significancia del 1 % (0.01).

### **Análisis Probit para Determinar la $CI_{50}$ en *B. cinerea***

Con la finalidad de analizar la información generada y posteriormente graficar los resultados obtenidos en los bioensayos realizados con los tres extractos hidrosolubles de resina de gobernadora, las soluciones de quitosan y las formulaciones quitosan-*Larrea*, se utilizó el análisis probit (Finney 1971).

Este análisis fue utilizado para determinar la  $CI_{50}$  de los tratamientos estudiados sobre *B. cinerea*. Para realizar lo anterior, se utilizó el programa computacional escrito en lenguaje matemático Pc Probit desarrollado por Camacho (1990). En dicho programa se capturaron los datos correspondientes a las concentraciones utilizadas en cada uno de los bioensayos vs. los porcentajes de inhibición de cada uno de estos. Posteriormente, los resultados arrojados por el programa fueron graficados en papel logarítmico donde el eje de la variable independiente (X) correspondió a las concentraciones evaluadas y en el eje de la variable dependiente (Y), los porcentajes promedio de inhibición del hongo. Con la información graficada, se obtuvo la respuesta exponencial denominada línea concentración-inhibición, mediante la cual se estimó la  $CI_{50}$  de cada producto sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*.

### **Grado de Eficacia de los Tratamientos Evaluados**

Para la determinación del grado de eficacia de los tratamientos empleados sobre el crecimiento micelial del hongo *B. cinerea*, se utilizó la fórmula de Abbott (1925). Este autor originalmente en su artículo publicado describió un método para calcular la efectividad de un

insecticida en el campo, posteriormente su método se ha venido adaptando por otros investigadores para calcular o determinar la efectividad de fungicidas en la inhibición de determinado hongo. La expresión matemática original de la fórmula de Abbott es la siguiente:

$$Pc = (x - y) 100 / x$$

Donde: Pc = Porcentaje de control

x= Porcentaje de insectos vivos en el lote testigo

y= Porcentaje de insectos vivos en el lote tratado

La ecuación original de Abbott utilizada en este trabajo experimental con la finalidad de determinar la eficacia de tratamientos debido a productos fungicidas, ha sido previamente utilizada y reportada por Acosta *et al.* (2003) de la siguiente manera:

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

Donde: ET = Eficacia del tratamiento

RT = Crecimiento micelial radial en el testigo

rt = Crecimiento micelial radial en el tratamiento

### **Efecto Sinergista**

Para determinar el efecto sinergista en las diferentes mezclas empleadas de quitosan con los tres extractos de *L. tridentata* sobre el crecimiento de *B. cinerea*, se utilizó la fórmula de Limpel (1962), que se expresa como sigue:

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

Donde: Ee = Efecto esperado de dos agentes inhibidores

X y Y = Porcentajes de inhibición relativa de los agentes usados juntos

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Efecto de los Tratamientos de Quitosan

Considerando los resultados obtenidos en este bioensayo, en el que se evaluaron diversas soluciones de quitosan, es importante señalar que los tratamientos que mayor efecto mostraron al inhibir eficazmente en un 100 % el crecimiento micelial de *B. cinerea* fueron los tratamientos que corresponden a las concentraciones de 12,000, 16,000 y 32,000 ppm de quitosan respectivamente (Cuadro 7); resultados similares fueron detectados con el mancozeb a 2,000 ppm. Los tratamientos anteriores se comportaron estadísticamente similares entre sí para inhibir de la misma manera el desarrollo *in vitro* del patógeno.

Cuadro 7. Comparación de medias del porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* Pers. sometido a diferentes concentraciones de quitosan.

Tratamiento	Concentración (ppm)	Inhibición micelial (%)	
Quitosan	12,000	100.00	a*
Quitosan	16,000	100.00	a
Quitosan	32,000	100.00	a
Mancozeb	2,000	100.00	a
Quitosan	10,000	90.30	b
Quitosan	8,000	78.56	c
Quitosan	4,000	76.44	cd
Tiabendazol	1,000	71.04	de
Quitosan	2,000	65.42	ef
Quitosan	1,000	60.92	fg
Quitosan	500	56.56	gh
Quitosan	250	53.84	h
Quitosan	125	21.08	i
Quitosan	62.5	9.04	j
Testigo absoluto	—	0	k

\* Nivel de significancia= 0.01; DMS= 5.9505

Un efecto menos eficaz que el mostrado por los tratamientos antes señalados, se obtuvo con quitosan a 10,000 ppm, ya que con este se logró una inhibición de 90.3 %. Los tratamientos restantes solo inhibieron parcialmente el desarrollo micelial del patógeno, por lo

que se ubicaron estadísticamente por debajo de todos los tratamientos anteriores, teniendo como característica que a menor concentración del bioproducto evaluado el efecto antifúngico es notablemente menor. Romanazzi *et al.* (2002) presentaron evidencias claras de que el quitosan a las concentraciones de 1,000, 5,000 y 10,000 ppm resultó efectivo en tratamientos de pre y postcosecha para controlar a *B. cinerea* en uvas de mesa, reduciendo la incidencia y severidad del moho gris.

Resultados similares a los reportados en este trabajo han sido consignados por Bautista, *et al.* (2003), al evaluar este mismo producto *in vitro* sobre el crecimiento micelial de *Colletrotrichum gloeosporioides* ya que citan que inhibieron a este patógeno de postcosecha en un 100 % a las concentraciones de 25,000 y 30,000 ppm respectivamente. Sin embargo, en nuestro trabajo la eficacia del quitosan resultó ser mejor, ya que *B. cinerea* logró ser inhibido en un 100 % con la dosis de 12,000 ppm; lo anterior pudiera deberse posiblemente a las diferencias en cuanto a la composición de la pared celular entre estos patógenos. Este efecto en las hifas se observa en la figura 4 donde el crecimiento del patógeno se volvió amorfo en comparación al crecimiento observado en las placas del testigo, lo que confirma que el quitosan afecta las membranas celulares de las hifas del hongo impidiendo un crecimiento regular y por consiguiente inhibe por completo su desarrollo.

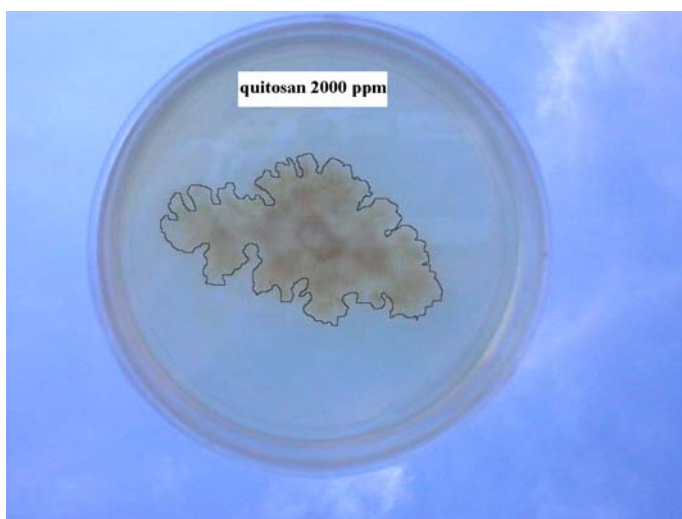


Figura 4. Placa de PDA con quitosan a 2,000 ppm en la que se aprecia la deformación en el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* Pers.

Respecto a la deformación del crecimiento micelial de *B. cinerea* debido a los tratamientos de quitosan aplicados en este trabajo, Plascencia *et al.* (2000) encontraron que este biopolímero aumenta el diámetro de las hifas distorsionándolas y ocasionando ruptura; así mismo, estos autores determinaron que el principal efecto inhibitorio o antifúngico era detectado durante las etapas iniciales de crecimiento. De igual manera Savard *et al.* (2002) reportan que mediante un examen microscópico de *Saccharomyces unisporus* después del tratamiento con quitosan, mostró aglutinación de una sustancia refractiva en toda la pared celular, sugiriendo esto una interacción entre el quitosan y la pared celular del microorganismo.

Diversas hipótesis han sido reportadas en la literatura sobre el mecanismo o modo de acción del quitosan en hongos. Shahidi *et al* (1999), propusieron el siguiente mecanismo de acción: ellos mencionan que la interacción entre moléculas de quitosan con cargas electrostáticas positivas y las membranas celulares cargadas negativamente tiende a provocar un goteo que ocasiona una pérdida de material proteínico y otros constituyente intracelulares, lo cual induce a la reducción del crecimiento del microorganismo en cuestión.

Por otro lado, Roller y Covill (1999) reportaron que el modo de acción antimicrobiana del quitosan se debe a que este biopolímero actúa como un agente secuestrante o quelatante, lo que provoca que algunos elementos nutricionales no sean disponibles para el microorganismo, inhibiendo de esta manera su crecimiento. La tasa de crecimiento de hifas fungosas han mostrado ser muy sensitivas a todos los factores que afecten el calcio intracelular ( $\text{Ca}^{2+}$ ), incluyendo variaciones en la concentración del calcio extracelular. Por lo tanto es concebible que el quitosan limita el crecimiento de hongos filamentosos indirectamente haciendo que el  $\text{Ca}^{2+}$  y otros minerales esenciales se vuelvan no disponibles para el crecimiento del hongo.

### **Efecto de los Tratamientos del Extracto Metanólico de *L. tridentata***

En cuanto al efecto del extracto metanólico de gobernadora, es importante destacar que los tratamientos que mayor efecto manifestaron al inhibir significativamente en un 100 % el

crecimiento micelial de *B. cinerea* fueron los tratamientos que corresponden a las concentraciones de 8,000, 12,000 y 16,000 ppm, comportándose igual que el mancozeb a 2,000 ppm (Cuadro 8)

Cuadro 8. Comparación de medias del porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* Pers. sometido a diferentes concentraciones del extracto metanólico de *Larrea tridentata* (D.C.) Coville.

Tratamiento	Concentración (ppm)	Inhibición micelial (%)
Extracto metanólico	8,000	100.00 a*
Extracto metanólico	12,000	100.00 a
Extracto metanólico	16,000	100.00 a
Mancozeb	2,000	100.00 a
Extracto metanólico	7,000	90.34 b
Tiabendazol	1,000	71.04 c
Extracto metanólico	5,000	68.24 d
Extracto metanólico	4,000	48.40 e
Extracto metanólico	2,000	41.06 f
Extracto metanólico	1,000	37.36 g
Extracto metanólico	500	19.40 h
Testigo absoluto	—	0 i

\* Nivel de significancia = 0.01; DMS= 2.9440

Otro dato importante a señalar es la eficacia a 7,000 ppm, que se ubica por debajo de los anteriores, con un 90.34 % y se comporta mejor que el tiabendazol que a 1,000 ppm inhibe el crecimiento del patógeno en un 71.04 % (Cuadro 8). Los tratamientos restantes solo inhiben parcialmente al hongo; así a menor concentración se inhibe al patógeno en menor proporción.

Resultados similares a los anteriores fueron obtenidos por Lira-Saldivar *et al.* (2003a), al evaluar extractos metanólico, etanólico y clorofórmico de *L. tridentata* sobre *Alternaria solani*, encontrando que el crecimiento micelial fue significativamente afectado a partir de 2,000 y 4,000 ppm, pero solamente se logró inhibirlo totalmente con los tres extractos a la dosis de 8,000 ppm.

### **Efecto de los Tratamientos del Extracto Etanólico de *L. tridentata***

Los resultados obtenidos en este bioensayo, muestran que los tratamientos que mayor efecto manifestaron al inhibir en un 100 % el crecimiento micelial de *B. cinerea* corresponden a las concentraciones de 8,000, 12,000 y 16,000 ppm y el mancozeb a 2,000 ppm (Cuadro 9).

Cuadro 9. Comparación de medias del porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* Pers. sometido a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Larrea tridentata* (D. C.) Coville.

Tratamiento	Concentración (ppm)	Inhibición micelial (%)	
Extracto etanólico	8,000	100.00	a
Extracto etanólico	12,000	100.00	a
Extracto etanólico	16,000	100.00	a
Mancozeb	2,000	100.00	a
Extracto etanólico	4,000	90.40	b
Extracto etanólico	2,000	81.40	c
Extracto etanólico	1,000	80.88	c
Tiabendazol	1,000	71.04	d
Extracto etanólico	500	24.20	e
Extracto etanólico	250	15.82	f
Testigo absoluto	—	0	g

Nivel de significancia = 0.01; DMS= 3.3569

También es importante señalar el comportamiento que muestran las concentraciones de 4,000, 2,000 y 1,000 ppm respectivamente, los que los que presentan un actividad mejor que el tiabendazol a 1 000 ppm. El mejor de estos tratamientos fue la concentración a 4,000 ppm que inhibió un 90.4 % el crecimiento del hongo en comparación al 71.04 % de inhibición observado con el tiabendazol. Los resultados con este extracto, de nuevo concuerdan con lo ya señalado respecto a lo citado por Lira-Saldivar *et al.* (2003a).

### **Efecto de los Tratamientos del Extracto Sódico de *L. tridentata***

En cuanto a los resultados obtenidos en este bioensayo, referente a los extractos sódicos, es importante señalar, que los tratamientos que mejores resultados arrojaron son los que corresponden a las concentraciones de: 32,000, 28,000, 24,000 y 20,000 ppm



respectivamente, siendo la concentración mayor la que mayor efecto inhibitorio presentó (93.7 %) sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*, mientras que el mancozeb a 2,000 ppm inhibió en un 100 % el crecimiento micelial del hongo, comportándose estadísticamente mejor que los extractos de *L. tridentata* (Cuadro 10).

Cuadro 10. Comparación de medias del porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* Pers sometido a diferentes concentraciones del extracto sódico de *Larrea tridentata* (D. C.) Coville.

Tratamiento	Concentración (ppm)	Inhibición micelial (%)	
Mancozeb	2,000	100.00	a*
Extracto sódico	32,000	93.70	b
Extracto sódico	28,000	85.24	c
Extracto sódico	24,000	83.76	c
Extracto sódico	20,000	71.50	d
Tiabendazol	1,000	71.04	d
Extracto sódico	16,000	51.14	e
Extracto sódico	12,000	39.74	f
Extracto sódico	8,000	28.80	g
Extracto sódico	4,000	19.82	h
Extracto sódico	2,000	8.96	i
Extracto sódico	1,000	5.52	ij
Testigo absoluto	—	0	j

\* Nivel de significancia = 0.01; DMS= 5.8739

Es importante destacar que los tratamientos antes mencionados presentan mejor actividad que el tiabendazol a 1,000 ppm. aunque no así en comparación con el tratamiento químico número uno (Mancozeb a 2,000 ppm). Los tratamientos a partir de 16,000 ppm solo inhibieron parcialmente el desarrollo micelial del patógeno, por lo que se ubicaron estadísticamente por debajo de todos los tratamientos anteriores.

Considerando los resultados antes mencionados y mostrados en el cuadro 10, se debe señalar que para lograr la inhibición del patógeno mediante la utilización del extracto sódico de resina de gobernadora, se requieren altas concentraciones (32,000 ppm), no así con los extractos metanólico y etanólico, ya que con estos se necesitan menores concentraciones para observar un mejor efecto antifúngico, lo que pone de manifiesto que estos dos últimos productos son mejores por el grado de eficacia demostrado para inhibir el crecimiento micelial

del hongo, habiendo una mayor eficiencia con el extracto etanólico. Resultados similares a los obtenidos en este estudio fueron reportados por Velásquez (1981), quien señala que el extracto que mejor efecto inhibitorio manifestó *in vitro* sobre *Cytosporina* sp. fue el etanólico en comparación con los extractos metanólico, sódico y clorofórmico.

### Efecto de las mezclas Quitosan-Larrea (Extracto metanólico)

Con base en los resultados obtenidos respecto a este bioensayo es importante señalar que los tratamientos correspondientes a las mezclas quitosan-Larrea, con extracto metanólico y que mayor efecto manifestaron, al inhibir eficazmente en un 100 % el crecimiento micelial de *B. cinerea* fueron los tratamientos que corresponden a las concentraciones 500/2,000, hasta 2,000/4,000 ppm (Cuadro 11) El tratamiento químico con mancozeb a 2,000 ppm, resultó ser estadísticamente igual que los tratamientos antes mencionados, ya que logró inhibir en igual proporción al hongo. No así el tratamiento con tiabendazol a 1,000 ppm, ya que este inhibió al hongo en un 71.04 %, comportándose estadísticamente igual que el tratamiento correspondiente a la concentración de 500/1,000 con 70.46 % de inhibición.

Cuadro 11. Comparación de medias del porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* Pers. sometido a diferentes mezclas quitosan-Larrea tridentata (Extracto metanólico).

Tratamientos	concentración (ppm)	Inhibición micelial (%)	
Quitosan-Larrea	500/2,000	100.00	a*
Quitosan-Larrea	500/4,000	100.00	a
Quitosan-Larrea	1,000/2,000	100.00	a
Quitosan-Larrea	1,000/4,000	100.00	a
Quitosan-Larrea	2,000/2,000	100.00	a
Quitosan-Larrea	2,000/4,000	100.00	a
Mancozeb	2,000	100.00	a
Tiabendazol	1,000	71.04	b
Quitosan-Larrea	500/1,000	70.46	b
Quitosan-Larrea	500/500	57.68	c
Testigo absoluto	—	0	d

\*Nivel de significancia = 0.01; DMS= 2.5194

## Efecto de las mezclas Quitosan-*Larrea* (Extracto etanólico)

Con respecto a los resultados obtenidos con los tratamientos evaluados en este bioensayo, los tratamientos de las mezclas quitosan-*Larrea* que mayor efecto manifestaron sobre la inhibición en el crecimiento micelial de *B. cinerea* con un 100 %, fueron los tratamientos correspondientes a las concentraciones 500/2,000 a 2,000/4,000, su efecto fue estadísticamente igual que el obtenido con el mancozeb a 2,000 ppm, (Cuadro 12).

Con respecto a los resultados obtenidos con las concentraciones inferiores se tiene un inhibición máxima de 77.96 % en el crecimiento del patógeno, el tiabendazol a 1,000 ppm inhibió solo 71.04 % el crecimiento de *B. cinerea* (Cuadro 12). De igual manera que en el bioensayo anterior todos los tratamientos usados manifestaron un efecto inhibidor superior al 50 %.

Cuadro 12. Comparación de medias del porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* Pers. sometido a diferentes mezclas quitosan-*Larrea tridentata* (Extracto etanólico).

Tratamiento	Concentración (ppm)	Inhibición micelial (%)	
Quitosan- <i>Larrea</i>	500/2,000	100.00	a*
Quitosan- <i>Larrea</i>	500/4,000	100.00	a
Quitosan- <i>Larrea</i>	1,000/2,000	100.00	a
Quitosan- <i>Larrea</i>	1,000/4,000	100.00	a
Quitosan- <i>Larrea</i>	2,000/2,000	100.00	a
Quitosan- <i>Larrea</i>	2,000/4,000	100.00	a
Mancozeb	2,000	100.00	a
Quitosan- <i>Larrea</i>	500/1,000	77.96	b
Tiabendazol	1,000	71.04	c
Quitosan- <i>Larrea</i>	500/500	65.22	d
Testigo absoluto	—	0	e

\* Nivel de significancia = 0.01; DMS= 2.7701

## Efecto de las mezclas Quitosan-Larrea (Extracto sódico)

En cuanto a los tratamientos utilizados de las formulaciones quitosan-Larrea extraído con hidróxido de sodio, es importante señalar que los que mejores resultados en la inhibición de *B. cinerea* se tuvieron con los tratamientos que corresponden a las mezclas de 500/28,000 a 2,000/32,000 ppm muestran inhibiciones que van de 80.28 a 86.32 %, aunque se ubican por debajo del mancozeb a 2,000 ppm con diferente significancia (Cuadro 13); sin embargo, el efecto inhibitorio fue al del tiabendazol. De igual manera a lo encontrado en los bioensayos cinco y seis, todas las formulaciones empleadas mostraron un efecto inhibitorio superior al 50 % (Cuadro 13).

Cuadro 13. Comparación de medias del porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* Pers. sometido a diferentes mezclas de quitosan-Larrea (Extracto sódico).

Tratamiento	Concentración (ppm)	Inhibición micelial (%)
Mancozeb	2,000	100.00 a*
Quitosan-Larrea	2,000/32,000	86.32 b
Quitosan-Larrea	2,000/28,000	85.78 bc
Quitosan-Larrea	1,000/32,000	85.04 bc
Quitosan-Larrea	1,000/28,000	83.14 bcd
Quitosan-Larrea	500/32,000	82.38 cd
Quitosan-Larrea	500/28,000	80.28 d
Tiabendazol	1,000	71.04 e
Testigo absoluto	—	0 f

\* Nivel de significancia = 0.01; DMS= 3.8997

## Efecto Sinergista de las Mezclas Quitosan-Larrea

### Extracto metanólico

Referente a las mezclas utilizadas en este bioensayo, los resultados de acuerdo con la ecuación de Limpel muestran un efecto sinergista a partir de las concentraciones de 500/2,000

ppm, donde el efecto esperado entre los productos fue menor al efecto observado resultado de la mezcla, tal como se aprecia en el cuadro 14 y se remarca en la columna de proporción de sinergismo o antagonismo entre los productos. El mismo efecto inhibitorio se logra con las demás mezclas que mostraron el mismo efecto de total inhibición. Las mezclas entre estos bioproductos pero a concentraciones inferiores muestran un efecto antagónico debido a que el efecto esperado fue mayor a lo observado.

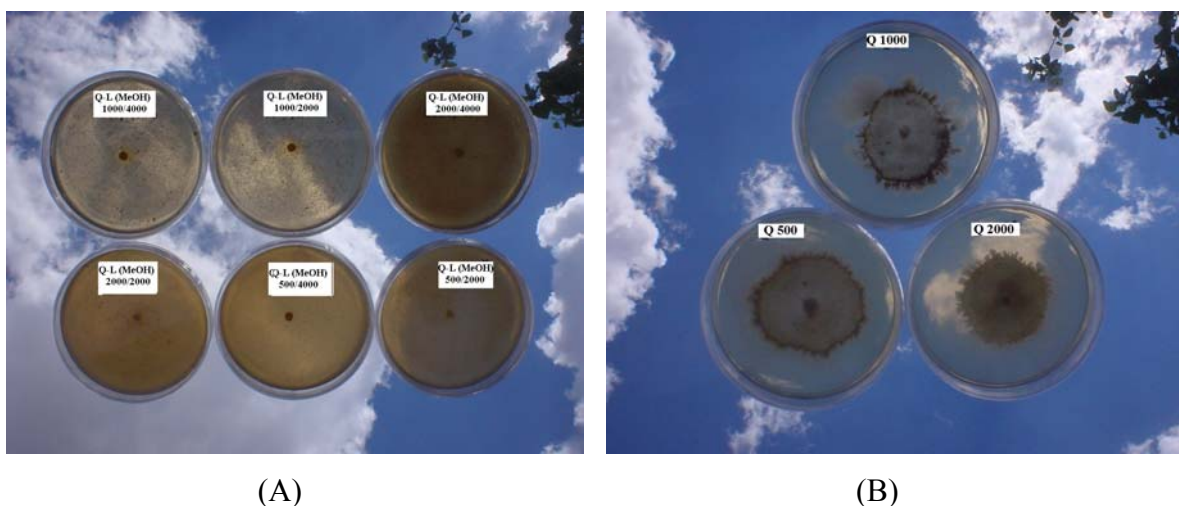


Figura 5. Efecto de las mezclas quitosan-Larrea (extracto metanólico) en la inhibición total (A) del crecimiento micelial de *B. cinerea* y efecto de tres concentraciones de quitosan en el crecimiento parcial (B) de este hongo.

### Extracto etanólico

Respecto al efecto de las mezclas entre el quitosan y el extracto etanólico de gobernadora, en este bioensayo podemos observar un ligero efecto sinergista a partir de las concentraciones de 500/2,000 tal como se aprecia en el cuadro 14 y se recalca con la columna de proporción de sinergia o antagonismo. El mismo efecto se logra con las demás formulaciones que demuestran el mismo porcentaje de inhibición, mientras que a concentraciones inferiores no inhibe lo esperado y se observa un efecto antagónico.

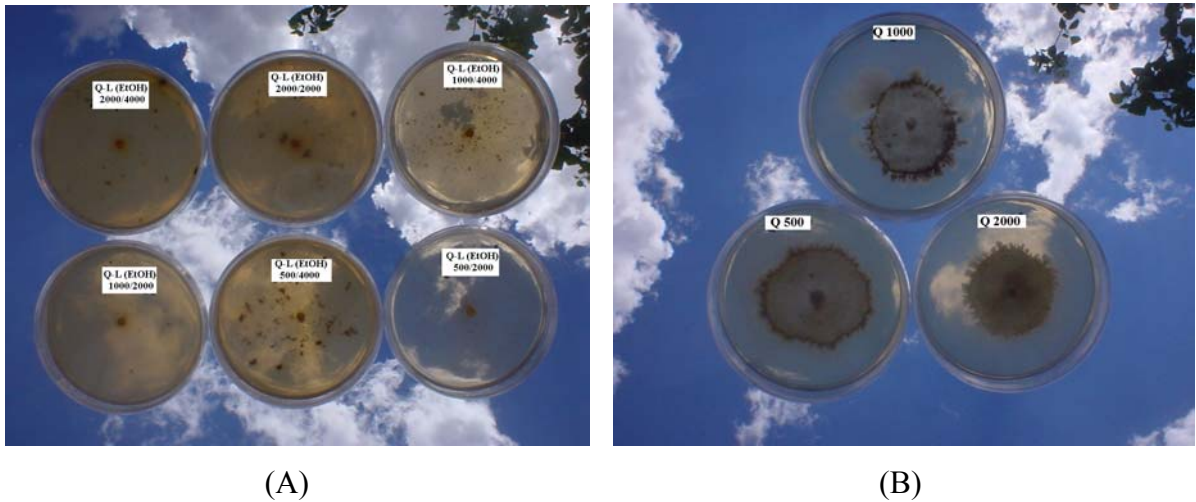


Figura 6. Efecto de las mezclas quitosan-Larrea (extracto etanólico) en la inhibición total (A) del crecimiento micelial de *B. cinerea* y efecto de tres concentraciones de quitosan en el crecimiento parcial (B) de este hongo.

### Extracto sódico

Para el caso de las mezclas entre el quitosan y el extracto sódico de *L. tridentata* no se encontró un efecto sinergista entre estos, por el contrario lo que se observó fue un efecto antagónico entre estos porque el efecto esperado de cada tratamiento analizado fue superior al efecto observado de los dos productos juntos tal como se aprecia en el cuadro 14.

De acuerdo con los resultados mencionados anteriormente es preferible la no-realización de mezclas entre estos bioproductos, ya que el efecto potencial resultante entre estos es mínimo (con extractos metanólico y etanólico) o nulo (para el caso del extracto sódico) por lo que es más recomendable trabajar a ambos productos por separado, en la aplicación contra este patógeno.

Cuadro 14. Efecto de las mezclas quitosan-*Larrea* en la inhibición del crecimiento micelial, en el efecto esperado y en la proporción de sinergismo o antagonismo de ambos bioproductos en *Botrytis cinerea* Pers.

Mezcla	Concentración (ppm)	Inhibición (%)		Efecto Esperado (%)	Inhibición de la mezcla (%)	Proporción de sinergismo o antagonismo
		Quitosan	Extracto			
Quitosan + Extracto metanólico	500/500	56.7	19.0	64.9	57.8	0.9
	500/1,000	56.7	37.4	72.8	70.5	0.9
	500/2,000	56.7	41.1	74.4	100	1.3
	500/4,000	56.7	48.5	77.7	100	1.3
	1,000/2,000	61.0	41.1	77.0	100	1.3
	1,000/4,000	61.0	48.5	79.9	100	1.2
	2,000/2,000	65.5	41.1	79.6	100	1.2
	2,000/4,000	65.5	48.5	82.6	100	1.2
-----						
Quitosan + Extracto etanólico	500/500	56.7	24.4	67.2	65.2	0.9
	500/1,000	56.7	80.9	91.7	77.9	0.8
	500/2,000	56.7	81.4	91.9	100	1.0
	500/4,000	56.7	90.4	95.8	100	1.0
	1,000/2,000	61.0	81.4	92.7	100	1.0
	1,000/4,000	61.0	90.4	96.2	100	1.0
	2,000/2,000	65.5	81.4	93.5	100	1.0
	2,000/4,000	65.5	90.4	96.6	100	1.0
-----						
Quitosan + Extracto sódico	500/28,000	56.7	85.4	93.6	80.3	0.8
	500/32,000	56.7	93.8	97.3	82.4	0.8
	1,000/28,000	61.0	85.4	94.3	83.2	0.8
	1,000/32,000	61.0	93.8	97.5	85.1	0.8
	2,000/28,000	65.5	85.4	94.9	85.9	0.9
	2,000/32,000	65.5	93.8	97.8	86.4	0.8

\*Datos obtenidos del cuadro 10 (apéndice)

### Efecto del Acido Nordihidroguaiarético

En este bioensayo, los resultados obtenidos indican que el mejor tratamiento fue el mancozeb a 2,000 ppm el que reportó 100 % de inhibición (Cuadro 15), seguido de las concentraciones de 8,000 y 4,000 ppm del NDGA con una inhibición de 73.06 y 69.14 % respectivamente el tiabendazol a 1,000 ppm reportó inhibir al hongo en 71.04% sobre *B.*

*cinerea*, estos tres últimos tratamientos fueron estadísticamente iguales entre sí. Lo anterior pone de manifiesto que el principal ingrediente activo (NDGA) de los extractos de resina de gobernadora si posee un efecto antifúngico como se ha reportado anteriormente en la literatura, pero lo anterior implica que en los extractos de *L. tridentata* existen otros compuestos que potencian el efecto antifúngico.

Cuadro 15. Comparación de medias del porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* Pers. sometido a diferentes concentraciones de ácido nordihidroguaiarético (NDGA).

Tratamiento número	Concentración (ppm)	Inhibición micelial (%)	
Mancozeb	2,000	100.00	a*
NDGA	8,000	73.06	b
Tiabendazol	1,000	71.04	b
NDGA	4,000	69.14	b
NDGA	2,000	47.38	c
NDGA	1,000	38.68	d
Testigo absoluto	—	0	e

\*Nivel de significancia= 0.01; DMS= 5.6469

### Efecto de Quitosan de Elevado Peso Molecular

Los resultados obtenidos en este bioensayo muestran que los tratamientos que mayor efecto manifestaron al inhibir eficazmente el 100 % el crecimiento micelial de *B. cinerea* fueron las concentraciones de 2,000 y 4,000 ppm de quitosan (Cuadro 16), los que resultaron ser estadísticamente iguales que el mancozeb, ya que lograron inhibir al hongo en la misma proporción, el tiabendazol a la concentración usada muestra menor eficiencia en la inhibición del hongo.



Cuadro 16. Comparación de medias del porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* Pers. sometido a diferentes concentraciones de quitosan de elevado peso molecular.

Tratamiento	Concentración (ppm)	Inhibición micelial (%)	
Quitosan	2,000	100.00	a*
Quitosan	4,000	100.00	a
Mancozeb	2,000	100.00	a
Tiabendazol	1,000	71.04	b
Quitosan	1,000	32.8	c
Testigo absoluto	—	0	d

\* Nivel de significancia = 0.01; DMS = 3.4980

Contrastando los dos tipos de quitosan evaluados en este estudio, de alto y bajo peso molecular, se observa en el cuadro 17 que hubo una marcada diferencia en relación con la efectividad biológica sobre la inhibición del patógeno; así, el quitosan de bajo peso molecular necesitó de una concentración de 12,000 ppm, por el contrario, para inhibir el 100 % de este patógeno pero con las concentraciones de quitosan de elevado peso molecular se necesitó de solo 2,000 ppm, lo que marca una gran diferencia de efectividad entre los dos tipos de quitosan utilizados; con estos resultados se puede inferir que con quitosan de elevado peso molecular si se utilizara para aplicar directamente en el campo o formulado con otro producto se requeriría de una menor cantidad para cubrir la misma superficie cultivada en comparación que lo que se requeriría con el quitosan de bajo peso molecular.

Cuadro 17. Comparación de la actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea* Pers. de soluciones de quitosan de diferentes pesos moleculares.

Concentración (ppm)	Inhibición (%)	
	Quitosan BPM*	Quitosan EPM**
1,000	61	32.8
2,000	65.5	100
4,000	76.6	100
8,000	78.7	
10,000	90.4	
12,000	100	

\*BPM Bajo peso molecular; \*\*EPM Elevado peso molecular

Recientes reportes de la literatura consignan que las soluciones de quitosan con diferentes pesos moleculares tienen diferentes efectos benéficos en el crecimiento de plantas y contra patógenos que afectan a humanos y cultivos. Al respecto No *et al.* (2002) citan que la actividad antibacterial de 6 soluciones de quitosan y 6 oligómeros de quitosan con diferentes pesos moleculares, contra bacterias que afectan a los humanos como: *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogens* y *Staphylococcus aureus*, sin embargo, no se pudo detectar una clara tendencia del efecto del peso molecular de este biopolímero, debido a aspectos de gram positiva o gram-negativa.

Por otro lado, resultados obtenidos con plantas de soya indican, que en comparación con el testigo, los tratamientos con quitosan incrementaron en 20 % el peso de los germinados de soya y en 14 % el contenido de vitamina C (No *et al.* 2003). Encontrando de que las soluciones de quitosan de elevado peso molecular fueron las más eficaces para incrementar el rendimiento y la calidad de los germinados de soya.

## **Concentración Inhibtriz 50**

Mediante la utilización del sistema de análisis probit computarizado, se analizaron los resultados con el cual se obtuvieron los valores correspondientes a la concentración inhibtriz media (CI<sub>50</sub>), límites fiduciales, concentración inhibtriz noventa (CI<sub>90</sub>) y ecuaciones de predicción, reportados en este estudio con los que también se discuten las diferencias sobre la eficacia de los bioproductos en la inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea*.

En el cuadro 18 se aprecian a los diferentes productos, así como la concentración expresada en partes por millón (ppm), que se necesita de cada uno de ellos para la CI<sub>50</sub> del hongo. El producto quitosan es el que destaca por requerir la menor concentración para inhibir el crecimiento micelial del patógeno. Por otro lado, dentro del grupo de los diferentes extractos de *L. tridentata* usados en este estudio, el producto que requiere la menor concentración para inhibir significativamente a *B. cinerea* es el extracto etanólico a una

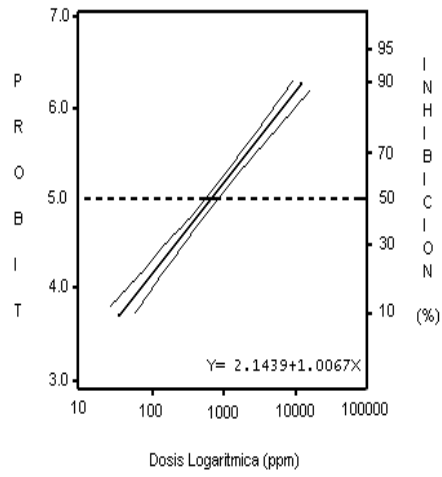
concentración de 884.33 ppm. Es importante hacer notar que estos dos compuestos mantienen un traslape considerable entre sus límites fiduciales, por lo que estadísticamente son iguales entre sí en cuanto a la  $CI_{50}$  del hongo se refiere.

Cuadro 18. Valores de las concentraciones inhibitorias ( $CI_{50}$  y  $CI_{90}$ ), límites fiduciales y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de los diferentes productos utilizados contra *Botrytis cinerea* Pers.

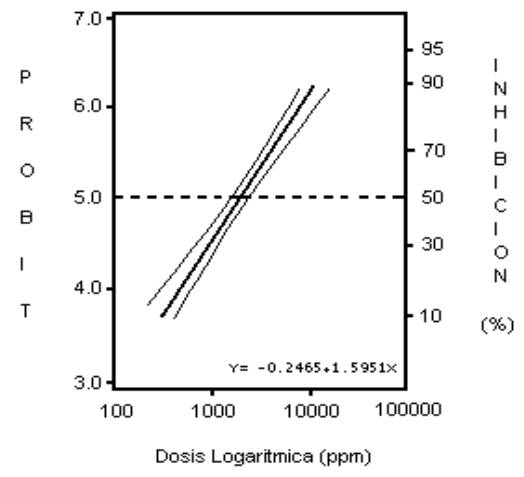
Productos	Dosis inhibitorias (ppm)				$r^2$
	Límites fiduciales (95%)				
	$CI_{50}$	Inferior	Superior	$CI_{90}$	
Quitosan	686.91	541.06	858.52	12877.86	0.88
Larrea (MEOH)	1945.69	1630.20	2314.70	12373.25	0.99
Larrea (ETOH)	884.33	749.75	1040.77	3663.68	0.96
Larrea (NaOH)	9522.47	8401.14	10725.89	40364.21	0.99
NDGA	1897.71	1306.97	4787.14	28804.34	0.94

En el mismo grupo de los extractos de *Larrea*, el segundo en requerir una baja concentración es el extracto metanólico, aunque al compararlo con el ácido nordihidroguaiarético se observó que este último requiere un poco menos de concentración para inhibir de igual forma la media de crecimiento del hongo, aunque por el traslape de sus límites fiduciales se puede decir que estos dos productos son estadísticamente iguales.

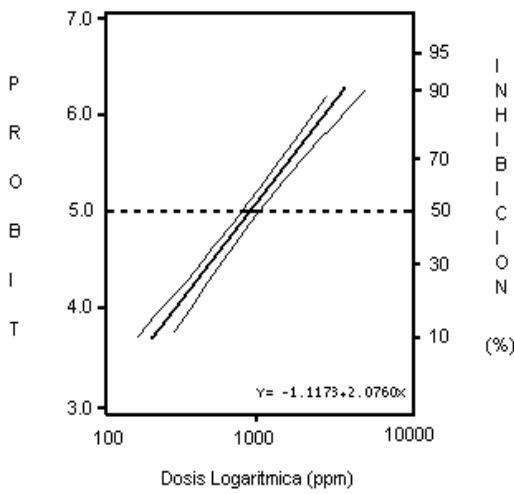
El producto que fue menos eficaz ya que requirió la mayor concentración para inhibir el crecimiento medio del hongo, fue el extracto larreico a base de hidróxido de sodio, debido a que requirió usarse una concentración de 9,522.47 ppm para obtener la  $CI_{50}$  (Cuadro 18), por lo tanto, se requirió de este extracto once veces más de concentración en comparación con el extracto etanólico. Las líneas de respuesta concentración inhibición de los diferentes productos, se muestran en la figura 7.



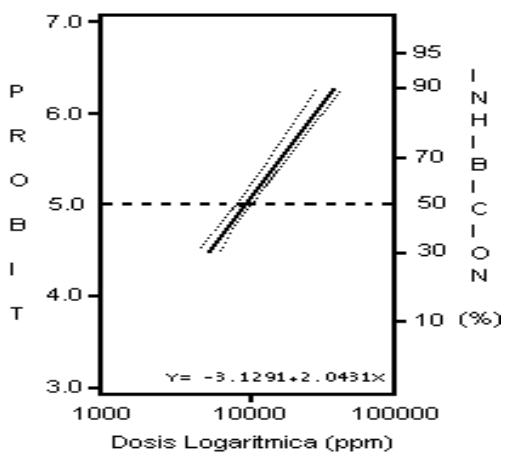
(A)



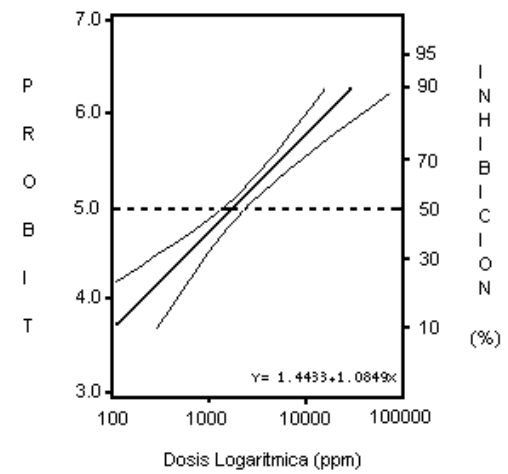
(B)



(C)



(D)



(E)

Figura 7. Líneas de respuesta concentración inhibición sobre *Botrytis cinerea* de: A) quitosán, tres extractos de *Larrea tridentata*: B) metanólico, C) etanólico, D) sódico y E) NDGA.

Por otra parte, si se analiza la columna de la  $CI_{90}$  que se presenta del Cuadro 18, se observa que los resultados se modifican casi totalmente a excepción del producto que corresponde a *Larrea* con extracto sódico, el cual se ubica en el mismo lugar, es decir, sigue siendo el producto que requiere una mayor concentración para lograr la inhibición media de crecimiento micelial del patógeno. En esta misma columna también se puede apreciar que el producto que requiere la menor concentración para lograr la  $CI_{90}$  es el extracto etanólico de *L. tridentata* con una concentración de 3,663.68 ppm con resultados mejores a este nivel que el quitosan, el que ahora se ubica en un segundo grupo junto con el extracto metanólico de *L. tridentata*, ya que se requirieron 12,373.25 y 12,877.86 ppm para lograr obtener la  $CI_{90}$ , los que resultan ser estadísticamente iguales, ya que sus límites fiduciales presentan un traslape entre ellos.

Por su parte, el NDGA requiere una concentración de 28,804 ppm. El producto que requiere una concentración para inhibir al hongo a este porcentaje es el extracto sódico de gobernadora, siendo su concentración requerida casi ocho veces mayor que la resultante para el extracto etanólico, que resultó ser el mejor en estos bioensayos.

Las diferencias observadas entre las  $CI_{50}$  y  $CI_{90}$  se deben a la posición de la línea de respuesta concentración inhibición de tal manera que la del extracto etanólico de *L. tridentata* presenta una posición más vertical, por lo tanto esto implica que es más eficiente por requerir la menor concentración de producto para inhibir al hongo (Figura 7).

## CONCLUSIONES

La inhibición micelial total de *B. cinerea* con el quitosan se logra con 12,000 ppm. Los mejores extractos de *L. tridentata* fueron el metanólico y etanólico al inhibir por completo con 8,000 ppm. El NDGA puro pierde efecto al inhibir con la concentración anterior solo el 73 %.

El quitosan de elevado peso molecular resultó ser mejor al inhibir con 2,000 ppm en 100 %.

Los mejores extractos de *L. tridentata* en las mezclas con quitosan, fueron el metanólico y etanólico a partir de concentraciones 500/2,000. Con el extracto metanólico se observó un efecto de sinergia, con el etanólico un ligero efecto sinergista mientras que con el sódico se tuvo un efecto antagónico. Por lo anterior no se recomiendan mezclas.

Los mejores productos para obtener la concentración inhibitriz 50 (CI<sub>50</sub>) sobre *B. cinerea* fueron el quitosan y el extracto etanólico, mientras que para la CI<sub>90</sub> fue solo el extracto etanólico

## LITERATURA CITADA

- Abbott, 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-267.
- Acosta, R. M., Nieto, A. D., Téliz, O. D., Noriega, C. D., Guzmán, R. Ma. del P., Vaquera, H. H. 2003. *In vitro* chemical control of six *Colletotrichum gloeosporioides* isolates of mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden. Pan American Plant Disease Conference. April 5-10. South Padre Island, Texas, USA. P 93.
- Agrios, N. G. 2001. *Fitopatología*. Editorial Limusa. Segunda edición. México, DF. 838 p.
- Alexopoulos, C. J., C. W. Mims and M. Blackwell. 1979. *Introductory Micology*. John Wiley Sons, Inc. Fourth Edition. New York, USA. 865 p.
- AMIPFAC (Asociación Mexicana de la Industria de Plaguicidas y Fertilizantes A.C.) 1993. Los Plaguicidas en México. Pp 29-31.
- Arauz, 1992. Elementos básicos de Patología Postcosecha de frutas y hortalizas. Memorias de la I Reunión Latinoamericana de Tecnología Postcosecha. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F. 225 p.
- Balvantín, G. G. F. 2001. Extractos hidrosolubles de *Larrea tridentata* y su efecto inhibitorio en el crecimiento *in vitro* del hongo *Pythium* sp. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México. 59 p.
- Barbour, M. G. Age and space distribution of the desert shrub *Larrea divaricata* *Ecology* 50: 679-685.
- Barbour, M. G., Cunningham, G., Oechel, W. O., and Bamberg, S.A. 1997. Growth and development, form and function. In: T. J. Mabry, J.H. Hunziker, D.R. Jr. DiFeo (eds.) *Creosote Bush Bush-Biology and Chemistry of Larrea in New World Deserts*. US/IBP Synthesis Series 6. Dowden, Hutchinson & Ross Inc., Stroudsburg, PA, USA. Pp 48-91.
- Barnes, S.E. y M.W. Shaw. 2002. *Plant Pathology* 51, 746-754.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Third edition. Burgess publishing company. Minneapolis, Minnesota. 241 p.
- Bautista, B. S., Montes, B. R. y Evangelista, L. S. 1998. Inhibición del desarrollo micelial y esporulación de *Pestalotia* sp. Mediante el uso de extractos vegetales. Memorias del XXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología Guanajuato, Guanajuato, México. P 23.

- Bautista, B. S., Hernández, L. M. Bosquez, M. E., Wilson, L. C. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloesporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection*. 22: 1087-1092.
- Belmares, H., Barrera, A., Ramos de V. L. F., Castillo, E., and Motomochi, V. 1979. Research and development of *L. tridentata* as a source of raw materials. pp. 247-276. In: E. Campos, T.J. Mabry, and T.S. Fernández (eds.). LARREA. Serie El Desierto CIQA, Saltillo, Coahuila, México. 411 p.
- Behamou, N., Lafontaine, P. J., and Nicole M. 1994. Induction of Systemic Resistance to Fusarium Crown and Root Rot in Tomato Plants by seed Treatment with Chitosan. *Biochemistry and Cell Biology*. 84: 1432-1444.
- Bergeron, C., Marston, A., Hakizamungu, E., and Hostettmann, K. 1995. Antifungal Constituents of *Chenopodium procerum*. *International Journal of Pharmacognosy* 33: 115-119.
- Brinker, F. 1993. *Larrea tridentata* (D.C.) Coville (Chaparral or Creosote Bush). *British Journal of Phytotherapy*. 3: 10-30.
- Camacho. C. O. 1990. PC PROBIT. Centro de estadística y cálculo. Colegio de Postgraduados. México.
- Cho, Y-W., Jang, J. Rae-Park, C., and Ko, S-W. 2000. Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins. *Biomacromolecules*. 1 (4): 609-614.
- Clark, D. 1999. Treating Herpes Naturally with *Larrea tridentata* Published by U.S. Botanicals. Tempe, Arizona, USA. 42 p.
- Coyle, J., and Roberts, N. C. 1975. A field guide to the common and interesting plant of Baja California. Natural History Publisher Company. La Joya, Baja California, USA. 43 p.
- Cruz, O, J., Montoya, A. S., Estrada, R. F. y Castro, C. J. M. 1999. Extractos vegetales para el control de vectores de enfermedades virales en calabacita en Culiacán, Sinaloa. Memorias del XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología y X Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Guadalajara, Jalisco, México. P 306.
- Cuero, R. G., Osuji, G. and Washington, A. 1991. N-Carboxymethyl chitosan inhibition of aflatoxin production: Role of zinc. *Biotechnology Letters*. 13: 441-444.
- Deacon J. W. 1988. Introducción a la micología moderna. Editorial Limusa Primera edición, México, DF. 350 p.
- Deans, S. G., and Svoboda, K. P. 1990. The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.). *Flavour Fragrance Journal* 5: 187-190.



- De Candolle, A., Javalera, R. y Campos, B. G. 1997. Evaluación de extractos vegetales para el control de la cenicilla *Erysiphe cichoracearum*. Memorias del XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Cd. Obregón Sonora, México. P 46.
- Diplez A., Marchez, F., Fortini, D. and Y. Brygoo. 1995. Boty a long terminal repeat retroelement in the Phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* Appl. Environ. Microbiol. Washington. American Society of Microbiology. 61 (1): 103-108.
- Doss R. P., Potter S. W., Chastanger G. A. and Christian J. K. 1993. Adhesion of nongerminated *Botrytis cinerea* conidia to several substrata. Appl. Environ. Microbiol. Washington: American Society for Microbiology. 59 (6): 1786-1791.
- Downum, K. R., Dole, J., and Rodriguez, E. 1988. Nordihydroguaiaretic acid: inter-and intrapopulational variation in the Sonoran Desert creosote bush (*Larrea tridentata*, Zygophyllaceae). Biochemical Systematics and Ecology 16: 551-555.
- Duisberg, P. C. 1952. Development of a feed from the creosote bush and the determination of its nutritive value. Journal of Animal Science. 11: 174-180.
- Duke, S., S. R. Baerson, F.E. Dayan and A. Rimando. 2003. United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service research on natural products for pest management. Pest Management Science. 59: 708-717.
- Dzul-Erosa, M. S., Saucedo-Medina, T. I., Navarro-Mendoza, R., Avila-Rodríguez, M. y Guibal, E. 2001. Cadmium sorption on chitosan derivatives, Hydrometallurgy. 61 (3), 157-167.
- El Ghaout, A., Arul, J., Wilson C, and N. Benhamou. 1994. Ultrastructural and cytochemical aspects of the effect of chitosan on decay of bell papper fruit. Physiol. Mol. Plant. Pathol. 44 (6): 417-432.
- FAO. 1990. Plagas de las Hortalizas. 1ra. Edición. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile.
- Fernández, S., Hurtado, L. M., and Hernández, F. 1979. Fungicidal components of creosote bush resin. In: Advances in Pesticide Science (ed. H. Geissbühler). Pergamon Press Oxford and New York. Pp. 351-355.
- Ferreira, M.; Debbaudt, A.; Agullo, E. 2000. Estudio experimental de la absorción de Pb (II) y Hg (II) en pectina y chitosan. Memorias del Congreso de Quitina y Quitosan. Cuba.
- Finney, D. J. 1971. Probit analysis. *Third edition*. Cambridge at the University Press. Pp 283-287.
- Frayre, S. L., Domínguez, A. A. D., García, A. B. y Sánchez, H. H. A. 1996a. Evaluación de extractos vegetales para el control de la mancha negra *Phytophthora* sp., en el cultivo del pepino. Memorias del IX Reunión Científica-Tecnológica Forestal y Agropecuaria; INIFAP-Produce, publicación especial No. 9. Villa Hermosa, Tab, México. P 61.

- Frayre, S. L., García, A. B., Sánchez, H. H. A. y Domínguez, A. A. D. 1996b. Evaluación de extractos vegetales para el control de la cenicilla vellosa (*Pseudoperonospora cubensis*). Memorias del IX Reunión Científica-Tecnológica Forestal y Agropecuaria; INIFAP-Produce, Publicación especial No. 9. Villa Hermosa, Tab, México. P 68.
- Funt, R. C., M.A. Ellis, and C. Welty. 1997. Midwest small fruit pest management handbook, Bulletin 861. The Ohio State University.  
[Http://www.ag.ohio-state.edu/~ohioline/b861g.html](http://www.ag.ohio-state.edu/~ohioline/b861g.html)
- Gamboa-Alvarado R., Hernández, F. D., Guerrero, E., Sánchez, A., Villarreal, L. A., López, R. G., Jiménez, F., and Lira-Saldivar, R. H. 2003. Antifungal effect of *Larrea tridentata* extracts on *Rhizoctonia solani* Kühn and *Phytophthora infestans* Mont. (De Bary). **PHYTON**-International Journal of Experimental Botany. 119-126.
- Giblin, Davis R, M., Mundo-Ocampo M., Baldwin J. G., Norden B. B. and SWT Batra. 1993. Description of *Bursaphelenchus abruptus* n. sp. (Nemata: Aphelenchoidea) an associate of a digger bee. J. Nematol. Lakeland Fla: Society of Nematologist. 25 (2): 161-172.
- Gisvold, O. 1948. A preliminary survey of the occurrence of nordihydroguaiaretic acid in *Larrea divaricata*. Journal of the American Pharmacology Association. 37: 194-196.
- Gnabre, J. N., Brady, J. L., and Clanton D. J. 1995. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 transcription and replication by DDA sequence-selective plant lignan. Proceedings of the National Academy of Science of the USA. 92: 11239-11246.
- González-Coloma, A., Wisdom, Ch. S., and Rundel; P. W. 1988. Ozone impact on the antioxidant nordihydroguaiaretic acid content in the external leaf resin of *Larrea tridentata*. Biochemical Systematics and Ecology. 16: 59-64.
- González-Coloma, A., Wisdom, C. S., Sharifi, M. R., and Rundell, P.W. 1994. Water and nitrogen manipulations of the desert shrub *Larrea divaricata* subsp. *tridentata* (Zygophyllaceae). Journal of Arid Environment. 28: 139-146.
- González, S. F. A. y Guevara, M. M. M. 1990. Determinación de la persistencia de la actividad bactericida de la resina de *Larrea tridentata* sobre *Pseudomonas solanacearum* en laboratorio e invernadero. Memorias del XVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Culiacán Sinaloa México. P 107.
- Greenfield, M. D., Shelly, T. E., and Downum, K. R. 1987. Variations in host-plant quality implications for territoriality in a desert grasshopper. Ecology 68: 828-838.
- Hammer, P. E. and K. B. Evensen. 1994. Differences between rose cultivars in susceptibility to infections by *Botrytis cinerea*. Phytopatology 84: 1305-1312.
- Hansen H. y R. E. Smith. 1932. Analysis of variation in *Botrytis cinerea* by single spore. culture Phytopatology. 22: 11.

- Henz, G. P. 1992. Patología postcosecha de hortalizas. Memorias de la I Reunión Latinoamericana de Tecnología Postcosecha. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F. 225 p.
- Heras, A., Rodríguez, N. M., Ramos, V. M., Argulló, E. 2001. N-methylene. Phosponic chitosan: a novel soluble derivative. Carbohydrate Polymers. 44: 1-8.
- Hirano, S. 1997. Chitin handbook, ed. R. A. A. Muzzarelli, M. G. Peter. Atec, Grottammare, Italia. Pp 71-75.
- Hirano, S. 1999. Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. J. Polim Int., 48: 732-734.
- Hudson, H. T. 1968. The ecology of fungi on plant remains above the soil. New Phytopathology. 67: 837-874.
- Insunza, B. V., and Valenzuela, A. A. 1995. Control of *Ditylenchus dipsaci* on garlic (*Allium sativum*) with extracts of medicinal plants from Chile. Nematropica 25: 35-41.
- Jainar, J.N. 1981. Foliage plant production. Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs. New Jersey USA. 614 p.
- Janzen, D. H., Juster, H. B. and Bell, E. A. 1977. Toxicity of secondary compounds to the seed-eating larvae of the brunched beetle *Callosobruchus maculatus*. Phytochemistry. 16: 223-227.
- Jarvis, W. R. 1997. Botryotinia and Botrytis species. Hignell Printing Limited. Research Station Harrow. Monograph No. 15 Ottawa, Canada. 195 p.
- Johnson, K. B. and M. L. Powelson. 1983. Influence of prebloom disease establishment by *Botrytis cinerea* and environmental and host factors on grey mold pod rot of snap bean. Plant Disease, 67 (11) 1198-1202.
- Kearney, T. H., and Pebbles, R. H. 1951. Arizona flora. 2nd. ed. University of California Press, Berkeley, California, USA. 61 p.
- Kendra, D. F. and Hadwiger, L. A. 1984. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. Experimental Mycology. 8: 276-281.
- Kenneth, H. R. 1989. Compendium of rose diseases. American Phytopathological Society. USA. 50 p.
- Köhler, E. 1930. Zyr kenntinis der vegetativen anastomosen der pilze. II. Planta (Berl.) 10: 495-522.
- Lara, H. M. E., García, E. R. G., Valdez, A. L. A. y Tlalpal, B. B. 1997. Efecto de la gobernadora sobre patógenos radicales. Avances de la Investigación. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México. Pp. 74-75.

- Limpel, L. E.; Schuldt, P. H.; Lamont, D. *Proc. N. E. Weed Control Conf.* 1962, 16: 48-52.
- Lira-Saldivar, R. H., Gamboa-Alvarado, R., Villarreal-Cárdenas, L. A., López-Campos, R. G., and Jiménez-Díaz, F. 2002. Hydrosoluble extracts of *Larrea tridentata* from two desertic zones in the North of México and their inhibitory effect of *Fusarium oxysporum*. **ΦYTON**-International Journal of Experimental Botany. 2002: 167-172.
- Lira-Saldivar, R. H., M. del R. Sánchez., R. Gamboa, D. Jasso y R. Rodríguez. 2003a. Fungitoxic effect of *Larrea tridentata* resin extracts from the Chihuahuan and Sonoran Mexican deserts on *Alternaria solani*. *Agrochimica*. 47: 54-60.
- Lira-Saldivar, R. H., Balvantín-García, G. F., Hernández-Castillo, F. D., Jasso-Cantú, D., and Díaz-Jiménez, F. 2003b. Evaluation of resin content and the antifungal effect of *Larrea tridentata* (Seese and Moc. Ex DC.) Coville extracts from two Mexican deserts against *Pythium* sp. *Pringsh. Revista Mexicana de Fitopatología*. 21:97-101.
- Lomelí, R. M. G., y Ochoa, R. H. G. 1999. Evaluación fungicida del extracto de mesocarpio de *Coccoloba nucifera* Linn. Memorias del XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología y X Congreso Latinoamericano de Fitopatología, Guadalajara, Jalisco, México. P 10.
- López-Escobar, R. y Sánchez-Arizpe, A. 1988. Evaluación de extractos de crucíferas sobre el crecimiento de *Rhizoctonia solani* Kühn *in vitro*. Memorias del XV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, Xalapa, Veracruz, México. P 107.
- Mabry, T. J., DiFeo, D. R. Jr., Sakakibara, M., Bohnstedt, C. F., and Siegler, D. 1977. Biology and chemistry of *Larrea*. In: T. J. Mabry, J. H. Hunziker, D. R. Jr. DiFeo (eds.). *Creosote Bush Bush-Biology and Chemistry of Larrea in New World Deserts*. US/IBP Synthesis Series 6. Dowden, Hutchinson and Ross Inc., Stroudsburg, PA, USA. Pp. 115-134.
- Mahaffee, 2004. Hay que eliminar el moho gris. *Revista Productores de Hortalizas*. Pp. 24-27.
- Martínez, A. J. y A. O. Del Río. 1975. Principales enfermedades del cultivo de la fresa en Valle de Zamora Mich. México. INIA. Folleto Misc. No. 27. 22 p.
- Mass, J. L. 1984. *Compendium of strawberry diseases*. A. P. S. St. Paul Minnesota. 138 p.
- Maurelia, R., Zamora, R., Merino, M., Guevara, M., Azola, C., Cornejo, P. 2000 Evaluación de la extracción de oxianiones de Mo (VI) en solución con quitosán. Congreso de Quitina y Quitosán, Cuba, Noviembre.
- Mc Clellan W. D. and W. B. Hewitt. 1973. Early Botrytis rot of grapes: time of infection and latency of *Botrytis cinerea* Pers. In *Vitis vinifera* L. *Phytopatology*. 63: 1151-1157.
- Mc Keen, W. E. 1974. Mode of penetration of epidermal cell walls of *Vicia faba* by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. 64: 455.

- Meinzer, F. C., Wisdom, C. S., González-Coloma, A., Rundel, P. W., and Shultz, L. M. 1990. Effects of leaf resin on stomatal behavior and gas exchange of *Larrea tridentata* (D.C.) Cov. *Functional Ecology* 4: 579-584.
- Mendoza, Z. C. y C. B. Pinto. 1985. Principios de fitopatología y enfermedades causadas por hongos. UACH. Chapingo, México. 311 p.
- Mendoza, Z. C. 1991. Diagnóstico de Enfermedades Fungosas. 1ra. Edición. UACH. Chapingo, México. 168 p.
- Mendoza, Z. C. 1993. Enfermedades del rosal en México. Universidad Autónoma Chapingo. Dirección del Patronato Universitario. Texcoco, México. 62 p.
- Mercado, Z. F. J. y Rosado, M. F. J. 1986. Efecto de compuestos orgánicos liberados por *Cyperus rotundus* L. sobre el crecimiento del hongo *Rhizoctonia solani* Kühn. Memorias del XII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. P 55.
- Montes, B. R., Cruz, C. V. y Madrigal, D. P. 1990. Control de la roya del frijol mediante extractos vegetales bajo condiciones de campo en Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca. Memorias del XVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Culiacán, Sinaloa, México. P 104.
- Montes-Belmont, R., Cruz-Cruz, V., Martínez-Martínez, G., Sandoval-García, G., García-Licona, R., Zilch-Domínguez, S., Bravo-Luna, L., Bermúdez-Torres, K., Flores-Moctezuma, H.E. y Carvajal-Moreno, M. 2000. Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18: 125-131.
- No H. K., Na Y. P., Shin H. L. and S. P. Mayers. 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology* 74:65-72.
- No H. K., K. S. Lee, I. D. Kim, M. J. Park and S. D. Kim. 2003. Chitosan treatments effect yield, ascorbic acid content, and hardness of soybean sprouts. *Journal of Food Science* 68:680-685.
- Ortega-Ortiz, H., Benavides-Mendoza, A., Flores-Olivas, A., Ledesma-Pérez, A. 2003. Use of the interpolyelectrolyte complexes of poly (acrylic acid)-chitosan as inductors of tolerance against pathogenic fungi in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. Var. Floradade). *Macromolecular Bioscience*. 3(10): 566-570.
- Paulus, A. O. 1990. Fungal diseases of strawberry. *Hort Science*. 25 (8): 885-889.
- Pfaff, T. 1925. Untersuchungen über das wachstum der appresorien beim *Botrytis cinerea*. *Zentralbl. Bakteriol. Parasten Kd.* 63: 161-173.
- Pfleger, F. L. 1984 a. Exacum affine: Botrytis blight and its control. *Minnesota State Florist's Bulletin, USA*. 33 (6): 5-6.

- Plascencia, J. M., Viniegra, G. G., Lorralde, P., Olayo, G. R., Castillo, M. and Shirai, K. 2000. Effect of chitosan on fungal growth using morphometric evaluation. *Chitin and Chitosan in Life Science*. Edited by Uragami, T., Kurita, K. And Fukamizo, T. Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Chitin and Chitosan Conference and 4<sup>th</sup> Asia Pacific Chitin and Chitosan Symposium. Japan. Pp 256-259.
- Powelson, A. O. 1960. Initiation of strawberry fruit rot caused by *Botrytis cinerea*.; *Phytopathology*. 50: 491-494.
- Qasem, J. R. and Abu-blou H. A. 1996. Fungicidal activity of some common weed extracts against different plant pathogenic fungi. *Journal of Phytopathology*. 144: 157-161.
- Quintero, S. R., Gioanetto, F., Chávez, C. El y Bárcenas, O. D. (eds.). 2001. Curso Taller de Agricultura Orgánica. Universidad Autónoma de Chihuahua. CIDACOM, Chihuahua, Chihuahua. 227 p.
- Rege, R. P. and Block, H. L. (1999). Chitosan processing: influence of process parameters during acidic and alkaline hydrolysis and effect of the processing sequence on the resultant chitosan's properties. *Carbohydrate Research*. 321:235- 245.
- Rhoades, D. F. 1977. The antiherbivore chemistry of *Larrea*. In: T. J. Mabry, J. H. Hunziker, D. R. Jr. DiFeo (eds.). *Creosote bush biology and chemistry of Larrea in new world deserts*. US/IBP Synthesis Series 6. Dowden, Hutchinson and Ross Inc., Stroudsburg, PA, USA. Pp 135-175.
- Richer, D. L. 1987. Synergism: A patent view. *Pestic. Sci.* 19: 309-315.
- Rivera-Castañeda, G., Martínez-Téllez, M. A., Vallejo-Cohen, S., Alvarez-Manzanilla, G., Vargas-Arispuro, I., Moya-Sanz, P., and Primo-Yúfera, E. 2001. *In vitro* inhibition of mycelial growth of *Tilletia indica* by extracts of native plants from Sonora, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 19: 214-217.
- Rodríguez, B. H. R., Torres, E. y Sanabria, G. A. 1999. Actividad e extractos vegetales sobre el crecimiento *in vitro* de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, *Alternaria solani* y *Rhizoctonia solani*. Memorias del XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología y X Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Guadalajara, Jalisco, México. 139.
- Roller, S., and Covill, N. 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology*. 47: 67-77.
- Romanazzi, G. Nigro, F. Hipólito, A. Di Venere, D. and Salerno, M. 2002. Effect of pre and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *Journal of Food Science*. 67: 1862-1867.

- Rundel, P. W., Sharifi, M. R., and González-Coloma, A. 1994. Resource availability and herbivory in *Larrea tridentata*. In: M. Arianoustsov and R. H. Groves (eds.). Plant-Animal Interaction in Mediterranean-Type Ecosystems. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. Pp 105-114.
- Sag, Y.; Aktay Y. 2000. Mass transfer and equilibrium studies for the sorption of chromium ions into chitin. *Process Biochemistry*. 36: 1567-73.
- Sakakibara, M., DiFeo, D. Jr., Nakatani, N., Timmerman, B., and Mabry, T. J. 1976. Flavonoid methyl ethers on the external leaf surface of *Larrea tridentata* and *L. divaricata*. *Phytochemistry*. 15: 727-731.
- Salazar, H. F., García, A. B. y Tlapal, B. B. 1990. Evaluación de residuos de las plantas de gobernadora *Larrea tridentata* y epazote *Chenopodium ambrosioides* L. sobre los hongos *Pythium aphanidermatum* y *Rhizoctonia solani* en frijol *Phaseolus vulgaris* L. Memorias del XVII Congreso Nacional de la Sociedad mexicana de Fitopatología, Culiacán, Sinaloa, México. P. 102.
- Salazar, H. F. J., García, E. R. y Talalpal, B. B. 1990. Efecto de la incorporación de residuos secos de 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. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 9: 102-104.
- San-Lang W. y Isu-Chang W. 1997. Purification and Characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 380-386.
- Savard, T., Beaulieu, C., Boucher, Isabelle., and Champagne C. P. 2002. Antimicrobial action of hydrolyzed chitosan against spoilage yeasts and lactic acid bacteria of fermented vegetables. *Journal of Food Protection*. 65: 828-833.
- Seigler, D. S., Jakupcak, J., and Mabry, T. J. 1974. Wax esters from *Larrea divaricata*. *Phytochemistry*. 13: 983-986.
- Shahidi, F, Arachchi, V. J. K. (1999), Food applications of chitin and chitosans. *Trends in food Science and Technology*. 10: 32-51.
- Shreve, F., and Wiggins, I. L. 1964. *Vegetation and flora of the sonoran desert*. Vol. II. Stanford University Press. Stanford, California, USA. 75 p.
- Singla, A. K. and Chawla, M. 2001. J. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects-an update. *Pharmacy and Pharmacology*. 53: 1047-1067.
- Sirjusingh, C., Sutton, J. C. and J. Tsujita. 1996. Effects of inoculum concentration and host age on infection of geranium by *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*. 80 (2): 154-159.

- Smith, J. M., Dunez, J. M., Lellilott, R. A., Philips, D. H. and S. A. Archer. 1995. Manual de enfermedades de las plantas. Edit. Mundi Prensa. Madrid, España. 545 p.
- Sommer, N. F. 1981. Enfermedades de postcosecha de las frutas. Memorias del seminario sobre manejo y conservación de frutas, hortalizas y flores. FIRA y Banco de México. 56 p.
- Stalman K. P., Pielken P., Schimz K. L. and H. Sahn. 1992. Degradation of extracellular beta-(1,3) (1,6)-D-glucan by *Botrytis cinerea*. Appl. environ. microbial. Washington, D.C. 58 (10): 3347-3354.
- Tatagiba, J. da S. Maffia, L. A. y Barreto, R. 1998. Phytoparasitica. 26 (1): 8-9.
- Tuomi T., Ilvesoksa. J, Laakso. S. and H. Rosenquist. 1993. Interaction of abscisic acid and indole 3 acetic acid producing fungi with *Salix* leaves. J. Plant growt-reg. New York. 12 (3): 149-156.
- Valesi, A. G., Rodríguez, E., Vander-Velde, G., and Mabry, T. J. 1972. Methylated flavonols in *Larrea cuneifolia*. Phytochemistry. 11: 2821-2826.
- Van Davender, T. R. 1990. Late quaternary vegetation and climate of the Chihuahuan desert, United States and México. In: J. L. Betancourt, T. R. Van Davender, and P. S. Martin (eds.). Pack Rat Middens: the Last 40,000 years of Biotic Change. The University of Arizona Press. Tucson, Arizona, USA. Pp. 104-129.
- Vargas-Arispuro, I., Araujo-Bernal, S., Martínez-Téllez, M A. y Ortega-Nieblas M. 1997. Efecto de extractos de plantas sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Revista Mexicana de Fitopatología. 15: 91-95.
- Velásquez, V. R. 1981. Evaluación de la actividad fungicida de la resina de la gobernadora sobre *Eutypa armeniacae* Hans and Carter. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 48 p.
- Verástegui, M. A., Sánchez, C. A., Heredia, N. L., and García Alvarado, J. S. 1996. Antimicrobial activity extracts of three major plants from the Chihuahuan desert. Journal of Ethnopharmacology. 52: 175-177.
- Volpin, H. and Y. Elad. 1991. Influence of calcium nutrition on susceptibility of roseflowers to *Botrytis* blight. Phytopathology. 81 (11): 1390-1394.
- Ware, G. W. The Pesticide Book. Thomson Publications. 3<sup>rd</sup> Edition. P. O. Box 9335. Fresno, CA, USA. 340 p.
- Wisdom, C. S., González-Coloma, A., and Rundel, P. W. 1987. Ecological tannin assays: evaluation of proanthocyanidins, protein binding assays and protein precipitating potential. Oecología, 72: 395-401.
- Zamora, J. M. 1988. Cytotoxic, antimicrobial and phytochemical properties of *Larrea tridentata* Cav. Doctoral dissertation. Auburn University, Auburn, Alabama, USA. 82 p.



- Zhang, D., Quantick, P. C. 1998. Antifungal effects of chitosan coating on fresh strawberries and raspberries during storage. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 73: 763-767.
- Zhang, P. G., and J. C. Sutton. 1994. Effects of wetness duration, temperature and light on infection of black spruce seedlings by *Botrytis cinerea*. *Can. J. for Research*. Ottawa. 24 (4): 707-713.

# **A P E N D I C E**

Análisis de varianza realizados con el programa estadístico de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

Cuadro 1. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial de *Botrytis cinerea* Pers. sometido a diversas concentraciones quitosan.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	14	76924.625000	5494.616211	438.1635	0.000
Error	60	752.406250	12.540104		
Total	74	77677.031250			

C.V. = 5.40 %

Cuadro 2. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial de *Botrytis cinerea* Pers. sometido a diversas concentraciones de extracto metanólico de *Larrea tridentata* (D. C.) Coville

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	11	67686.812500	6153.346680	2050.2258	0.000
Error	48	144.062500	3.001302		
Total	59	67830.875000			

C.V. = 2.68 %

Cuadro 3. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial de *Botrytis cinerea* Pers. sometido a diversas concentraciones de extracto etanólico de *Larrea tridentata* (D. C.) Coville

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	10	70975.625000	7097.562500	1834.6554	0.000
Error	44	170.218750	3.868608		
Total	54	71145.843750			

C.V. = 2.83 %

Cuadro 4. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial de *Botrytis cinerea* Pers. sometido a diversas concentraciones de extracto sódico de *Larrea tridentata* (D. C.) Coville

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	12	76596.375000	6383.031250	529.9553	0.000
Error	52	626.312500	12.044471		
Total	64	77222.687500			
C.V. = 6.84 %					

Cuadro 5. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial de *Botrytis cinerea* Pers. sometido a diversas concentraciones de mezclas quitosan-*Larrea tridentata*, (extracto metanólico)

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	10	49180.187500	4918.018555	2257.0308	0.000
Error	44	95.875000	2.178977		
Total	54	49276.062500			
C.V. = 1.81 %					

Cuadro 6. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial de *Botrytis cinerea* Pers. sometido a diversas concentraciones de mezclas quitosan-*Larrea tridentata*, (extracto etanólico)

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	10	46982.250000	4698.225098	1783.5267	0.000
Error	44	115.906250	2.634233		
Total	54	47098.156250			
C.V. = 1.95 %					

Cuadro 7. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial de *Botrytis cinerea* Pers. sometido a diversas concentraciones de mezclas quitosan-*Larrea tridentata*, (extracto sódico)

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	8	33796.625000	4224.578125	824.7270	0.000
Error	36	184.406250	5.122396		
Total	44	33981.031250			
C.V. = 3.02 %					

Cuadro 8. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial de *Botrytis cinerea* Pers. sometido a diversas concentraciones de ácido nordihidroguaiarético (NDGA)

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	6	30642.921875	5107.153809	489.0728	0.000
Error	28	292.390625	10.442522		
Total	34	30935.312500			
C.V. = 5.67 %					

Cuadro 9. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición micelial de *Botrytis cinerea* Pers. sometido a diversas concentraciones de quitosan de elevado peso molecular

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratam.	5	44748.453125	8949.690430	2288.8320	0.000
Error	24	93.843750	3.910156		
Total	29	44842.296875			
C.V. = 2.94 %					

Cuadro 10. Relación de tratamientos aplicados y parámetros evaluados en el crecimiento *in vitro* de *Botrytis cinerea*

Tratamiento	Concentración aplicada	Crecimiento micelial (mm)	inhibición micelial (%)	Eficacia de tratamientos (%)
*Quitosan (BPM)	62.5	34.2	9.2	9.2
	125	29.7	21.2	21.2
	250	17.3	54.1	54.1
	500	16.3	56.7	56.7
	1000	14.7	61	61
	2000	13	65.5	65.5
	4000	8.8	76.6	76.6
	8000	8.0	78.7	78.7
	10000	3.6	90.4	90.4
	12000	0	100	100
Extracto metanólico	16000	0	100	100
	32000	0	100	100
	500	30.5	19.0	19.0
	1000	23.6	37.4	37.4
	2000	22.2	41.1	41.1
	4000	19.4	48.5	48.5
	5000	11.9	68.4	68.4
	7000	3.6	90.4	90.4
Extracto etanólico	8000	0	100	100
	12000	0	100	100
	16000	0	100	100
	250	31.7	15.9	15.9
	500	28.5	24.4	24.4
	1000	7.2	80.9	80.9
	2000	7.0	81.4	81.4
	4000	3.6	90.4	90.4
Extracto sódico	8000	0	100	100
	12000	0	100	100
	16000	0	100	100
	1000	35.6	5.5	5.5
	2000	34.3	9.0	9.0
	4000	30.2	19.8	19.8
	8000	26.8	28.9	28.9
	12000	22.7	39.7	39.7
sódico	16000	18.4	51.1	51.1
	20000	10.7	71.6	71.6
	24000	6.1	83.8	83.8
	28000	5.5	85.4	85.4
	32000	2.3	93.8	93.8

...continuación del cuadro 10.

Tratamiento	Concentración aplicada	Crecimiento micelial (mm)	Inhibición (%)	Eficacia (%)	E esperado
Quitosan + Extracto metanólico	500/500	15.1	57.8	57.8	< 64.9
	500/1000	11.1	70.5	70.5	< 72.8
	500/2000	0	100	100	> 74.4
	500/4000	0	100	100	> 77.7
	1000/2000	0	100	100	> 77.0
	1000/4000	0	100	100	> 79.9
	2000/2000	0	100	100	> 79.6
	2000/4000	0	100	100	> 82.6
Quitosan + Extracto metanólico	500/500	13.1	65.2	65.2	< 67.2
	500/1000	8.3	77.9	77.9	< 91.7
	500/2000	0	100	100	> 91.9
	500/4000	0	100	100	> 95.8
	1000/2000	0	100	100	> 92.7
	1000/4000	0	100	100	> 96.2
	2000/2000	0	100	100	> 93.5
	2000/4000	0	100	100	> 96.6
Quitosan + Extracto sódico	500/28000	7.4	80.3	80.3	< 93.6
	500/32000	6.6	82.4	82.4	< 97.3
	1000/28000	6.3	83.2	83.2	< 94.3
	1000/32000	5.6	85.1	85.1	< 97.5
	2000/28000	5.3	85.9	85.9	< 94.9
	2000/32000	5.1	86.4	86.4	< 97.8
NDGA	1000	23.1	38.7	38.7	
	2000	19.8	47.4	47.4	
	4000	11.6	69.2	69.2	
	8000	10.1	73.2	73.2	
Tiabendazol	1000	10.9	71	71	
Mancozeb	2000	0	100	100	
**Quitosan (EPM)	1000	25.3	32.8	32.8	
	2000	0	100	100	
	4000	0	100	100	

## **Lista de equipo, material y reactivos de laboratorio empleados en este trabajo.**

### **Equipo**

- ⊕ 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
- Atomizador
- Bisturí
- Bulbo de succión para pipetas
- Cajas petri desechables
- Charolas
- Cubre y portaobjetos
- Cubre bocas
- Envases de plástico para extractos
- Espátula
- Guantes de asbesto
- Guantes de látex estériles
- Plástico
- Mascarilla
- Matraces Erlenmeyer
- Mecheros Fisher
- Micropipetas marca Rainin
- Navajas tipo exacto
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Papel estraza
- Pissetas



- Pipetas
- Probetas
- Sacabocados
- Termómetros
- 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
- Fungicida Mancozeb
- Quitosan de bajo y alto peso molecular de la compañía SIGMA Aldrich
- Fungicida Tiabendazol (Tecto 60)

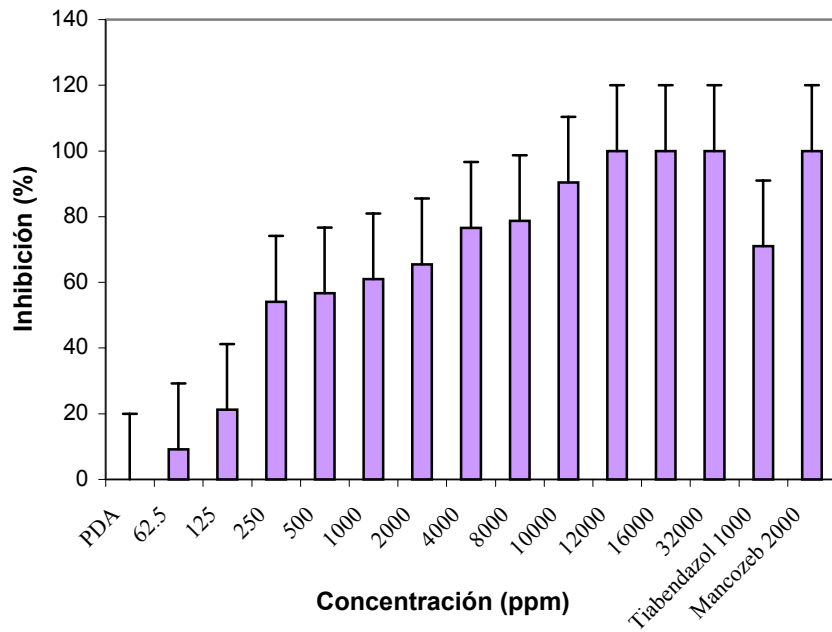


Figura 1. Inhibición micelial (%) de *Botrytis cinerea* por diferentes concentraciones de quitosán.

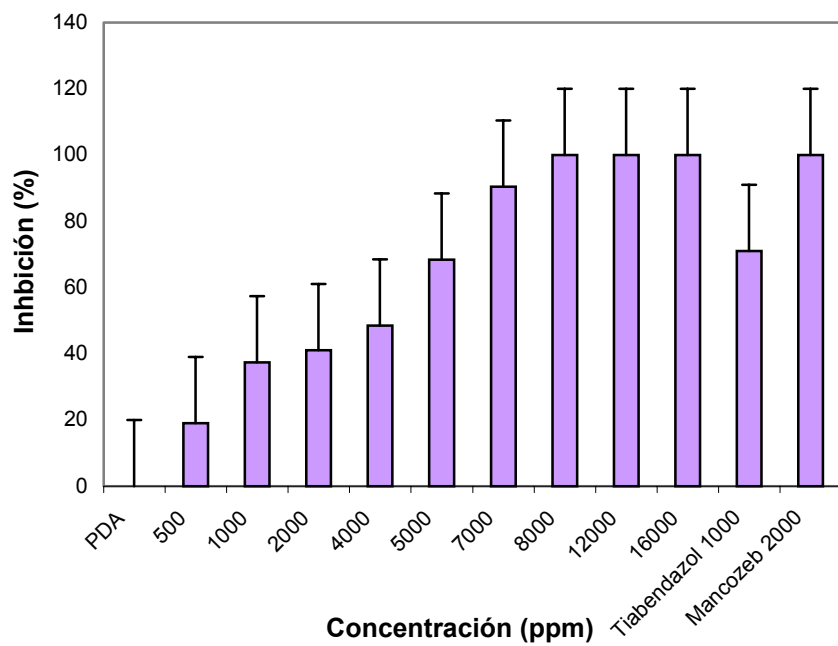


Figura 2. Inhibición micelial (%) de *Botrytis cinerea* por diferentes concentraciones del extracto metanólico de *Larrea tridentata*.

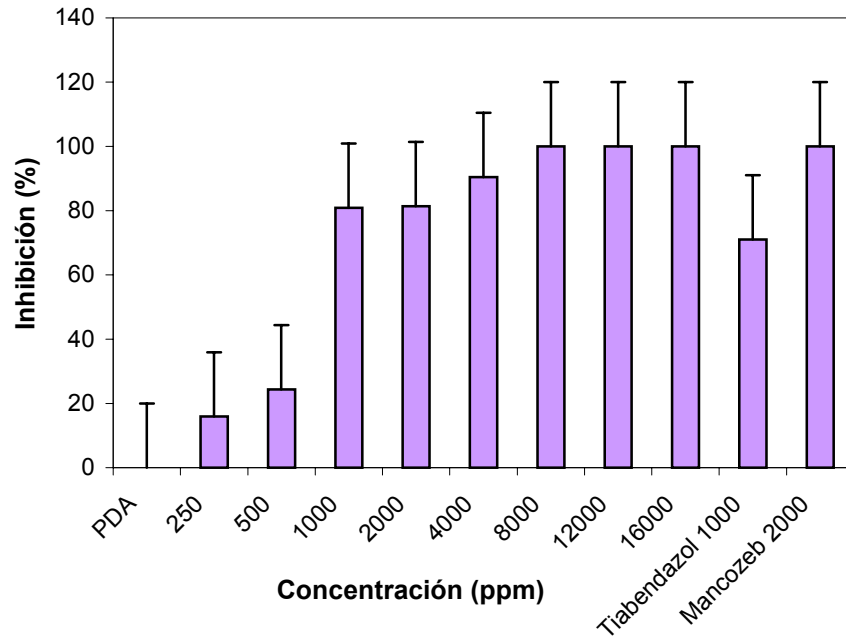


Figura 3. Inhibición micelial (%) de *Botrytis cinerea* por diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Larrea tridentata*.

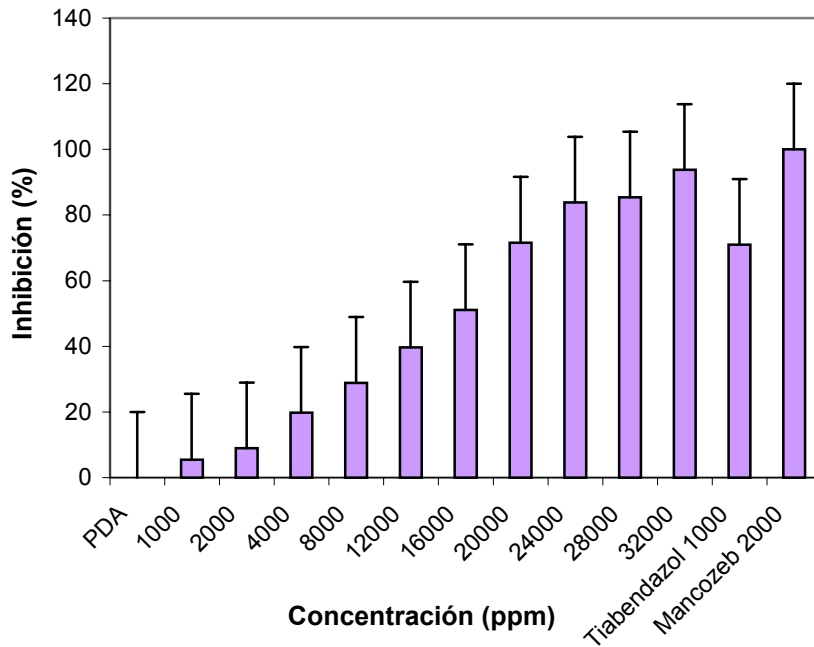


Figura 4. Inhibición micelial (%) de *Botrytis cinerea* por diferentes concentraciones del extracto sódico de *Larrea tridentata*.

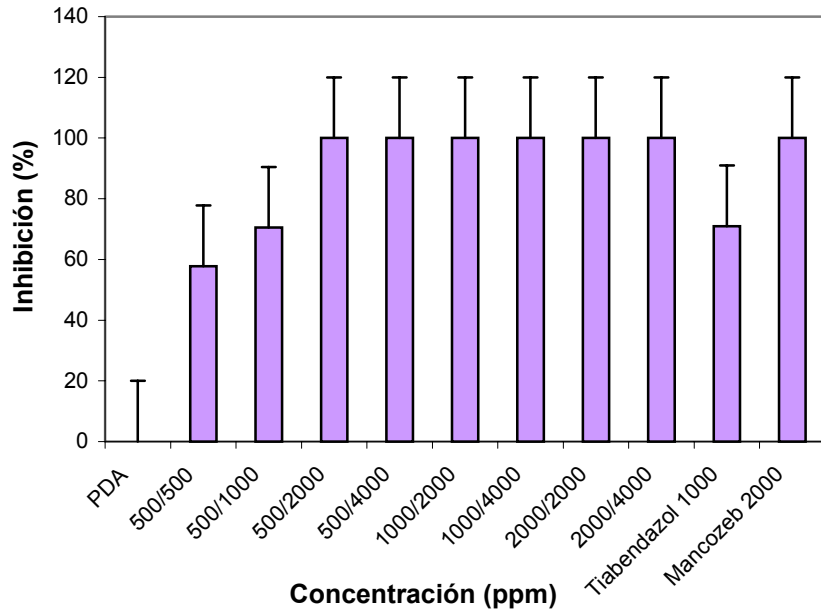


Figura 5. Inhibición micelial (%) de *Botrytis cinerea* por diferentes mezclas de quitosan-Larrea (Extracto metanólico).

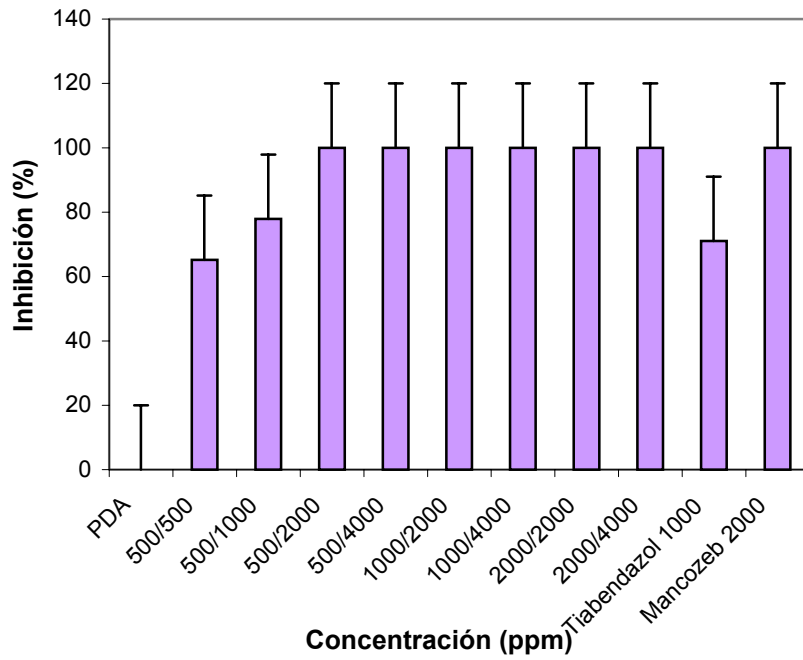


Figura 6. Inhibición micelial (%) de *Botrytis cinerea* por diferentes mezclas quitosan-Larrea (Extracto etanólico).

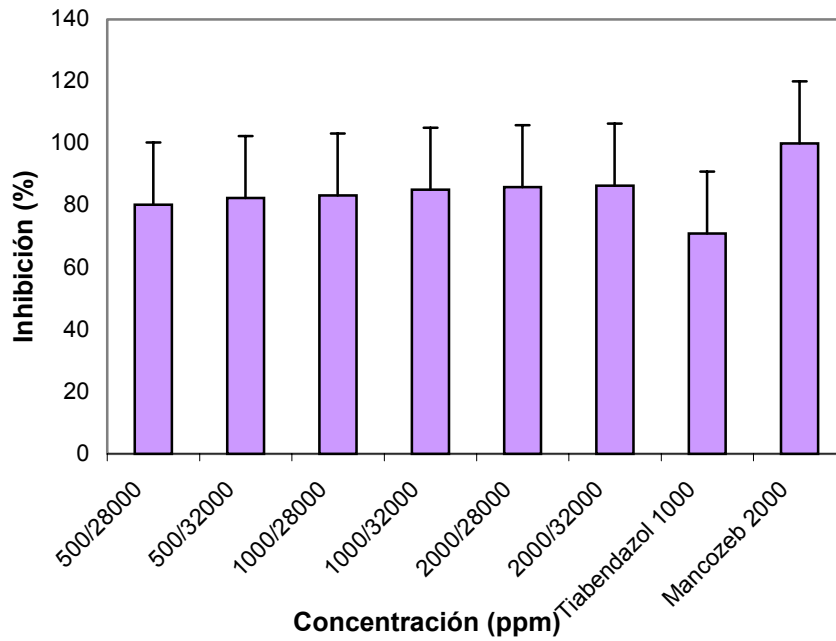


Figura 7. Inhibición micelial (%) de *Botrytis cinerea* por diferentes mezclas quitosan-Larrea (Extracto sódico).

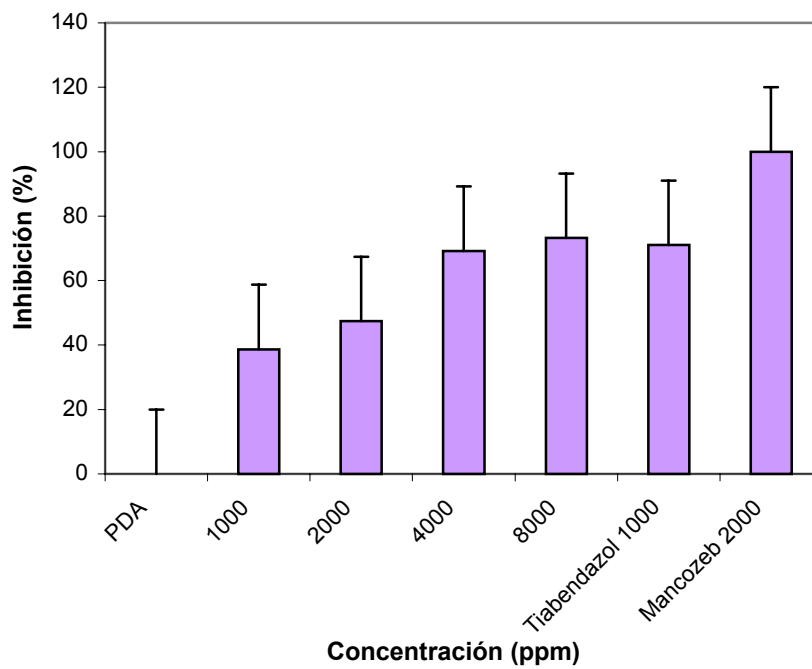


Figura 8. Inhibición micelial (%) de *Botrytis cinerea* por diferentes concentraciones del ácido nordihidroguaiarético (NDGA).

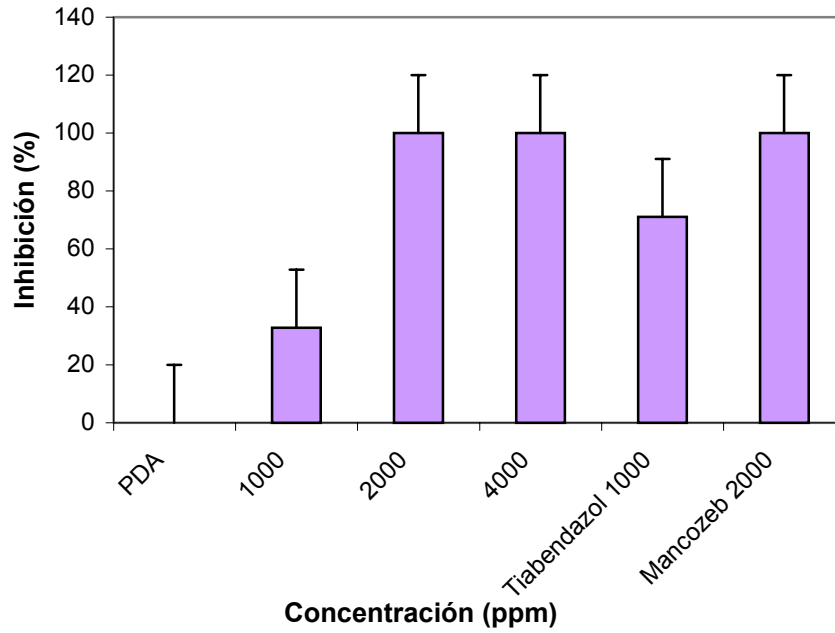


Figura 9. Inhibición micelial (%) de *Botrytis cinerea* por diferentes concentraciones de quitosán de elevado peso molecular.

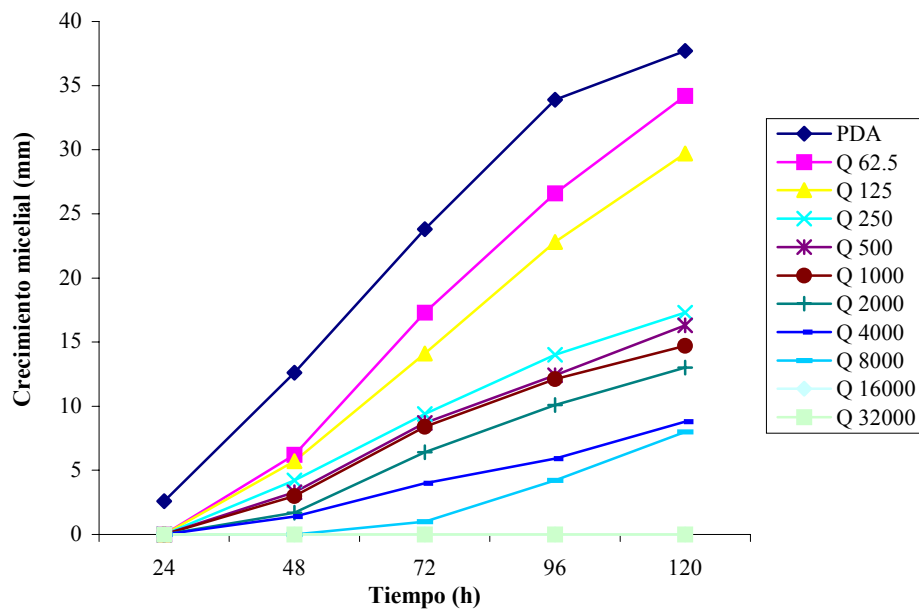


Figura 10. Efecto de las concentraciones de quitosán en el crecimiento micelial diario de *Botrytis cinerea*.

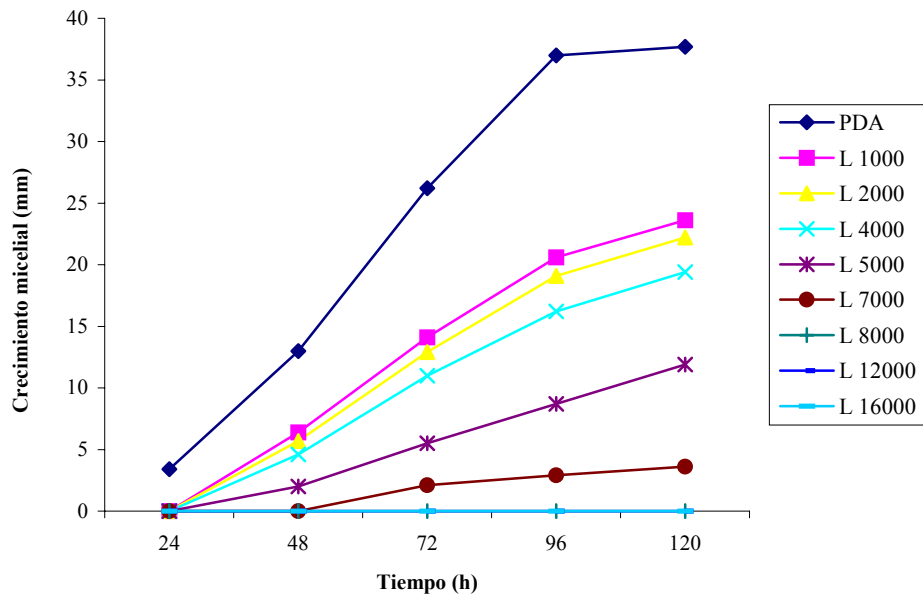


Figura 11. Efecto de las concentraciones del extracto metanólico de *Larrea tridentata* en el crecimiento micelial diario de *Botrytis cinerea*.

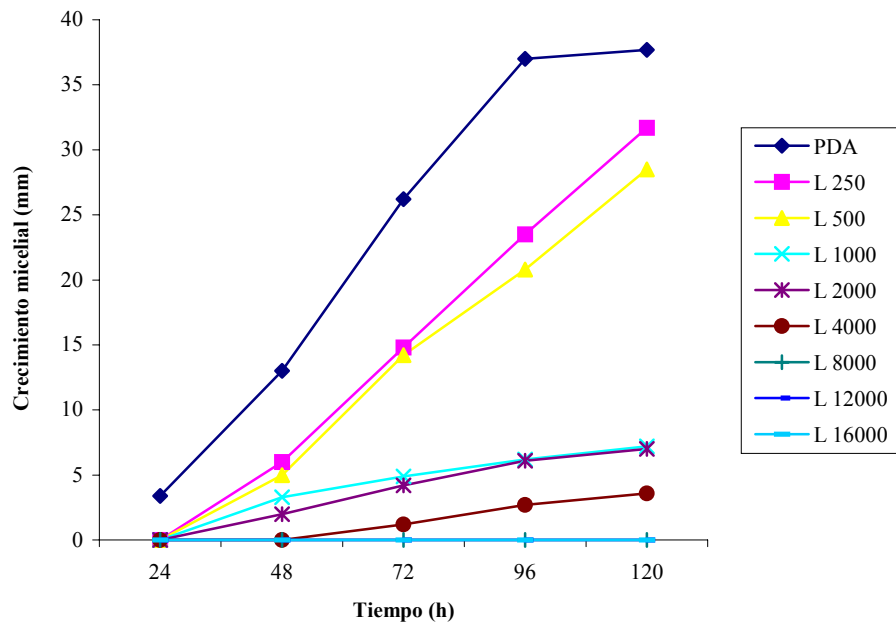


Figura 12. Efecto de las concentraciones del extracto etanólico de *Larrea tridentata* en el crecimiento micelial diario de *Botrytis cinerea*.

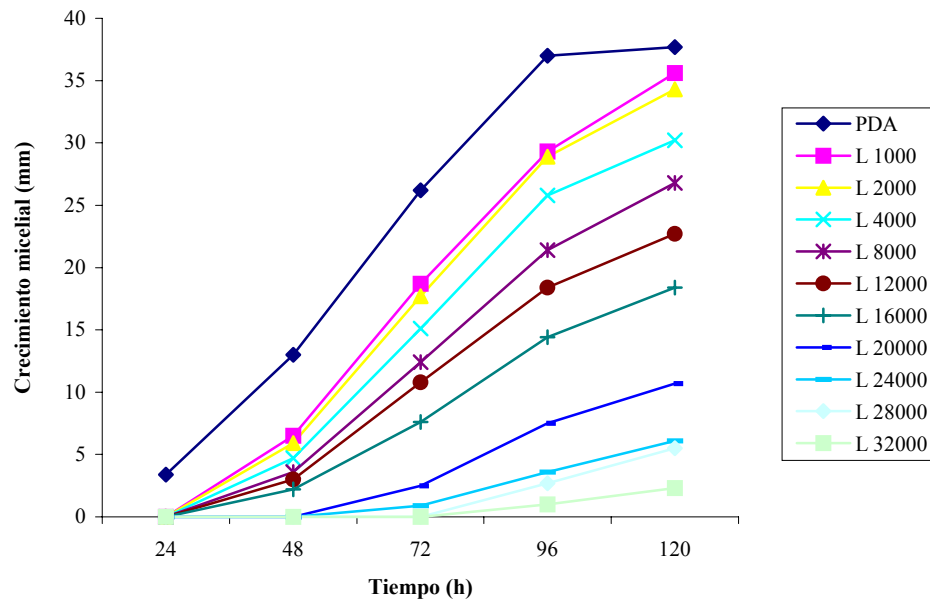


Figura 13. Efecto de las concentraciones del extracto sódico de *Larrea tridentata* en el crecimiento micelial diario de *Botrytis cinerea*.

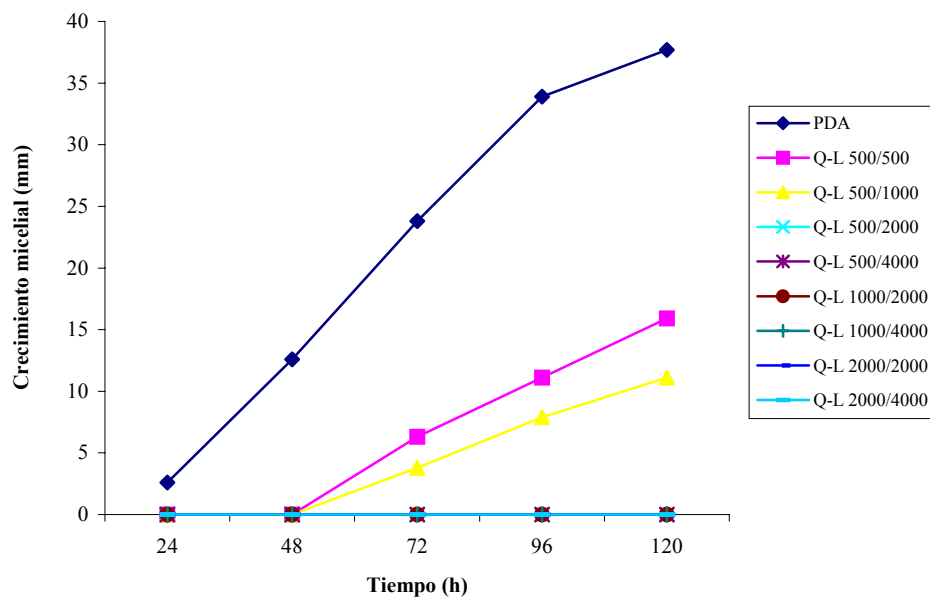


Figura 14. Efecto de las mezclas quitosan-Larrea (Extracto metanólico) en el crecimiento micelial diario de *Botrytis cinerea*.



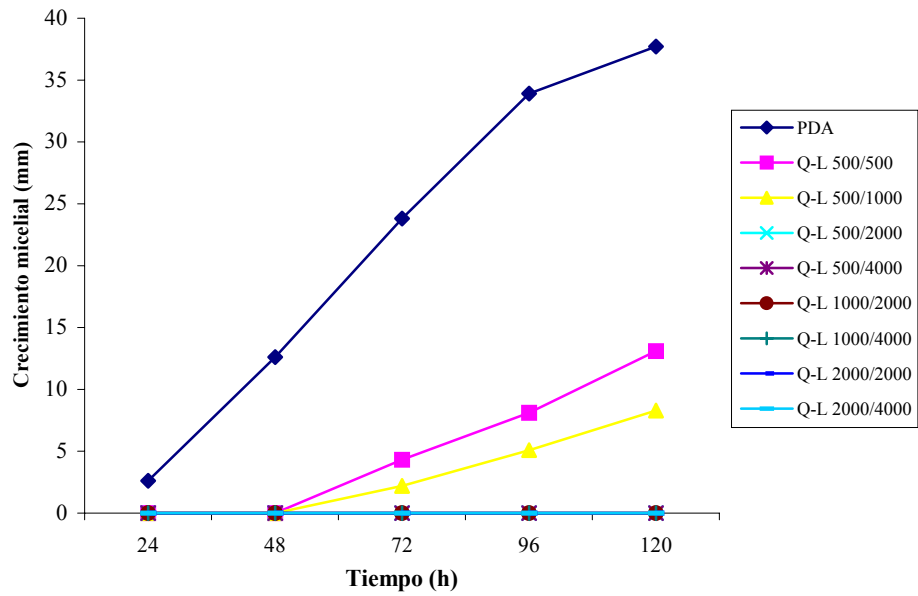


Figura 15. Efecto de las mezclas quitosan-Larrea (Extracto etanólico) en el crecimiento micelial diario de *Botrytis cinerea*.

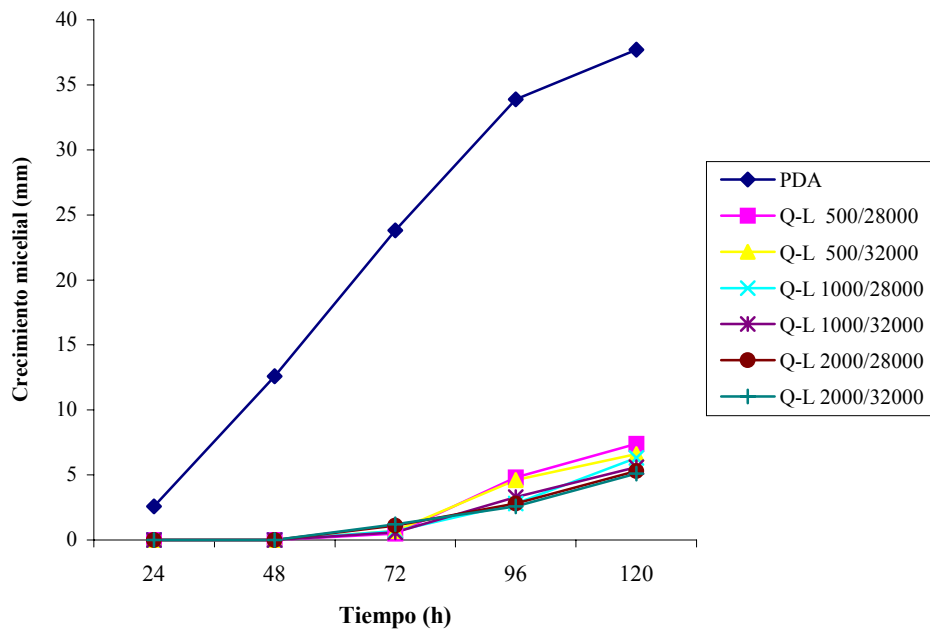


Figura 16. Efecto de las mezclas quitosan-Larrea (Extracto sódico) en el crecimiento micelial diario de *Botrytis cinerea*.

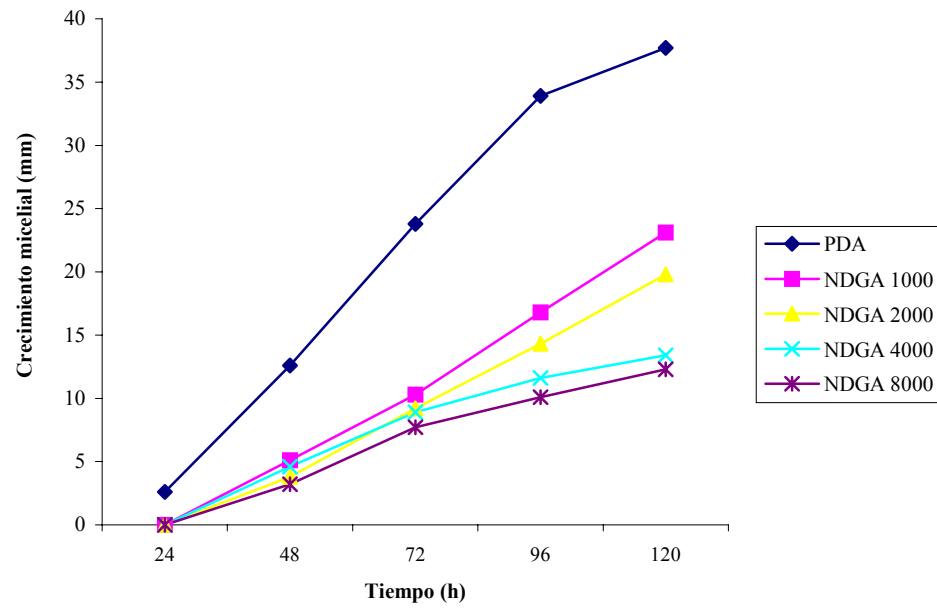


Figura 17. Efecto del ácido nordihidroguaiarético (NDGA) en el crecimiento micelial diario de *Botrytis cinerea*.