

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO.**

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA.



**Extracto de Gobernadora (*Larrea tridentata*), para la inhibición
de los hongos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* y
Fusarium moniliforme).**

POR:

JOSÉ GONZÁLEZ CUELLAR.

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para

Obtener el Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO

MAYO DEL 2007

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

Extracto de Gobernadora (*Larrea tridentata*) para la inhibición de los hongos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium moniliforme*).

POR:

JOSÉ GONZÁLEZ CUELLAR

TESIS

QUE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

APROBADA

PRESIDENTE DEL JURADO

M.A. FEDERICO FACIO PARRA

SINODAL

SINODAL

LIC. ZURIVEY DÍAZ CORTES

M.C. ANTONIO VALDÉZ OYERVIDES

SUPLENTE

QFB. ALEJANDRA TORRES TAPIA

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

M.C. ARNOLDO OYERVIDES GARCÍA

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO

MAYO DEL 2007

DEDICATORIAS

A MIS PADRES:

RAMIRO GONZÁLEZ MENDOZA

Y

ROSA CUELLAR RODRÍGUEZ

Por haberme dado la vida, el apoyo, moral, económicamente, espiritualmente y físicamente, por todos los consejos que me dieron en la vida y me seguirán dando para llegar a lo que soy y por toda la confianza que me han tenido les dedico este logro tan importante en mi vida.

A mis hermanos (as).

Rafael

Laura

Juan

Gracias por el apoyo y ejemplo de vida que me han brindado y por todos los momentos que hemos pasado y pasaremos juntos.

A mis abuelos (as) por todo su cariño y apoyo brindado.

A mis tíos (as) por todo su apoyo y confianza que me han brindado, en especial a mi tía Guadalupe Cuellar por todo su cariño y confianza le agradezco mucho.

A mi novia Gabriela Pérez Gallardo por todo su cariño y apoyo que me ha brindado y por el ejemplo que me ha enseñado de perseverancia.

A Dios por haber iluminado mi vida y guiado en el camino correcto y por haberme brindado salud todo este tiempo.

AGRADECIMIENTOS

A MI ALMA TERRA MATER (UAAAN) que me dio la oportunidad y la dicha de estar entre sus aulas y poderme formar como profesionista y conocer grandes amigos (as), que nunca olvidare.

Al M.A. Federico Facio Parra, por la oportunidad que medio para realizar este trabajo de investigación y por todas las enseñanzas y apoyo que ha aportado.

A la LIC. Zurivey Díaz Cortés, por su ayuda y apoyo en la realización de este trabajo y por todo su asesoramiento y paciencia gracias.

A la QFB. Alejandra Torres Tapia, por su asesoramiento en la realización de este trabajo.

Al M.C. Antonio Valdez Oyervides, por su apoyo y colaboración

Al Dr. Hugo Lira Saldivar y al Centro de Investigación de Química Aplicada, por el aporte del extracto de gobernadora.

A todos los maestros que estuvieron en mi formación académica que sin ellos no lo lograría nada.

A todos los compañeros de generación que estuvieron conmigo en toda nuestra formación académica y por todos los días que pasamos juntos por su gran apoyo y amistad a todos ustedes les deseo lo mejor en su vida.

A todos los amigos de la Universidad por los momentos que pasamos juntos y por toda su amistad que me brindaron gracias y a todos aquellos que no nombre pero que me brindaron una gran amistad y confianza gracias

A todos mis amigos (as) de Guanajuato que son muchos gracias por toda su amistad y ánimo que me dieron durante la estancia en la universidad

INDICE DE CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
INDICE DE CUADROS.....	v
INDICE DE GRÁFICAS.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
HIPÓTESIS.....	3
REVISION DE LITERATURA.....	4
<i>Larrea tridentata</i> o Gobernadora.....	4
Descripción de la Gobernadora.....	5
Constituyentes Fltoquímicos de <i>Larrea tridentata</i>	6
Propiedades y usos de la Gobernadora.....	8
<i>Fusarium monilifome</i>	11
Descripción de <i>Fusarium moniliforme</i>	12
Taxonomía del hongo.....	13
Diseminación.....	14
Epidemiología.....	15
Sintomatología.....	17
Toxinas producidas por <i>Fusarium moniliforme</i>	18
<i>Aspergillus</i>	20
Descripción del Género <i>Aspergillus</i>	20
Taxonomía de <i>Aspergillus flavus</i> y <i>ochraceus</i>	21
Diseminación del Género <i>Aspergillus</i>	22
Epidemiología del Género <i>Aspergillus</i>	23
Sintomología del Género <i>Aspergillus</i>	23
Toxinas producidas por el Género <i>Aspergillus</i>	24

MATERIALES Y METODOS	29
Localización del Área de Estudio.....	29
Material Utilizado.....	29
Hongos.....	29
Extracto de Gobernadora (<i>Larrea tridentata</i>).....	30
Descripción de la Prueba.....	30
Inmunofluorescencia Monoclonal.....	30
Determinación de la Dosis Antifúngica de Gobernadora.....	31
Variables a Evaluar.....	32
Análisis Estadístico.....	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
<i>Aspergillus flavus</i>	35
<i>Aspergillus ochraceus</i>	37
<i>Fusarium moniliforme</i>	39
CONCLUSIONES	41
LITERATURA CITADA	42

INDICE DE CUADROS

CUADRO	PAGINA
1 Principales Constituyentes de <i>Larrea tridentata</i>	7
2.1 Concentración de las dosis utilizadas de las ppm.....	30
2.2 Número de conidias utilizadas por cada hongo.....	32
3.1 Concentración de datos de análisis de varianza de las tres especies de hongos (<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> y <i>Fusarium moniliforme</i>).....	34
3.2 Comparación de medias por el método DMS de los cinco dosis de extracto de gobernadora y un testigo, en la inhibición del crecimiento de las unidades formadoras de colonias de <i>A. flavus</i> , bajo condiciones de laboratorio.....	36
3.3 Comparación de medias por el método DMS de las cinco dosis de extracto de gobernadora y un testigo, para la inhibición del número de unidades formadoras de colonias de <i>A. ochraceus</i> , bajo condiciones de la laboratorio.....	38
3.4 Comparación de medias por el método DMS de las cinco dosis de extracto de gobernadora y un testigo par la inhibición del crecimiento de las unidades formadoras de colonias de <i>F. moniliforme</i> , bajo condiciones de laboratorio.....	40

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
3.1 Comparación de las cinco dosis de extracto de gobernadora y un testigo en la inhibición del crecimiento de las unidades formadoras de colonias, bajo condiciones de laboratorio.....	36
3.2 Comparación de las cinco dosis de extracto de gobernadora y un testigo, para la inhibición del crecimiento de las unidades formadoras de colonias , bajo condiciones de invernadero.....	38
3.3 Comparación de las cinco dosis de extracto de gobernadora y un testigo para la inhibición del crecimiento de las unidades formadoras de colonias, bajo condiciones de laboratorio.....	40

Extracto de Gobernadora (*Larrea tridentata*) para la inhibición de los hongos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium moniliforme*).

INTRODUCCION

La gobernadora (*Larrea tridentata*) forma parte de la riqueza florística medicinal de los nativos de las zonas semiáridas del Norte de México y suroeste de los Estados Unidos.

L. tridentata domina aproximadamente 17.5 millones de hectáreas desde el oeste de Texas 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, limitado por heladas o lluvias excesivas de invierno.

En la República Mexicana la gobernadora se encuentra en parte del desierto Sonorense, incluyendo los estados de Baja California Norte, Baja California Sur, Sonora y en el desierto Chihuahuense incluyendo los estados de Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Zacatecas, San Luís Potosí y Durango. Se estima que el 25% (500,000 Km²) del territorio Nacional esta cubierto con este arbusto de las zonas áridas (Belmares *et al.* 1979).

Una alternativa que merece mayor atención es la posibilidad de utilizar los metabolitos secundarios de la resina de *L. tridentata* para el combate de fitopatógenos, debido a que estos son defensas bioquímicas para repelar la agresión de animales herbívoros, hongos y otros microorganismos.

Las enfermedades de almacén producidas por hongos constituyen una de las principales limitantes en la actividad agrícola por sus pérdidas que se han reportado en diferentes artículos, libros, revistas etc. En el presente existen un sin fin de enfermedades que afectan el rendimiento de los cultivos a tal grado que pueden reducirlo hasta en un 100%, los cuales se saben son causados por microorganismos, tal es el caso de aquellos causados por hongos como son; *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium moniliforme*.

Los hongos *A. flavus*, *A. ochraceus* y *F. moniliforme*, además de ser un problema fuerte por las graves pérdidas a nivel de almacén, causa pérdidas serias de consecuencia secundarias, como la producción de sustancias tóxicas o metabólicas conocidas como micotoxinas.

Queda claro el potencial que tiene este arbusto en las zonas áridas para elaborar productos orgánicos vegetales derivados de su resina, que ayuden a promover una agricultura sustentable y de menor impacto ambiental. Con base a lo anterior se plantearon los siguientes objetivos e hipótesis.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar las dosis óptimas de extracto de gobernadora (*Larrea tridentata*) que inhiba el desarrollo de los hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium moniliforme*.

Objetivos específicos

- Determinar que dosis es óptima para que inhiba el desarrollo del *Aspergillus flavus*.
- Determinar que dosis es óptima para que inhiba el desarrollo del *Aspergillus ochraceus*.
- Determinar que dosis es óptima para que inhiba el desarrollo del *Fusarium moniliforme*

HIPÓTESIS

- El extracto de gobernadora (*Larrea tridentata*) presentará un efecto fungicida o fungistático sobre los hongos fitopatógenos, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium moniliforme*.

REVISION DE LITERATURA

Larrea tridentata o Gobernadora

Pocas especies en el desierto muestran la capacidad de adaptación y supervivencia en las condiciones mas extremas de sequía que la *Larrea*. En Argentina, la arquitectura de la parte superior de la planta llevo a llamarla “jarilla”; en los Estados Unidos, la presencia en sus hojas de diversos tipos de resinas los inclino a llamarle “creosote bush”; en México, su dominante presencia en los desiertos origino el sugestivo nombre de “gobernadora”. En el sur del continente americano, el nombre científico de esta especie es *Larrea divaricata* y en el norte su nombre es *Larrea tridentata*; *L. divaricata* tiene su hoja dividida en dos, mientras que la *L. tridentata* en tres (Campos y Ramos, 2001).

Estudios realizados por Barbour *et al.* (1977) y Yang (1967), muestran que *Larrea* no es genéticamente homogénea a través de su área de distribución, por lo tanto, las comunidades de gobernadora han presentado variaciones genéticas durante sus años de evolución dando origen a razas cromosomitas de acuerdo a la zona en donde las comunidades se han desarrollado.

La distribución geográfica de los genotipos ha causado una variación en el número de cromosomas; las plantas de *Larrea*, del desierto Chihuahuense son diploides ($2n = 26$), las plantas del desierto Sonorense son tetraploides ($2n = 52$), y las del desierto Mojave son Hexaploides ($2n = 78$) (Yang, 1970).

Descripción de la Gobernadora.

L. tridentata es un arbusto xerófito, endémico de las zonas áridas del norte de México y sur de Estados Unidos, perenne y con follaje verde todo el año, las plantas de esta especie generalmente viven por largo tiempo excediendo probablemente cientos de años. *Larrea* es el nombre científico del género en el que se agrupan cinco especies afines de arbustos de hoja perenne, que viven y se desarrollan en las zonas áridas y calurosas del suroeste de los Estados Unidos hasta América del Sur (Brinker, 1993).

Las especies de *Larrea* pertenecen a la familia de las Zigofiláceas (*Zygophyllaceae*) y se agrupan en el género *Larrea*. El nombre común de gobernadora o creosote bush se aplica en particular a la especie *L. tridentata*, que crece en el norte de México y suroeste de Estados Unidos. Las plantas de gobernadora son muy resistentes a la sequía y a las altas temperaturas, las hojas son pequeñas y bifoliadas, de color verde oscuro a un verde amarillento con cutículas gruesas y una cubierta resinosa (Brinker, 1993). La edad se determina por el tamaño de la corona radicular. La raíz crece solo cerca de 170 cm. de profundidad, pero logra ramificarse hasta más de 4 m lateralmente.

Se ha observado que el tamaño de la gobernadora varia de una altura de 30 a 60 cm, con una cobertura un poco mayor que su altura. Una planta típica, en condiciones normales mide 45 cm, con una cobertura de 60 cm esta planta consiste aproximadamente 50 g de hojas y tallos que representa alrededor de 3/10 de su peso total (Botkin, 1949).

Constituyentes Fitoquímicos de *Larrea tridentata*

Una característica de *L. tridentata* es que sus hojas contienen una espesa resina que se comporta como antitranspirante debido a que forma una barrera que disminuye la transpiración. 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 fenolitos, seguidos por las saponinas, flavonoides, aminoácidos y minerales (Brinker, 1993).

El compuesto mas importante que se encuentra en la resina es el ácido Nordihidroguaiaretico (NDGA) químicamente se le a descrito como beta, gamadimetil-alfa, delta-bis (3,4-dihidroxifenil) butano. Se ha demostrado que este ácido tiene propiedades como antioxidante, antiinflamatorio, citotoxina, antimicrobial e inhibidora de enzimas, esto se presenta en todas las especies e híbridos de *Larrea*. Hay una pequeña variación en las concentraciones entre las razas de ploidia en los diferentes lugares de los desiertos Chihuahuense (2.62%) hacia el Sonorense (3.84%) y hacia el Mojave (4.86%) (Downum *et al.* 1998).

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

Porcentaje del peso seco	Tipo	Compuesto
16-21	Lignanós Fenólicos	Ácido Dihidroguaiaarético Hemi-norisoguaiaicin Ácido nordihidroguaiaarético Nordihidroguaiaicin
5-7.5	Flavonoides	Apigenin Kaempferol
10-15	Saponinas Triterpenos	Larreagenin Ácido Larreico
0.1-0.2	Volátiles	
	Monoterpenos	Alpha penene
	Hidrocarbonos 35	Delta-3-carene Limoneno
	Aromáticos	Benzaldheido Benzilacetato Benzilbutano Metil naftaleno
	Esteroides	Beta-sitosterol Colesterol Campesterol
	Taninos Carbohidratos	Glucosa Sucrosa
70.1	Lípidos	Alfil esterés (C46-C56)
16.6	Amino ácidos	Fenilalanina Isoleucina Ácido glutámico Ácido aspartico Glicina
15.6 mg/1b 19.8 mg/100g	Vitaminas	Caroteno Vitamina C
13.7	Minerales	Sodio Potasio Calcio Magnesio Hierro Azufre Fósforo

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 ser un extracto de la estructura entera hojas/ramas en comparación con usar una preparación de NDGA purificado o sintetizado (Sakakibara *et al.* 1976).

Propiedades y usos de la Gobernadora.

Las hojas de *L. tridentata* también tienen propiedades anti herbívoras, por lo que insectos y animales superiores como bovinos y caprinos evitan comerla (Rhoades, 1977). El NDGA y los productos químicos presentes en la resina total en las hojas de *L. tridentata* tienen un efecto defensivo contra insectos herbívoros, a un y cuando se les aplique riego y fertilización a las plantas. Sin embargo, Rundel *et al.* (1994), encontraron que existe algunos insectos que desarrollan patrones muy especializados de alimentación como *Ligurotettix coquilletti* que evita comer las hojas jóvenes, pero si comen las hojas maduras de gobernadora con niveles bajos de resina y alto contenido de proteína.

Uno de los primeros trabajos sobre el efecto fungicida y/o fungistático de la resina de gobernadora reporta que al utilizar extractos crudos de cloroformo y

etanol los hongos *Rhizoctonia solani* Kühn, *Pythium* sp. Pringsh. y *Rhizopus nigricans* Ehrend 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 extractos, 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 armeniacae* Hansa y M.V. Carter agente causal del brazo muerto de la vid; además, inhibió la germinación de ascosporas de *E. armeniacae* a la misma dosis, pero con extractos en base etanol y cloroformo.

En el trabajo realizado por Vargas – Arispuro *et al.* (1997), sobre la actividad antiaflatoxigenica *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. parasitus* Speare, respectivamente; en cambio los extractos metanólicos tuvieron poco efecto.

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 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 estos 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.

Al comparar el efecto de extractos etanolicos de resina de gobernadora obtenida del follaje colectado en los desiertos Chihuahuenses y Sonorense, Balvantín (2001), encontró que el hongo *Pythium* Pringsh fue significativamente inhibido en su desarrollo micelial, aun con las dosis mas bajas evaluadas, ya que son 500 ppm se logro una inhibición del 100% con el extracto del desierto Sonorense, mientras que con esa misma dosis del extracto del desierto Chihuahuenses se redujo el crecimiento en un 70% en comparación con el testigo. En cuanto a los extractos provenientes del desierto Chihuahuense se observo 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), encontró que los extractos metanolicos hidrosolubles de resina de *L. tridentata* colectados a diferentes latitudes (paralelos 24, 25, 26, 27, y 28°) en los desiertos Chihuahuenses y desierto Sonorense 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 desierto Sonorense.

Muchas de las enfermedades de Postcosecha de frutos, hortalizas, granos y leguminosas son el resultado de infecciones incipientes de las plantas o sus frutos por patógenos que se encuentran ya en el campo en tanto las plantas y frutos estén todavía desarrollándose o después de que los frutos o semillas han madurado en el campo, pero antes de que sean cosechados (Agris, 2004).

Fusarium moniliforme

El hongo *Fusarium moniliforme* es el más importante en cuanto a enfermedades fungosas se refiere que limita en gran medida la producción de maíz, causando cuantiosas pérdidas económicas; así como cambios en su contenido nutritivo, sabor en los productos y contaminación de los granos con micotoxinas; además se sabe que este hongo es el más frecuente encontrado atacando la mazorca (Damarys *et al.* 1976).

F. moniliforme ha sufrido un incremento sustancial a través del tiempo convirtiéndose en una enfermedad muy importante en la pudrición de la

mazorca y el grano, esto se incrementa aun más por la práctica del monocultivo de este cereal (González *et al.* 1988).

Es un hongo de gran importancia por tener una distribución cosmopolita y un amplio de hospederos, destacando entre las enfermedades que produce, la germinación prematura del maíz, la escoba de bruja del mango y diversas pudriciones en granos y raíces en diversos cultivos (Holliday, 1980).

Las enfermedades de maíz causadas por *F. moniliforme* Zinder y Hansen, se encuentran ampliamente distribuidos por todo el mundo y ocasiona pérdidas considerables por las pudriciones de tallo y mazorca provocadas por este hongo en este cultivo (Agrios, 1991).

Descripción de *Fusarium moniliforme*

El género *F. moniliforme* fue descrito por Link en 1915 quien consideró las siguientes características: conidióforos alargados en forma de botella, con ramas a intervalo regulares o verticilados, septadas, individuales o agrupados en esporoquios; conidios de dos tipos, a saber; microconidios elípticos o piriformes, unicelulares; 1) macroconidios falcados, en cabezuelas o en cadenas; macroconidios falcados, en forma de media luna o elípticos, dos o nueve septas, ápice puntiagudo, romo o en forma de gotero, base en forma de pie; clamidosporas, si se producen globosas, uní o bicelulares, lisas o rugosas y generalmente de color café (Romero, 1993).

Barnett y Hunter (1972), menciona que el hongo posee un micelio extendido y algodonoso, frecuentemente con matices rosas, púrpuras o amarillos; conidioforos variables delgados, simples o cortos y robustos, solos o agrupados en un esporodoquio, conidias hialinas, frecuentemente sostenidas en pequeñas cabezas; macroconidias con varias células delgadas, curvadas o encorvadas de forma típica de canoa: macroconidia celular ovoide y oblonga, nacen solas o en cadena. El mismo autor comento que en la semilla de maíz la colonia crece con rapidez, con un micelio aéreo blanco que a menudo se tiñe de púrpura, en particular en el papel secante. El micelio tiene una apariencia pulverulenta a causa de la formación de microconidios. En ocasiones hay masas de esporas de color canela a anaranjado.

Taxonomía del hongo

El arreglo de la taxonomía dentro del género *F. moniliforme* varía de acuerdo a los autores dedicados a su estudio. Saccardo menciona cerca de 500 especies; Reinking y Wollenweber consideran solamente 139 en su libro “Die fusarien” publicado en 1935; Zinder y Hansen opinan que la población Fusarial descubierta hasta la fecha puede distribuirse en 10 especies (Romero, 1993).

De acuerdo a Alexopoulos (1979), describe la taxonomía del hongo del Género *F. moniliforme* de la siguiente manera:

Reino.....Mycetae.

Subdivisión.....Deuteromycotina.

Orden.....Moniliales.

Familia.....Tuberculariceae.

Género.....*Fusarium*.

Especie.....*Moniliforme*.

Las características de esta clase es la existencia de micelio septado, ausencia de estructuras sexuales o reproducción sexual, razón por la cual se les llama hongos imperfectos y se reproducen sexualmente por medio de conidias.

La identificación a nivel de especie y subespecie presentan alto grado de dificultad, debido a que se basa principalmente en caracteres morfológicos de esporas que se pueden apreciar solo utilizando metodología bastante compleja, por lo que muy pocos fitopatólogos se han dedicado a estudiar este aspecto.

Diseminación

Existen un sin número de agentes que pueden favorecer la diseminación de estructuras del hongo *F. moniliforme* entre los cuales podemos mencionar al hombre, animales, viento, agua, insectos y las semillas que juegan un papel importante en el incremento de infección en las plantas.

Ooka y Kommedahl (1977), menciona que el viento y el agua son los principales vectores del hongo. El desarrollo de la enfermedad y su diseminación son favorecidos por condiciones de sequía y temperatura de 28 a 30 °C.

Delgado (1990), en estudios realizados en Kansas en 1980, encontró que los inóculos de *F. moniliforme* llevados por el suelo y por el aire, fueron monitoreados en toda la estancia del cultivo en dos localidades; donde los inóculos llevados por el aire alcanzaron un nivel máximo de 0.02 propagulos/ t. de aire durante el mes de agosto y los niveles de inóculo transportado por el suelo se incremento con el tiempo, el mas alto nivel fue de 300 propagulos/gr de suelo, encontrándose bajo condiciones de suelo seco. También menciona que la presencia del patógeno en la semilla puede o no llevar la infección hasta el tallo.

Foley (1962), concluye que el hongo es sistémico y que las plantas que son contaminadas por el inóculo el cual es transportado por el viento o el que se encuentra invernando en el suelo, penetra por la parte basal del tallo, hojas y mazorcas.

Epidemiología.

Fusarium moniliforme inverna en forma de peritecios, micelio o clamidosporas en restos de plantas infectadas, particularmente en pedúnculos de maíz. En la

primavera, cuando el clima es calido húmedo, las ascosporas son llevadas por el viento hacia los tallos y mazorcas del maíz, en las cuales penetran directamente o a través de las heridas y producen infecciones. Forma también conidios sobre restos infectados en climas calidos húmedos sirviendo como inoculo secundario. Las enfermedades son favorecidas por los climas secos de principios de la estación y por climas húmedos cerca o después de la maduración. Así mismo, la gran densidad de plantas, altos niveles de nitrógeno y bajo de potasio en la planta y la madures precoz de híbridos, hace que las plantas sean mas susceptibles a las enfermedades (Agrios, 1991).

Lawrence *et al.* (1981), citan que el hongo puede transportarse sistemáticamente desde la semilla o a través de los tejidos parenquimatosos del tallo hasta el olote para infestar los granos en desarrollo. Una vez que el patógeno ha penetrado en la planta continúa la desintegración del parénquima del tallo en forma gradual, conforme la planta madura este tejido se descompone, ocasionando decadencia del tallo. Cuando la planta es infectada después de la germinación de la semilla, el hongo puede penetrar por la región cotiledonal, plúmula o coleoptilo. También ha sido reportada la penetración directa al emerger las raíces adventicias y la radícala primaria cuando se rompe la coleorriza.

Por otro lado Dodd (1980), afirma que las densidades altas de plantas reducen la disponibilidad de agua, luz y minerales en cada planta; demostrando que la reducción de la disponibilidad de luz en altas densidades de plantas, es el factor principal de la predisposición de los tallos de maíz a la pudrición causada por *Fusarium*, *Gibberella* y *Diplodia*. Además, menciona que la tasa

de fotosíntesis de las plantas es afectada por los factores microambientales del suelo, el daño en las hojas y la competencia entre las plantas; pero que los grandes estreses macroambientales tales como la nubosidad, sequía, la fertilización desequilibrada, suelos con poca capacidad de retención de agua y las hojas enfermas sean probablemente los factores mas importantes en la predisposición del maíz a las pudriciones.

Reyna (1990), menciona que el crecimiento óptimo de *F. moniliforme* oscila entre los 26 y 33 °C, y que a temperaturas mayores el crecimiento disminuye.

La opacidad de la semilla se refiere a la alta concentración de proteínas en el grano del maíz. Warren (1978), citado por Reyna (1990), observó que altas concentraciones de Lisina en el grano incrementan la pudrición de la mazorca por *F. moniliforme*.

Sintomatología.

La pudrición de la mazorca se caracteriza por que aparece un moho rojizo que con frecuencia empieza a desarrollarse en el casquete de cada grano o grupo de granos distribuidos sobre toda la espiga. Cuando las mazorcas son infectadas prematuramente por el hongo se pudre totalmente, y entre la mazorca y la vaina estrechamente unidas se desarrolla un moho de color rosado o rojizo. La podredumbre comienza normalmente en seguida de la polinización y se agrava a medida que la planta madura (Agrios, 1985).

Nalk *et al.* (1982), menciona que *F. moniliforme* causa la muerte del embrión y reduce la germinación por lesiones de la semilla. Stayer (1989), reporta que este hongo puede causar pudrición de tallo, hojas, espiga y grano. Damping off y tizones en plántulas.

Jugenheimer (1987), cita que la presencia de *F. moniliforme* en el grano se manifiesta con la aparición de una coloración salmón pálido en el pedicelo o casquete de la punta de los granos; los cuales eventualmente muestran un crecimiento de moho polvoso de color rosáceo, compuesto por una gran cantidad de esporas o conidias.

La sociedad Americana de fitopatología (1980), menciona que la pudrición de la mazorca se caracteriza por la aparición de un moho rojizo que con frecuencia empieza a desarrollarse en el casquete de cada grano o grupo de granos distribuidos sobre toda la espiga. Cuando las mazorcas son infectadas prematuramente por el hongo se pudren totalmente y entre ellos y las vainas estrechamente unidas se desarrollan en moho de color rosado o rojizo. La podredumbre comienza, enseguida de la polinización y se agrava conforme la planta madura.

Además de los daños directos que ocasiona en las plantas infectadas, este hongo produce una gran variedad de metabolitos secundarios, algunos de los cuales son tóxicos para el hombre y los animales domésticos (Pittet *et al.* 1992).

Toxinas producidas por *Fusarium moniliforme*

Se han reportado mas de 300 toxinas producidas por *F. moniliforme*, a las cuales se les a dado el nombre de fusariotoxinas; entre éstas se encuentra la moniliformina, los tricotecenos, las fumonisinas y la zearalenona, las cuales han sido descritas como carcinógenas, inmunosupresivas, hepatotóxicas y nefrotoxicas (Ayvar-Serna, 1997).

El género *F. moniliforme* produce sus toxinas principalmente en el maíz y otras gramíneas que infecta en el campo o después de que el maíz es almacenado en los graneros. La Zearalenona y el Tricoteceno y sus derivados correspondientes; son producidos por varias especies de *Fusarium*, principalmente en el maíz enmohecido. La Zearalenona conocida como Micotoxina F-2, es producida por *Fusarium roseum*, *F. moniliforme*, *F. tricinctum* y *F. oxysporum*. Las tricotecinas de las cuales la mas conocida es la T-2 son producidas por las mismas especies y por otras distintas del género *Fusarium* (Agrios, 1991).

F. moniliforme produce enfermedades como la leucoencefalomalacia en equinos y la aleucina toxica alimentaría que causo serios problemas en la población y sus animales domésticos en Rusia entre 1942 y 1947 (Mislevic, 1981).

Durban (1981), menciona que las toxinas son componentes químicos, los cuales al actuar pueden producir parcial o completamente los síntomas de la enfermedad en cuestión.

Aspergillus

El género *Aspergillus* es de los que presentan una mayor distribución geográfica, encontrándose desde las regiones árticas hasta el ecuador. Hay especies de *Aspergillus* que comúnmente se desarrollan en granos, semillas y alimentos para humanos y para animales domésticos en los que, además de provocar su descomposición, producen sustancias tóxicas, llamadas micotoxinas, que ocasionan diversos trastornos, a veces severos, en los animales y humanos que consumen dichos granos o alimentos contaminados (Herrera *et al.* 2004).

Descripción del Género *Aspergillus*

En el género *Aspergillus* han sido descritas unas 200 especies y una gran cantidad de variedades. Los conidióforos de *Aspergillus* terminan en un hinchamiento llamado vesícula, a partir de la cual nace en su superficie una hilera de fiálides (en las especies monoseriadas) o una de méticas y sobre estas una hilera de fiálides (en las especies biseriadas) productoras de cadenas de conidios tipo fialosporas, es decir, conidios blasticos generados en sucesión basípeta. A la vesícula junto con las cadenas de conidios se le conoce como cabeza conidial. *A. flavus* es un ejemplo de cabeza conidial disertada; *A. clavatus* representa una especie con cabeza conidial uniseriada (Herrera *et al.* 2004).

McGinnis *et al.* (1983), menciono que las colonias jóvenes de *Aspergillus flavus* presentan un color verde-amarillo y café obscura en la medida que envejece, con frecuencia presentan esclerocios, los conidioforos son de pared y áspero con una vesícula globosa y subglobosa. Las fialidas son en forma de frasco, uniseriados o biseriados y cubren la mayor parte de la vesícula. Conidias unicelulares, globosas y subglobosas, equinulados y de tres a seis micras. Las cabezuelas conidiales irradian y se dividen en varias columnas pobremente.

Romero (1988), menciono que los conidioforos son hialinos, rugosos o reticulados y con vesículas globosas; cabezuelas conidiales globosas, verdeo verde amarillentas; esterigmas en una o dos series, a veces hasta en la misma vesícula; conidios finalmente equinulados, globosos a ovaes.

La colonia de *Aspergillus flavus* en la semilla por lo general se expande y es de color verde amarillento muy claro, verde amarillento intenso, café oliváceo o café. Los conidióforos hinchados en el ápice producen numerosas células esporíferas (fialidas), con esporas en largas cadenas secas (Romero, 1988).

Taxonomía de *Aspergillus flavus* y *A. ochraceus*

De acuerdo a Alexopoulos (1979), ellos clasifican a *A. Flavus* y *A. ochraceus* en la siguiente ubicación taxonómica.

Reino.....Mycetae.

Subdivisión.....Deuteromycotina.

Orden.....Moniliales.

Familia.....Moniliaceae

Género.....*Aspergillus*

Especie.....*flavus*

Especie.....*ochraceus*

Diseminación del Género *Aspergillus*

El aire y el suelo de casi cualquier parte del mundo contienen los conidios de diferentes especies. Los *Aspergillus* son de los hongos más omnívoros que existen, capaces de asimilar como alimento una enorme variedad de sustancias, debido al gran número de enzimas que pueden producir para degradarlas (Herrera *et al.* 2004).

El género *Aspergillus* tiene amplia distribución desde las regiones frías hasta los trópicos. El aire, en todas partes, parece contener conidios de estos organismos, como se puede apreciar exponiendo en el aire por pocos minutos una caja petri que tenga un medio de cultivo conveniente (Alexopoulos, 1966).

Epidemiología del Género *Aspergillus*

A. flavus es un hongo que contamina semillas y esquilmos agrícolas o bien se presenta bajo condiciones de almacén transportados por insectos, puede desarrollarse como parásitos de residuos de cosecha. El hongo permanece en el ambiente, esto permite que cuando el maíz está en etapa de floración fácilmente contamina las flores, también contamina las flores de algodón y nogal. Requiere condiciones favorables de temperatura y humedad relativa de 65-90% (De la Garza, 1996).

Moreno (1988), mencionó que las especies de este grupo requieren para crecer humedades relativas del 80.85% (actividad de agua 0.80-0.85), en cereales son contenidos de humedad de 16.5-18.0%, y en cacahuate 8.0-10.5%. Su desarrollo contribuye al calentamiento de los granos.

Sintomatología del Género *Aspergillus*

A. flavus, infecta con frecuencia a los cacahuates y granos de maíz cuando están aún en el campo, y su incidencia en este último aumenta cuando los granos son dañados por insectos u otros agentes. *Aspergillus* y otros hongos de almacén, al invadir los embriones de las semillas hacen que disminuya notablemente el porcentaje de germinación de las semillas infectadas que se utilizan para siembra o en cebada maltera (Agris, 2004).

Los *Aspergillus* causan problemas como contaminantes de cultivos en los laboratorios de bacteriología y micología. Algunas especies crecen en artículos de piel, telas, papel y otros productos manufacturados provocando su deterioro y reducción de valor impartiendo un importante olor a moho (Herrera *et al.* 2004).

Toxinas producidas por el Género *Aspergillus*

Aspergillus flavus Link, se considera la principal especie productora de aflatoxinas que se desarrolla en el maíz (Davis y Diener, 1983), estas aflatoxinas constituyen un serio problema que afecta la germinación y desarrollo de plantas de este cereal, pero sobre todo se consideran las contaminantes biológicos más extendidos y peligrosos de los alimentos a nivel mundial debido a sus propiedades cancerígenas, mutágenas y teratógenas sobre animales vertebrados y el hombre (Jelinek *et al.* 1989).

Aspergillus ochraceus es el productor de las acratoxinas, las cuales ocasionan la degeneración y necrosis del hígado y el riñón, así como varios otros síntomas en los animales domésticos. Algunas de estas toxinas persisten en la carne de los animales alimentados con forraje contaminado y pueden ser transmitidas a la cadena alimentaria humana planteando posiblemente un problema de salud pública (Agrios, 2004).

Para la prevención y manejo de este problema, existen diversas medidas como: la regulación de la humedad del grano, el uso de variedades tolerantes o resistentes, algunas prácticas culturales y el tratamiento de las semillas con fungicidas (Bhatnagar *et al.* 1994).

La manera más efectiva de evitar los problemas ocasionados por las aflatoxinas es impedir que el hongo crezca en el sustrato. En el caso de granos almacenados, esto se puede lograr de varias formas, como: 1) mantener la humedad del grano por debajo de los requerimientos de agua del hongo. 2) mantener la humedad granos a temperaturas inferiores a 10 °C. 3) la resistencia genética de variedades que reduzcan o impidan la invasión de los granos por el hongo productor de aflatoxinas. 4) evitar la germinación de las esporas de los hongos, así como el desarrollo del micelio en el sustrato susceptible

Varios trabajos se han desarrollado en pro de encontrar efectos antifungicos a la gobernadora (*Larrea tridentata*), así Lira *et al.* (2003), investigaron extractos con plantas del norte de México colectaron en los estados de Coahuila y Zacatecas del Desierto Chihuahuense (DCh) y en Baja California Sur del Desierto Sonorense (DS). Este trabajo se realizo mediante bioensayos inhibitorios para hongos, a dosis de 0, 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 µL l-1. La resina de hojas y ramas pequeñas fue extraída con metanol, etanol y cloroformo. Los resultados mostraron que el valor promedio de resina de las muestras colectadas en el DCh fue de 22.60%, mientras que las del DS resultaron de 25.49%.

El crecimiento micelial del hongo fitopatogéno *Pythium* sp. fue completamente inhibido con los extractos evaluados. El efecto fungicida de los extractos de gobernadora se mostró consistente, independientemente del solvente usado para la extracción o del sitio geográfico de colecta. Los extractos metanólicos de ambos desiertos tuvieron un notable efecto a dosis relativamente bajas (500 $\mu\text{l l}^{-1}$), ya que no hubo crecimiento del hongo *in vitro*.

Así también, Bravo *et al.* (1998), estudiaron el efecto de aceites esenciales de plantas y algunos de sus principales componentes químicos en el crecimiento micelial y esporulación de *Fusarium moniliforme*, se mezclaron cada aceites de las plantas (*Rosmarinus officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Litsea glaucescens*, *Origanum vulgare*, *Mentha piperita*, *Eucalyptus globulus*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum*, *Thymus vulgaris* y *Teloxys ambrosioides*) con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) inoculado el hongo, así como componentes químicos (timol, cíñelo, mentol, aldehido cinámico, linalol y eugenol). Probaron dosis desde 10000 ppm hasta 60 ppm. en aceite y componente

Los resultados mostraron que a dosis altas todos los aceites inhibieron el crecimiento micelial y la concentración mínima inhibitoria varió desde 5000 ppm en *R. officinalis* hasta 150 ppm en *T. vulgaris*. La esporulación fue estimulada por: *R. officinalis*, *E. globulus* y *M. piperita* a dosis de 5000 a 1000 ppm. La mayor inhibición de la esporulación (en dosis mínima) se presento en: *T. ambrosioides* (1000 ppm), *C. zeylanicum* (300ppm), *S. aromaticum*(300 ppm) y *T.vulgaris* (150 ppm). Todos los componentes químicos tuvieron un efecto fungicida, con excepción del cineol que únicamente afecto la esporulación.

Montes (1997), estudió el efecto de 106 especies de plantas sobre la germinación de esporas y el desarrollo del micelio de *Aspergillus flavus*, de todas las especies probadas *Larrea tridentata*, *Tridax coronopifolia* y *Coleus blumei* fueron las únicas que disminuyeron significativamente la contaminación por *A. flavus* en granos de maíz, lo que significa la aparente vulnerabilidad de este tipo de sustancia a las condiciones ambientales

Barrera *et al.* (2002), los polvos de hojas, frutos y semillas de *Pithecellobium dulce* y semillas extraídas secuencialmente con hexano-diclorometano, cetona y metanol-agua se evaluaron sobre el crecimiento micelial de *Alternaria* sp., *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum*, *Pestalotiopsis* sp. y *Rhizopus stolonifer*. Los polvos de semillas tuvieron la más alta actividad fungistática contra los hongos probados en comparación con los polvos de fruto y hoja. En general, se observó una curva de dosis-efecto para las tres concentraciones evaluadas (0.5, 2.0 and 5.0 mg/ml). Sin embargo, para *P. digitatum* y *Alternaria* sp. la concentración más baja y la más alta, respectivamente, incrementaron el crecimiento micelial. Dependiendo de la concentración, los polvos de hoja y fruto inhibieron o incrementaron el crecimiento micelial. El extracto hexano-diclorometano fue sometido a una cromatografía en columna, obteniéndose 13 fracciones con patrones similares, las cuales fueron evaluadas usando la respuesta de crecimiento micelial de *F. oxysporum*, *P. digitatum* y *R. stolonifer*. Once y nueve de las fracciones inhibieron el crecimiento de *F. oxysporum* y *R. stolonifer*, respectivamente. *P. digitatum* fue el hongo menos afectado por todas las fracciones.

Bautista *et al.* (2000), evaluaron las propiedades fungicidas en plantas cultivadas del Estado de Morelos, México, se estudio el efecto de extractos acuosos y polvos de hojas de 20 diferentes especies vegetales en el desarrollo *in vitro* de los hongos patógenos de postcosecha *Alternaria spp.*, *Fusarium spp.*, *Pestalotiopsis spp.* y *Rhizopus spp.* Los resultados mostraron que la actividad fungistático fue diferente entre los extractos acuosos o polvos y entre las especies probadas.

Se evidenció un efecto fungistático selectivo dependiendo de la especie de planta y patógeno utilizado. *Pithecellobium dulce* fue la especie botánica más sobresaliente en detener el desarrollo de los hongos estudiados. Otras especies con buena actividad fungicida o fungistatica fueron *Achras sapota*, *Annona cherimola*, *Casimiroa edulis*, *Citrus limon*, *Crataegus mexicana*, *Carica papaya*, *Psidium guajava*, *persea americana* y *Spondias purpurea*.

Montes *et al.* (1990), probaron extractos acuosos de 74 especies de plantas para determinar la inhibición de la germinación de urediosporas de *Uromyces phaseoli* var. *Typica* Arth. Veinticuatro de las especies vegetales inhibieron entre un 70 y 100 % la germinación de las urediosporas; de esas plantas deseleccionaron 14 para determinar el aspecto de acción inhibitoria de sus extractos sobre la germinación de las esporas de 14 hongos fitopatologicos. os resultados mostraron una diversidad de respuestas *Alternaria cucumerina*, *Erysiphe polygoni*, *Fusarium sp.* y *Puccina sorghi* la germinación que fue inhibida por la mayoría de los extractos; en cambio en *Penicillium sp.* hubo estimulación en su germinación por casi todos los vegetales.

MATERIALES Y METODOS

Localización del Área de Estudio

El presente trabajo se llevo a cabo en el laboratorio de Ensayos de Semillas del Centro de Capacitación y Desarrollo de Tecnología de Semillas, ubicado en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro., en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, situada geográficamente en las coordenadas 25' 22" de latitud norte y 101' 00" de longitud oeste, con una altitud de 1743 msnm.

Material Utilizado

Hongos

En este trabajo de investigación se utilizaron tres hongos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium moniliforme*), las cepas utilizadas en la ejecución de los bioensayos fueron proporcionadas por la Unidad de Investigación de Granos y Semillas (UNIGRAS), de la Facultad de Estudios Superiores, Cuautitlan Izcalli, Estado de México, que pertenece a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), el medio a utilizar en este trabajo de investigación fue la Malta Sal Agar (MSA).

Extracto de Gobernadora (*Larrea tridentata*)

La gobernadora (*Larrea tridentata*) extracto metanólico a 25%, fue proporcionada por Centro de Investigación de Química Aplicada (CIQA), Saltillo, Coahuila, México.

Descripción de la Prueba

Inmunoafinidad Monoclonal.

Esta técnica consiste principalmente en combinar el extracto metanólico hidrosoluble de gobernadora a 25% de sólidos totales, a diferentes dosis (1000, 2000, 4000, 6000 y 8000 ppm); por otro lado, se utilizó una suspensión de esporas con concentración por 1×10^{-1} para *A. flavus* y *F. moniliforme* y la concentración de 1×10^{-2} para *A. ochraceus*; esta diferencia en la concentración de conidios se debió a que la cantidad utilizada fuera similar en cada hongo utilizado con un rango de 4 000 a 8 000 conidios.

Posteriormente se colocaron en una placa de microtitulación (ELISA) las diferentes concentraciones del extracto junto con las esporas del hongo (usando un pozo por concentración de extracto), obteniéndose los resultados de la absorbancia a: 0, 8, 16 y 24 horas de incubación, con ayuda de un lector de placas a través de un filtro de 492 nm de longitud de onda. Con este método se lograron analizar las 5 concentraciones con sus tres repeticiones en una sola placa de 96 pozos, esto incluye dos testigos (un pozo vacío y uno solo) con solución de esporas (Wilson *et al.* 1997).

Determinación de la Dosis Antifúngica de Gobernadora

Para determinar la dosis del extracto metanólico a 25% de gobernadora que mostrara una actividad inhibitoria de los tres hongos fitopatogenos antes señalados, se utilizaron las siguientes dosis; 1000, 2000, 4000, 6000, 8000 ppm. Esto se realizo para corroborar los resultados obtenidos en la prueba rápida. Posteriormente se colocaron 20 µL de cada dosis de gobernadora utilizando la mitad de la caja petri con malta sal agar, y la otra mitad con 20 µL de la suspensión de esporas de los hongos utilizados, evaluados a los 7 días.

En el Cuadro 2.1, presenta las dosis utilizadas en partes por millón (ppm) del extracto de gobernadora, la cual se utilizó en los tres especies de hongos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium moniliforme*).

Cuadro 2.1. Concentración de las dosis utilizadas de las ppm.

Tratamientos	Producto (Gobernadora) ppm	Dosis Microlitros (µL)
1	1 000	20
2	2 000	20
3	4 000	20
4	6 000	20
5	8 000	20
Testigo	Medio	20

Variables a Evaluar

La evaluación de la unidades formadoras de colonias, se realizo a los siete días mediante la observación directa de las colonias fungosas bajo un Estereoscopio y/o Microscopio de cada caja petri previamente identificadas.

El número de conidios por mililitro utilizado en las cinco dosis del extracto de gobernadora con sus tres repeticiones para cada hongo, se midió con la ayuda de la cámara de neubauer, la cual se presenta en el Cuadro 2.2

Para determinar la cantidad de conidias por mililitro se efectuaron mediante la siguiente fórmula.

$$N. / n \times 10000 \times \text{Dilusión} = \text{Número de Conidios / mililitro.}$$

N = Número de esporas contados

n = Número de cuadrantes contados

1000 = Constante

Dilusión = en este caso 10^{-1} y 10^{-2}

Cuadro 2.2. Número de conidios utilizados por cada hongo.

Tiempo de inmersión (horas)	<i>A. flavus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>F. moniliforme</i>
0	83500	5350	55250
8	60250	4700	63250
16	64500	4700	63250
24	83500	5350	80250

Análisis Estadístico.

Para la evaluación de los parámetros se realizó un análisis de varianza bajo un diseño completamente al azar mediante el programa de la Universidad de Nuevo León. Posteriormente se realizó una prueba de comparación de medias para aquellas variables que presentan diferencias significativas, utilizando la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS). Cabe señalar que para efectuar el análisis estadístico en el caso de la esporulación de los tres hongos se practicaron la transformación de datos mediante la fórmula

$$\sqrt{X+1}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo se presentan a continuación, para cada una de las especies de hongos utilizados.

Cuadro 3.1. Concentración de datos de análisis de varianza de las tres especies de hongos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium moniliforme*).

F.V	G.L	<i>A. Flavus</i>	<i>A. Ochraceus</i>	<i>F. moniliforme</i>
TRATAMIENTOS	5	72.59**	424.06**	486.23**
ERROR	12	0.51	0.14	56.21
C.V.		18.59	9.01	8.06

** , Significativo al 0.01 de probabilidad.

Se obtuvieron los siguientes resultados donde la Fuente de Variación, nos muestran diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre las variables, donde para *A. flavus* se obtiene 72.59, para *A. ochraceus* se obtiene 424.06 y *F. moniliforme* 486. 23 por ciento.

Aspergillus flavus.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de varianza en la inhibición del crecimiento de las unidades formadoras de colonias, en la utilización de las cinco dosis de extracto de gobernadora con respecto al testigo, hubo estadísticamente diferencia significativa (Cuadro 3. 1).

En el Cuadro 3.2, se observó la comparación de medias donde los tratamientos dos, tres, cuatro y cinco no mostraron diferencia estadística entre si, pero si numéricas; ya que el tratamiento cuatro (6 000 ppm) inhibió en un 99 % al *A. flavus* dando como resultado la formación de una unidad formadora de colonia (ufc). Por otra parte, el testigo sin extracto de gobernadora presento el mayor numero de ufc's (63%), seguido del tratamiento uno con 35.33%.

En el trabajo realizado por vargas-Arispuro *et al.* (1997), al utilizar 10 extractos vegetales, se destaca el efecto de *L. tridentata* ya que inhibió en 92% el crecimiento de *Aspergillus flavus*.

Así también Montes (1997), estudio el efecto de 106 especies de plantas sobre el desarrollo del micelio de *Aspergillus flavus*, destacando *Larrea tridentata* que disminuyó significativamente al hongo lo que significa la aparente vulnerabilidad de este tipo de sustancias. En ambos trabajos no nos muestran las dosis utilizadas para la inhibición del hongo, en el trabajo que realizamos la dosis óptima que encontramos fue de 4 000 ppm ya que inhibió casi por completo al hongo.

Cuadro 3.2. Comparación de medias por el método de MDS de las cinco dosis de extracto de gobernadora y un testigo, en la inhibición del crecimiento de las unidades formadoras de colonias de *A. flavus*, bajo condiciones de laboratorio.

TRATAMIENTO	MEDIA
6	63.00 A
1	35.33 B
2	5.33 C
3	2.67 C
5	2.33 C
4	1 C

Nivel de significancia = 0.01

Valor de DMS = 13.29

Los resultados se presentan gráficamente de la siguiente manera.

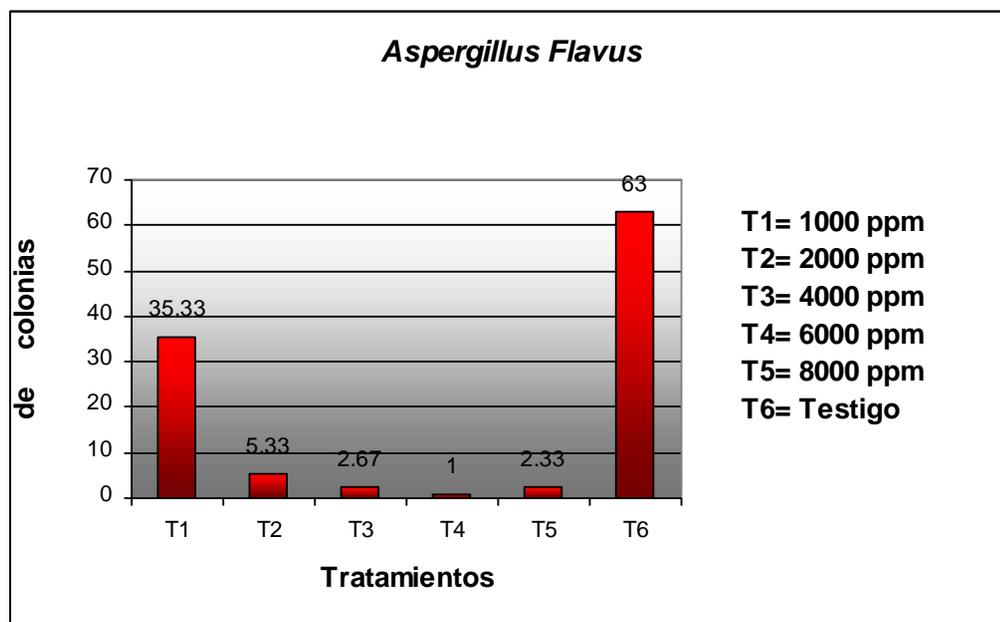


Figura 3.1. Comparación de las cinco dosis de extracto de gobernadora y un testigo en la inhibición del crecimiento de las unidades formadoras de colonias, bajo condiciones de laboratorio.

Aspergillus ochraceus.

El análisis de varianza en la inhibición del crecimiento de las unidades formadoras de colonias mostró una diferencia significativa, en el efecto de las cinco dosis de extracto de gobernadora y un testigo (cuadro 3. 1).

En el cuadro 3.3, se observa las medias donde los tratamientos dos, tres, cuatro y cinco no mostraron diferencias estadísticas entre si, pero si numéricas, ya que el tratamiento cinco (8 000 ppm) inhibió en 100% a *A. ochraceus* dando como resultado cero unidades formadoras de colonias. Por otra parte el testigo sin extracto presento el mayor número de ufc's (69%) seguido del tratamiento uno con 39.

Los resultados señalados son similares a los obtenidos por Balvantín (2001), en su investigación relacionada con extracto de *L. tridentata* y su efecto inhibitorio en el crecimiento *in Vitro* del hongo *Pythium* sp. en este trabajo se consigna que los extractos, independientemente del solvente usado o región geográfica donde se haya colectado, son altamente eficaces ya que en el caso de los obtenidos en el desierto sonoreense con dosis de 500 ppm se logra una inhibición del hongo , y en caso de los obtenidos en el desierto Chihuahuense se logro a partir de 2 000 ppm.

Cuadro 3.3. Comparación de medias por el método DMS de las cinco dosis de extracto de gobernadora y un testigo, para la inhibición del número de unidades formadoras de colonias de *A. ochraceus*, bajo condiciones de laboratorio.

TRATAMIENTO	MEDIA
6	69.00 A
1	39.33 B
2	2.00 C
4	1.33 C
3	0.33 C
5	0.00 C

Nivel de significancia = 0.01

Valores de DMS = 0.6765

Los valores se presentan gráficamente de la siguiente manera.

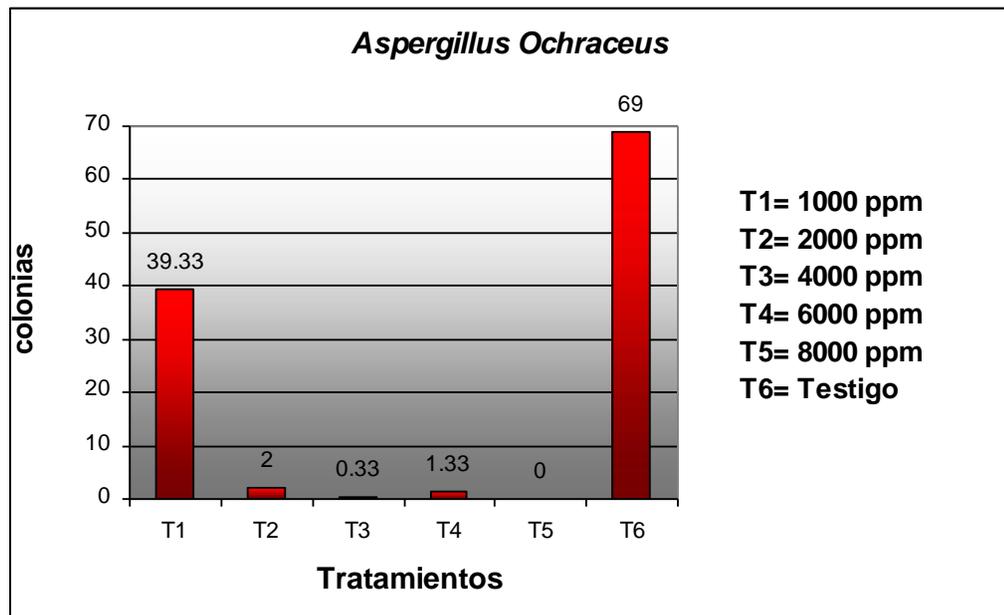


Figura 3.2. Comparación de las cinco dosis de extracto de gobernadora y un testigo, para la inhibición del crecimiento de las unidades formadoras de colonias, bajo condiciones de laboratorio.

Fusarium moniliforme.

El análisis de varianza en la inhibición del crecimiento de las colonias mostró diferencia significativa como se muestra (Cuadro 3. 1).

En el Cuadro 3.4, se observa la comparación de medias, donde los tratamientos dos, tres, cuatro y cinco no mostraron diferencias estadísticas entre si, pero si numéricas: ya que el tratamiento tres (4 000 ppm) inhibió en 100% a *F. moniliforme* dando como resultado cero unidades formadoras de colonias. Por otra parte el testigo sin extracto de gobernadora presento el mayor numero de ufc's (71.67%), seguido del tratamiento uno con gobernadora con 35.33%.

Los resultados obtenidos son similares a los que obtuvo Fernández (1979), utilizando extracto de *L. tridentata* para el control de *Fusarium oxysporum*, encontró que con dosis de 1 000 ppm controlaba un 76 y 93% de esta hongo y con dosis superiores controlaba el hongo.

Así también bravo *et al.* (1998), estudiaron el efecto de aceites de plantas sobre la inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium moniliforme*, y encontró que la inhibición se presento desde dosis de 150 ppm pero fue mínima, y el mayor control se presenta a dosis de 1 000 ppm en adelante.

Cuadro 3.4. Comparación de medias por el método DMS de las cinco dosis de extracto de gobernadora y un testigo par la inhibición del crecimiento de las unidades formadoras de colonias de *F. moniliforme*, bajo condiciones de laboratorio.

TRATAMIENTO	MEDIA
6	71.67 A
1	35.33 B
2	2.33 C
4	1.67 C
5	1.00 C
3	0.00 C

Nivel de significancia = 0.05

Valores de DMS = 0.6049

Los resultados se presentan gráficamente.

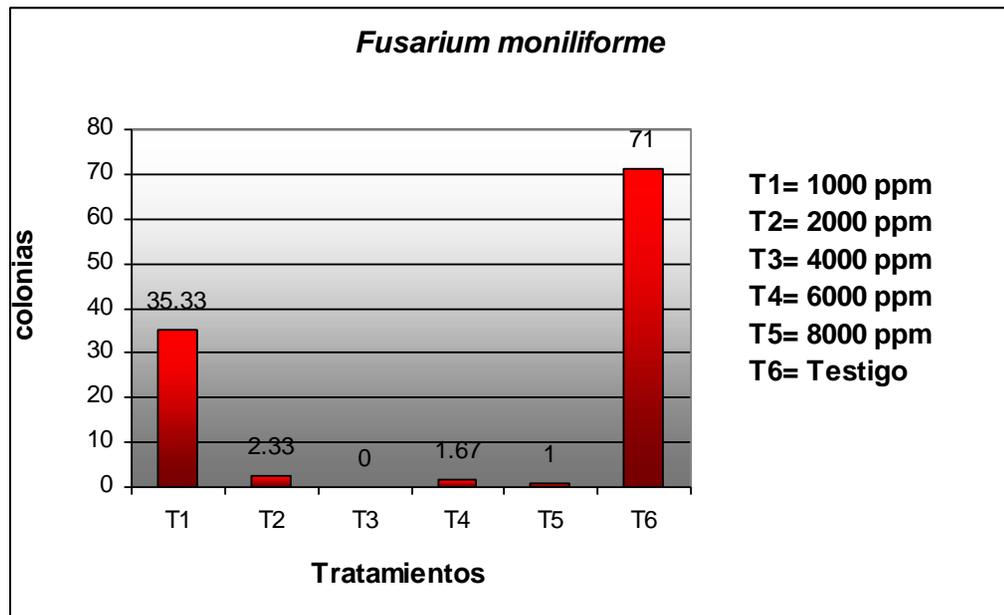


Figura 3.3. Comparación de las cinco dosis de extracto de gobernadora y un testigo para la inhibición del crecimiento de las unidades formadoras de colonias, bajo condiciones de laboratorio.

CONCLUSIONES

De acuerdo a las condiciones en que fueron evaluadas las cinco dosis de extracto de gobernadora (*Larrea tridentata*) en comparación con el testigo sin extracto, y tomando en cuenta los resultados obtenidos en la inhibición del crecimiento micelial de las tres especies de hongos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium moniliforme*). Podemos concluir lo siguiente:

La mejor dosis que inhibió el crecimiento de las unidades formadoras de colonias de *Aspergillus flavus* fue la dosis cuatro (6 000 ppm)

La dosis cinco (8 000 ppm) fue la que tuvo un mejor control de las unidades formadoras de colonias de *Aspergillus ochraceus* con un 100% de inhibición.

Al respecto con las unidades formadoras de colonias de *Fusarium moniliforme* la mejor dosis fue tres (4 000 ppm) que inhibió el 100%.

LITERATURA CITADA

- Agrios, N.G. 1985. Fitopatología. Editorial Limusa. Primera edición. México, D.F. p. 736.
- Agrios, N.G. 1991. Manual de las enfermedades de las plantas. Editorial Limusa, México. p. 968.
- Agrios, N.G. 2004. Fitopatología. Editorial Limusa. México. P. 838.
- Alexopoulos, C.J. 1966. Introducción a la micología, Buenos Aires Argentina. p. 615.
- Alexopoulos, C.J. 1979. Introducción a la micología, EUDEBA. Buenos Aires, Argentina. p. 615.
- Ayvar-serna, S. 1997. Aislamiento e identificación de las micotoxinas producidas por el hongo *Fusarium moniliforme* Sheld., en maíz y su relación con las enfermedades denominadas pudrición de la mazorca y germinación prematura. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, UNAM, México. D.F.
- Balvantín, G.G.F. 2001. Extractos hidrosolubles de *Larrea tridentata* y su efecto inhibitorio en el crecimiento *in Vitro* del hongo *Phythium* sp. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México. p. 59.
- Barbour, M.G.,Cunnigham, G., Oechel, W.O. and Bamberg, S.A. 1977. Growth and development, form and function. pp. 48-91. 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.

- Barnett, H.L. and Hunter, B.B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Printed in the United States of America.
- Barrera-Necha, L.L. 2002. Influence of leaf, fruit and seed powders and extracts of *pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. (Fabaceae) on the *in vitro* vegetative growth of seven postharvest fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20:66-72.
- Bautista-Baños, S., Hernandez, L.M. and Barrera, N.L.L. 2000. Antifungal screening of the state of Morelos, México against four postharvest pathogens of fruits and vegetables. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18:36-42.
- 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. p 411.
- Bhatnagar, D., Cleveland, T.E. and Cotty, P.J. 1994. Mycological aspects of aflatoxin formation. p. 327-346. In: Eaton, D.L. and Groopman, J.D.(Eds.). The toxicology of aflatoxin formation. human health, veterinary and agricultural significance. Academic Press. London.
- Bravo-Luna, L., Bermúdez-Torres, K y Montes-Betmont, R. 1998. Inhibición del crecimiento micelial y esporulación de *Fusarium moniliforme* Sheld. Mediante aceites vegetales y algunos de sus componentes químicos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 16:18-23.
- Brinker, F. 1993. *Larrea tridentata* (D.C) Coville (Chaparral or Creosote Bush). *British Journal of Phytotherapy* 3:10-30.
- Campos, L.E. y L.F. Ramos de V. 2001. De las perlas al collar. Historias de la Evolución del CIQA. Editorial Ciencia CIQA. p. 135-136.

- Damarys, M., Medina, C y Zenteno, Z. 1976. Micoflora de mazorcas del maíz en México. II. Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología 10:71-77.
- De la Garza, G.J.L. 1996. Fitopatología general. Edición Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía, Marín, Nuevo León. p. 515.
- Delgado, L.E. 1990. Evaluación de la técnica *in Vitro* e invernaderos de progenitores de híbridos de maíz (*zea mays* L.) para determinar la tolerancia a *Fusarium moniliforme*. Tesis de licenciatura, UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. p. 51.
- Dodd, T.J. 1980. Grain sink size predisposition of zea mays to stalk rot. *Phytopathology*.
- Downum, K.R., Dole, J. and Rodriguez, E. 1998. 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.
- Fernández, S., Hurtado, L.M. and Hernandez, F. 1979. Fungicidal components creosote bush resin. pp. 351-355. In: *Advances in Pesticida Science* (ed. H. Geissbühler). Pergamon Press Oxford and New Cork.
- Foley, D.C. 1962. Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology journal*.
- González, G., S.G. Leyva M., y Villaseñor, M.M. 1988. Evaluación de técnicas de inoculación de *Fusarium moniliforme* (sheld). Zinder & Hansen causante de la pudrición de la mazorca y el germinado prematuro del maíz. *Revista Mexicana de Fitopatología* 6:237-243.

- Herrera, T. y Ulloa, M. 2004. El reino de los hongos, micología básica y aplicada. UNAM, México D.F. p. 552.
- Jelinek, C.F., Pohland, A.E. and Word, G.E. 1989. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds: an update. J. Assoc. Off. Anal. Chem 72:223-230.
- Jugenheimer, R.W. 1987. Variedades mejoradas. Métodos de cultivo y Producción de Semillas. Editorial Limusa. México. p. 841
- Lara, H.M.E., García, E.R.G., Valdez, A.L.A. y Tlanpan, B.B. 1997. Efecto de la gobernadora sobre patógenos radicales. Avances de la investigación. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México. Pp. 74-75.
- Lawrence, E.B., Nelson, P.E. and Ayers. J.E. 1981. Histopathology of sweet corn seed and plants infected with *Fusarium moniliforme* and *Fusarium oxysporum*. Phytopathology journal.
- 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 Mexico and their inhibitory effect on *Fusarium oxysporum*. International Journal of Experimental Botany. 2002:167-172.
- Lira-Saldivar, R.H., Balvantin-Garcia, G.F., Hernandez-Castillo, F.D., Jasso-Cantu, D. and Díaz-Jiménes, F. 2003. Evaluation of resin content and the antifungal effect of *Larrea tridentata* (Seese and Moc. Ex DC.) Coville extracts from two Mexican deserts against *Phythium* sp. Pringsh. Revista Mexicana de Fitopatología (in press).
- McGinnis, M.R., Amato, R.D. and Land, G.A..1983. Pictorial habdbbook of medically important fungi and aerobic actinomycetes praeger. USA. p. 115-120.

- Mislevic, P.B. 1981. Mycotoxin production by conidial fungi. In: Cole, G.T. and Kendrick, B. (Eds.). Biology of conidial fungi. Academic Press. Vol. 2:37-73.
- Montes-Belmon, R., Sandoval-García, G. y Orozco-Revuelta, C. 1990. Extractos vegetales inhibidores de la germinación de urediosporas de *Uromyces phaseoli* var. *Typica*. Y su espectro de acción antiesporulante. Revista Mexicana de Fitopatología 8:64-67.
- Montes-Belmont, R. 1997. Extractos sólidos acuosos y hexánicos de plantas para el combate de *Aspergillus flavus* link. En maíz. Revista Mexicana de Fitopatología 15:26-30.
- Moreno. M.E., 1988. Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados. Editorial UNAM. Ciudad Universitaria, México. p. 109.
- Ooka, J.J. and Kommedahl, T. 1977. Wind and rain dispersal of *Fusarium moniliforme* in corn field. Phitopathology journal.
- Reyna, S.G. 1990. Evaluación de la resistencia del material germoplasmico de 10 líneas de maíz (*zea mays* L.) para el hongo *Fusarium moniliforme* bajo condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Romero, A.S. 1988. Hongos fitopatogenos. Dirección del Patronato Universitario A.C. UACH. Chapingo. México. P.347
- Romero, A.S. 1993. Hongos fitopatogenos. Dirección del Patronato Universitario. A.C. UACH. Chapingo. México. p 347.
- Rhoades, D.F. 1977. The antiherbivore chemistry of *Larrea*. pp. 135-175. 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.

Rundel, P.W., Sharifi, M.R. and Gonzalez-Coloma, A. 1994. Resource availability and herbivory in *Larrea tridentata*. pp. 105-114. In: M. Arianoustsou and R.H. groves (eds.). Plant-Animal Interactions in Mediterranean-Type Ecosystems. Kluwer academic Publishers. Netherlands.

Sakakibara, M., Difeo, D.Jr., Nakatani, N., Timmerman, B. and Mabry, T.J. 1976. Flavonoid menthyl ethers on the external leaf surface of *Larrea tridentata* and *L. divaricata*. Phytochemistry 15:727-731.

Salazar, H.F.J., García, E.R. y Talalpan, 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 *Phytium aphanidermatum* y *Rhizoctonia solana*, en la germinación y crecimiento de plántulas de frijol. Revista Mexicana de Fitopatología 9:102-104.

Sociedad Americana de Fitopatología. 1980. Compendio de enfermedades del maíz. Hemisferio sur, Buenos Aires, Argentina.

Pittet, A., Parisod, V. and Schellenberg, M. 1992. Occurrence of fumonisins B 1 and B 2 in corn and products from the Swiss market. p 259-265. In: Gopalakrisnakone, P. and Tan, C. K. (Eds.) Recent advances in toxicology research. National University of Singapore Press.

Vargas-Arispuro, I., Araujo-Bernal, S., Martinez-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 gobernadora sobre *Eutypa armeniaca* Hans and Carter. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. p. 48
- Wilson, C.L., Solar, J. M., El Ghaouth, A. and Winiewski, M.E. 1997. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Plant Disease. 81:204-210.
- Yang, T.W. 1967. Chromosome numbers in populations of creosote bush (*Larrea divaricata*) in the Chihuahuan and Sonoran subdivisions of the North American Desert. J. Ariz. Sci. 4:183-184.
- Yang, T.W. 1970. Major chromosome races of *Larrea divaricata* in North America. J. Ariz. Acad. Sci. 6:41-45.