

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY

CAMPUS MONTERREY

DIVISION DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA
PROGRAMA DE GRADUADOS EN INGENIERIA



**TECNOLÓGICO
DE MONTERREY.**

“EVALUACION DE LA ACTIVIDAD FUNGICIDA DEL
FOLLAJE DE *Helietta parvifolia* GRAY (BENTH) RUTACEAE
Y SU APLICACION EN POSCOSECHA DE SEMILLAS”

DISERTACION

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL
GRADO ACADEMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS
ESPECIALIDAD EN PARASITOLOGIA AGRICOLA

LYDIA NORMA GONZALEZ SOLIS

2004

A Dios:

mí Roca y mi Fortaleza.

A mi esposo Hazael:

quién me impulsa a seguirme superando y ser mí compañero inseparable en este largo camino que emprendimos a través de la ciencia.

A mi hijo Hazael Carlos:

en quién espero haber sembrado el ejemplo del esfuerzo y la superación diaria.

A mis padres Carlos (*q.e.d.p.*) y Lydia:

de quienes recibí además de la vida, la mas valiosa herencia, mi educación.

A mí hermana Nancy Dalia:

por su valiosa asesoría durante mis estudios de postgrado y apoyo en el desarrollo de esta investigación.

A todos mis familiares y amigos:

quienes me motivaron e impulsaron para concluir esta etapa de mi vida profesional.

AGRADECIMIENTOS

A MI ASESOR Y SINODALES:

DR. HOMERO GAONA RODRIGUEZ

DR. ENRIQUE ARANDA HERRERA

DR. MANUEL ZERTUCHE GUERRA

DRA. MARÍA JULIA VERDE STAR

DRA. CATALINA RIVAS MORALES

Por su valiosa ayuda incondicional para la realización de esta investigación.

AL CONACYT Y A LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

Por el financiamiento de mis estudios de postgrado.

A TODOS MIS MAESTROS, COMPAÑEROS Y PERSONAL DEL PROGRAMA
DE GRADUADOS EN AGRICULTURA DEL ITESM.

En particular a la memoria del DR. DIETER ENKERLIN S. (*q.e.d.p.*) hombre visionario quién pudo formar una generación de especialistas comprometidos con la excelencia ¡gracias por permitirme ser parte de ella!.

A la MSc. Magdalena Rovalo Merino por invitarme a formar parte de su equipo de investigadores para la búsqueda de plaguicidas de origen vegetal y poder extender mis fronteras del conocimiento.

INDICE GENERAL

INDICE DE CUADROS
INDICE DE FIGURAS
INDICE DE TABLAS
INDICE DE ESQUEMAS

INTRODUCCION	1
LITERATURA REVISADA	5
Enfermedades de poscosecha, importancia en semillas almacenadas y su control	5
Funguicidas agrícolas	8
Naturaleza	8
Modo de acción	10
Selectividad	10
Agricultura orgánica	11
Metabolitos secundarios vegetales alelopáticos	13
Metabolitos secundarios y su potencial fungicida	14
Naturaleza de los metabolitos secundarios con potencial fungicida y factores que influyen en su producción	16
Influencia de los factores botánicos y estacionales en la acción fungicida de los aceites esenciales	18
Investigaciones sobre el potencial fungicida de aceites esenciales para el control de hongos de poscosecha	19
Acción fungicida de aceites esenciales volátiles	21
Investigaciones sobre la actividad fungicida de los componentes químicos de los aceites esenciales	21

Investigaciones sobre la actividad fungicida de extractos vegetales acuosos	23
Estudios realizados a <i>Helietta parvifolia</i>	24
MATERIAL Y METODOS	28
Colecta y manejo del follaje de <i>Helietta parvifolia</i>	28
Obtención de los extractos vegetales	28
Pruebas fisicoquímicas	30
Obtención y aislamiento de hongos que afectan en poscosecha a semillas almacenadas	31
Evaluación de la actividad fungicida de los extractos vegetales <i>in vitro</i> sobre hongos que afectan semillas en poscosecha	31
Efecto fungicida del aceite esencial por contacto y volatilidad	31
Efecto fungicida del agua de arrastre por contacto	32
Actividad fungicida del aceite esencial extraído de follaje colectado en diferentes áreas geográficas	33
Actividad fungicida del aceite esencial obtenido en diferentes estaciones climáticas del año	34
Actividad fungicida del aceite esencial obtenido bajo diferentes condiciones	35
Evaluación de la actividad fungicida del aceite esencial <i>in vivo</i> en la protección de semillas almacenadas	36
Acción protectora del aceite esencial volátil sobre semillas almacenadas a humedad relativa saturada	36
Efecto del aceite esencial por contacto sobre semillas almacenadas a dos niveles de humedad relativa	37
Dosis óptima del aceite esencial por contacto en la protección de semillas de maíz almacenadas	38

Estudio comparativo de la actividad fungicida por contacto del aceite esencial y el fungicida comercial Captán sobre semillas almacenadas	39
Evaluación de la actividad fungicida del agua de arrastre <i>in vivo</i> empleando diferentes métodos de aplicación	40
Evaluación <i>in vivo</i> de la actividad fungicida del follaje deshidratado sobre semillas almacenadas	42
Análisis estadístico de resultados	43
RESULTADOS	44
DISCUSION	82
CONCLUSIONES	96
RESUMEN	98
BIBLIOGRAFIA	104
CURRICULUM VITAE	114

INDICE DE CUADROS

Cuadro No.	Página
Cuadro 1. Análisis de varianza para el diámetro del halo de inhibición (cm) en seis especies de hongos tratadas <i>in vitro</i> por contacto y volatilidad con aceite esencial de <i>Helietta parvifolia</i> .	46
Cuadro 2. Comparación múltiple de medias (Tukey) del diámetro del halo de inhibición (cm) para la variable especies de hongos, tratadas <i>in vitro</i> por contacto y volatilidad con aceite esencial de <i>Helietta parvifolia</i> .	47
Cuadro 3. Comparación múltiple de medias (Tukey) del diámetro del halo de inhibición para la variable tratamientos con aceite esencial de <i>Helietta parvifolia</i> aplicados a seis especies de hongos <i>in vitro</i>	47
Cuadro 4. Análisis de varianza para el número de colonias de seis especies de hongos tratadas <i>in vitro</i> con agua de arrastre obtenida de la destilación del follaje de <i>Helietta parvifolia</i> .	48
Cuadro 5. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de colonias para la variable especies de hongos, tratadas <i>in vitro</i> con agua de arrastre obtenida de la destilación del follaje de <i>Helietta parvifolia</i> .	49
Cuadro 6. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de colonias para la variable tratamientos de aceite esencial de <i>Helietta parvifolia</i> aplicados a seis especies de hongos	49
Cuadro 7. Análisis de varianza para el número de esporas en tres especies de <i>Aspergillus</i> , tratadas <i>in vitro</i> con agua de arrastre obtenida de la destilación del follaje de <i>Helietta parvifolia</i> .	51
Cuadro 8. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas de la variable especies de <i>Aspergillus</i> , tratadas <i>in vitro</i> con agua de arrastre obtenida de la destilación del follaje de <i>Helietta parvifolia</i> .	51
Cuadro 9. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas en la variable tratamientos aplicados a tres especies de <i>Aspergillus</i> , <i>in vitro</i> .	51

Cuadro 10. Análisis de varianza para el diámetro del halo de inhibición (cm) en seis especies de hongos tratadas <i>in vitro</i> con aceite esencial de <i>Helietta parvifolia</i> obtenido del follaje colectado en diferentes localidades.	53
Cuadro 11. Comparación múltiple de medias. (Tukey) para el diámetro del halo de inhibición entre especies de hongos tratadas <i>in vitro</i> con aceite esencial de <i>Helietta parvifolia</i> obtenido del follaje colectado en diferentes localidades.	54
Cuadro 12. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el diámetro del halo de inhibición entre tratamientos aplicados a seis especies de hongos <i>in vitro</i> .	54
Cuadro 13. Análisis de varianza para el diámetro del halo de inhibición (cm) en seis especies de hongos tratadas <i>in vitro</i> con aceites esenciales de <i>Helietta parvifolia</i> obtenidos de follajes colectados en diferentes estaciones climáticas (abril, julio, octubre y enero).	56
Cuadro 14. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el diámetro del halo de inhibición entre especies hongos tratadas <i>in vitro</i> con aceites esenciales de <i>Helietta parvifolia</i> obtenidos de follajes colectados en diferentes estaciones climáticas.	56
Cuadro 15. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el diámetro de halo de inhibición entre tratamientos aplicados a seis especies de hongos <i>in vitro</i> .	56
Cuadro 16. Análisis de varianza para el número de colonias en seis especies de hongos tratadas <i>in vitro</i> con aceite esencial del follaje de <i>Helietta parvifolia</i> obtenido bajo diferentes condiciones.	58
Cuadro 17. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el promedio del número de colonias para la variable especies de hongos, tratadas <i>in vitro</i> con aceite esencial del follaje de <i>Helietta parvifolia</i> obtenido bajo diferentes condiciones.	59
Cuadro 18. Análisis de varianza para el número de esporas por gramo en semillas de cuatro especies tratadas con aceite esencial volátil de <i>Helietta parvifolia</i> , almacenadas a humedad relativa saturada durante ocho semanas.	60

Cuadro 19. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas por gramo entre especies de semillas tratadas con aceite esencial volátil de <i>Helietta parvifolia</i> , almacenadas a humedad relativa saturada durante ocho semanas.	61
Cuadro 20. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas por gramo entre tratamientos aplicados a cuatro especies de semillas almacenadas a humedad relativa saturada durante ocho semanas.	61
Cuadro 21. Análisis de varianza para el número de esporas por gramo en semillas de cuatro especies tratadas con aceite esencial por contacto, de <i>Helietta parvifolia</i> , almacenadas a humedad relativa saturada y ambiente durante ocho semanas.	64
Cuadro 22. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas por gramo entre tratamientos aplicados a cuatro especies de semillas almacenadas a dos niveles de humedad relativa durante ocho semanas.	64
Cuadro 23. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas por gramo entre tratamientos aplicados a cuatro especies de semillas almacenadas durante ocho semanas.	65
Cuadro 24. Análisis de varianza para el número de esporas por gramo en semillas de cuatro especies tratadas por contacto con aceite esencial <i>Helietta parvifolia</i> almacenadas durante ocho y cuarenta semanas a humedad relativa ambiente.	68
Cuadro 25. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas por gramo entre tratamientos aplicados a cuatro especies de semillas almacenadas a humedad relativa ambiente durante cuarenta semanas.	69
Cuadro 26. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas por gramo entre tratamientos aplicados a cuatro especies de semillas almacenadas a humedad relativa ambiente.	69
Cuadro 27. Análisis de varianza para el número de esporas por gramo en semillas de maíz tratadas con diferentes concentraciones de aceite esencial de <i>Helietta parvifolia</i> aplicado por contacto, almacenadas a humedad relativa saturada durante ocho semanas.	71

Cuadro 28. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas por gramo entre tratamientos aplicados a semillas de maíz var. NL.-V-S-2 almacenadas a humedad relativa saturada durante ocho semanas.	71
Cuadro 29. Análisis de varianza para el número de esporas por gramo en semillas de maíz tratadas por contacto con aceite esencial de <i>Helietta parvifolia</i> y el fungicida Captán almacenadas bajo condiciones de humedad relativa saturada y ambiente durante ocho semanas.	73
Cuadro 30. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas por gramo entre niveles de humedad en semillas de maíz var. NL-V-S-2 tratadas por contacto con el aceite esencial de <i>Helietta parvifolia</i> y el fungicida Captán, almacenadas durante ocho semanas.	74
Cuadro 31. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas por gramo entre tratamientos aplicados a semillas de maíz var. NL-V-S-2, almacenadas a dos niveles de humedad relativa durante ocho semanas.	74
Cuadro 32. Análisis de varianza para el número de esporas por gramo en semillas de maíz var. NL-V-S-2 tratadas con agua de arrastre obtenida de la destilación del follaje de <i>Helietta parvifolia</i> empleando diferentes métodos de aplicación, almacenadas a humedad relativa saturada durante ocho semanas.	77
Cuadro 33. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas por gramo entre tratamientos aplicados a semillas de maíz var. NL-V-S-2 almacenadas a humedad relativa saturada durante ocho semanas.	77
Cuadro 34. Análisis de varianza para el número de esporas por gramo en semillas de maíz VAR. NL-V-S-2 tratadas con diferentes proporciones de follaje deshidratado de <i>Helietta parvifolia</i> , almacenadas a humedad relativa ambiente durante ocho semanas.	80
Cuadro 35. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas por gramo entre tratamientos aplicados a semillas de maíz var. NL-V-S-2 almacenadas a humedad relativa ambiente durante ocho semanas.	80

INDICE DE FIGURAS

Figura No.	Página
Figura 1. Valores promedio del diámetro del halo de inhibición en la interacción de la variable modo de acción en cada una de las especies tratadas con aceite esencial de <i>Helietta parvifolia</i>	47
Figura 2. Valores promedio del número de colonias en la interacción de los tratamientos con cada una de las especies de hongos tratadas <i>in vitro</i> con agua de arrastre obtenida de la destilación del follaje de <i>Helietta parvifolia</i> .	49
Figura 3. Valores promedio del número de esporas en la interacción de los tratamientos con cada una de las especies de <i>Aspergillus</i> , tratadas <i>in vitro</i> con agua de arrastre obtenida de la destilación del follaje de <i>Helietta parvifolia</i> .	52
Figura 4. Valores promedio para el diámetro del halo de inhibición (cm) en la interacción de los tratamientos en cada una de las especies de hongos tratadas <i>in vitro</i> con aceites esenciales de <i>Helietta parvifolia</i> obtenidos de diferentes localidades.	54
Figura 5. Valores promedio para el diámetro del halo de inhibición (cm) en la interacción de los tratamientos en cada una de las especies de hongos tratadas <i>in vitro</i> con aceites esenciales de <i>Helietta parvifolia</i> obtenidos en diferentes estaciones climáticas.	57
Figura 6. Valores promedio del número de colonias entre especies de hongos tratadas <i>in vitro</i> con aceite esencial del follaje de <i>Helietta parvifolia</i> obtenido bajo diferentes condiciones.	59
Figura 7. Valores promedio del número de esporas por gramo en la interacción de los tratamientos con cada especie de semillas.	61
Figura 8. Fluctuación del número de esporas por gramo presentes en semillas de maíz var. NL-V-S-2, frijol var. Delicias, trigo var. Monterrey 78-100 y sorgo var. Melacero, tratadas con aceite esencial volátil de <i>Helietta parvifolia</i> , almacenadas a humedad relativa saturada durante ocho semanas.	62
Figura 9. Valores promedio del numero de esporas por gramo en la interacción de las especies de semilla con cada uno de los tratamientos.	65

Figura 10. Fluctuación en el número de esporas por gramo presentes en semillas de maíz tratadas con aceite esencial de <i>Helietta parvifolia</i> almacenadas a humedad relativa saturada y ambiente durante ocho semanas.	66
Figura 11. Fluctuación en el número de esporas por gramo presentes en semillas de frijol tratadas con aceite esencial de <i>Helietta parvifolia</i> almacenadas a humedad relativa saturad y ambiente durante ocho semanas.	66
Figura 12. Fluctuación en el número de esporas por gramo presentes en semillas de trigo tratadas con aceite esencial de <i>Helietta parvifolia</i> almacenadas a humedad saturada y ambiente durante ocho semanas.	66
Figura 13. Fluctuación en el número de esporas por gramo presentes en semillas de sorgo tratadas con aceite esencial de <i>Helietta parvifolia</i> almacenadas a humedad relativa saturada y ambiente durante ocho semanas.	66
Figura 14. Comparación de la Fluctuación del número de esporas por gramo presentes en semillas de maíz, frijol, trigo y sorgo tratadas con aceite esencial de <i>Helietta parvifolia</i> almacenadas a humedad relativa saturada y ambiente durante ocho semanas.	67
Figura 15. Valores promedio del número de esporas por gramo en la interacción de las especies de semillas con cada uno de los tratamientos.	69
Figura16. Valores promedio del número de esporas por gramo entre los tratamientos aplicados a semillas de maíz var. NL.-V-S-2 almacenadas a humedad relativa saturada durante ocho semanas.	71
Figura 17. Fluctuación en el número de esporas por gramo presentes en semillas de maíz var. NL-V-S-2 tratadas por contacto con diferentes concentraciones de aceite esencial de <i>Helietta parvifolia</i> almacenadas a humedad relativa saturada durante ocho semanas.	72
Figura 18. Valores promedio del número de esporas por gramo en la interacción de los tratamientos en cada uno de los niveles de humedad relativa.	74

- Figura 19. Fluctuación en el número de esporas por gramo presentes en semillas de maíz var. NL-V-S-2 tratadas con aceite esencial de *Helietta parvifolia* por contacto y el fungicida comercial Captán, almacenadas a dos niveles de humedad relativa durante ocho semanas. 75
- Figura 20. Valores promedio del número de esporas por gramo en semillas de maíz var. NL-V-S-2 tratadas con agua de arrastre obtenida de la destilación del follaje de *Helietta parvifolia* empleando diferentes métodos de aplicación, almacenadas a humedad relativa saturada durante ocho semanas. 77
- Figura 21. Fluctuación en el número de esporas por gramo presentes en semillas de maíz var. NL-V-S-2 tratadas con agua de arrastre obtenida de la destilación del follaje de *Helietta parvifolia* empleando diferentes métodos de aplicación, almacenadas a humedad relativa saturada durante ocho semanas. 78
- Figura 22. Valores promedio del número de esporas por gramo en semillas de maíz var NL-V-S-2 tratadas con diferentes proporciones de follaje deshidratado de *Helietta parvifolia*, almacenadas a humedad relativa ambiente durante ocho semanas 80
- Figura 23. Fluctuación en el número de esporas por gramo presentes en semillas de maíz var. NL-V-S-2 tratadas con diferentes proporciones de follaje deshidratado de *Helietta parvifolia*, almacenadas a humedad relativa ambiente durante ocho semanas. 81

INDICE DE TABLAS

Tabla No.	Página
Tabla 1. Por ciento de germinación de las semillas tratadas por contacto con el aceite esencial de <i>Helietta parvifolia</i> almacenadas a dos niveles de humedad relativa, durante ocho y cuarenta semanas.	70
Tabla 2. Por ciento de germinación de las semillas de maíz var. NL-V-S-2 tratadas por contacto con el aceite esencial de <i>Helietta parvifolia</i> y el fungicida comercial Captán, almacenadas a dos niveles de humedad relativa durante ocho semanas.	75
Tabla 3. Efecto del agua de arrastre obtenida de la destilación del follaje de <i>Helietta parvifolia</i> empleando diferentes métodos de aplicación, sobre el porcentaje de germinación de semilla de maíz var. NL-V-S-2 almacenada a humedad relativa saturada durante ocho semanas.	78

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema No.	Página
Esquema 1. Evaluación del efecto fungicida del aceite esencial de <i>Helietta parvifolia</i> por contacto y volatilidad en cajas petri conteniendo placas de papa-dextrosa.agar.	32
Esquema 2. Evaluación de la acción protectora del aceite esencial volátil de <i>Helietta parvifolia</i> sobre semillas almacenadas a humedad relativa saturada en minicamaras de almacenamiento.	37
Esquema 3. Evaluación de la actividad fungicida del agua de arrastre de <i>Helietta parvifolia</i> sobre semillas de maíz var. NL-V-S-2 empleando diferentes métodos de aplicación.	41

INTRODUCCION

El hombre en su afán de obtener productos vegetales diversos que satisfagan sus necesidades de alimentación, vestido y otras de menor importancia, ha descubierto innumerables factores que disminuyen y en casos extremos, aniquilan totalmente los rendimientos de sus cultivos. Entre estos factores, primordialmente se encuentran las plagas y enfermedades vegetales.

Un tercio de la producción mundial de alimentos es destruida por estos factores durante su crecimiento, cosecha y almacenamiento. Sobre éste último punto, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, estima que a escala mundial se pierde el 5% de las cosechas de semillas, dichas pérdidas son mayores en relación indirecta al desarrollo tecnológico del país o de la región, señalando que las mermas poscosecha para África y Latinoamérica son del orden del 15 al 40% de lo cosechado. En México no existen datos estadísticos oficiales que indiquen la cantidad de pérdidas anuales en semillas almacenadas, sin embargo se estima que éstas fluctúan entre el 5 y 25% de acuerdo a la zona del país de que se trate, ya que las condiciones ecológicas y la carencia de tecnologías adecuadas propician la presencia de insectos, hongos y roedores que dañan el grano, causando mermas significativas tanto en el aspecto económico como en la calidad nutricional, industrial y sanitaria de los mismos (Colín, 2002).

El problema del deterioro y pérdidas en poscosecha es de particular importancia para los agricultores de subsistencia, ya que su producción forma parte de los alimentos básicos que consume la familia durante todo el año. La parte no consumida la comercializan para adquirir otros productos que les son indispensables para su vida cotidiana. Las consecuencias sociales por lo tanto, del ataque de enfermedades vegetales en México, han contribuido durante siglos a la miseria de los campesinos, un cambio obligado de cultivos y una agricultura nómada, mientras que las de orden económico se pueden medir en términos de abatimiento cuantitativo y cualitativo de las cosechas, costos en medidas preventivas y terapéuticas, así como limitaciones de las áreas de cultivo (Toledo *et al* 1989, Altieri, 1999).

El uso de compuestos químicos para el control de enfermedades, en especial las de origen fungoso, actualmente es de gran importancia económica, reportándose a nivel internacional en las décadas de los ochentas y noventas la utilización anual de aproximadamente 24,500 toneladas de ditiocarbamatos y de 224,000 de compuestos cúpricos (Lyons *et al* 1990, Zalomon *et al* 1990, Acquah 2002). En México, el control químico de estos fitopatógenos es aplicado frecuentemente en cultivos de alto valor económico; desafortunadamente en ocasiones su empleo no es el adecuado habiendo tendencia en algunas zonas del país, especialmente en las de mayor desarrollo agrícola, al uso indiscriminado de ellos y/o en dosis más altas de las necesarias, hecho que influye sobre el desarrollo de resistencia genética de los hongos a estos. Al respecto, la

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura afirma también que el uso prolongado y extensivo de fungicidas, especialmente los de alta residualidad, ha conducido a un deterioro ambiental, con efectos nocivos sobre diferentes organismos, tanto de hábitats acuáticos como terrestres, micro y macroscópicos. Así mismo, es también importante el peligro de residualidad tóxica en productos alimenticios, cuyos efectos sobre humanos son conocidos aún cuando se maneje solo la cantidad del ingrediente activo dentro del nivel de tolerancia permitido, pudiéndose presentar un efecto nocivo por acumulación o uso prolongado (Diouf, 2003).

Por lo tanto ante la perspectiva anterior es importante reflexionar sobre las ventajas de buscar y utilizar productos de origen natural, como son los extractos de plantas superiores, que ejercen su acción a dosis bajas, los que se han convertido en una alternativa orgánica muy importante ya que son estables en su acción, de baja o nula residualidad y a la vez biodegradables. Además, se propone que se puedan obtener bajo condiciones de tecnología simple y su aplicación a nivel de campo sea accesible para los agricultores, sobre todo por aquellos de escasos recursos económicos (Suquilanda,1996).

Las zonas del noreste de México han sido ampliamente estudiadas desde el punto de vista botánico y fitoquímico, analizando los ecosistemas buscando en ellos substancias naturales con efectos fungicidas que resuelvan problemas fitopatológicos de interés agrícola.

Esta investigación presenta los resultados de los estudios realizados a *Helietta parvifolia* (Gray) Benth, especie alelopática que forma parte de la flora del matorral submontano en el noreste de México. El objetivo fue evaluar la actividad fungicida de extractos obtenidos del follaje, así como del follaje *per se* y su aplicación en la protección de semillas almacenadas, como una alternativa tecnológica en el desarrollo de una agricultura orgánica.

LITERATURA REVISADA

Enfermedades de poscosecha, importancia en semillas almacenadas y su control

Los cereales dominan de una forma u otra la producción agrícola del mundo, aportan la gran masa de materias nutricias para el hombre y son un alimento básico capital. De igual manera las leguminosas tradicionalmente en muchas regiones del mundo son altamente apreciadas por el valor nutricional de sus semillas las que constituyen una fuente de proteínas de gran calidad, razón por la cual son de uso común y constituyen parte importante de la dieta (Acquaah, 2002).

El grano se cosecha generalmente una, y en algunas zonas tropicales hasta dos veces al año. No obstante se consume durante todo el año. Por lo tanto, prácticamente toda la producción ha de ser almacenada. El almacenamiento puede variar, desde el simple vertido del grano sobre el suelo o sobre las calles a la intemperie, hasta el almacenamiento sobre grandes estructuras de cemento equipadas de forma que se puede bascular un vehículo de carga para vaciarla en cuestión de minutos. Generalmente se apila el grano sobre el suelo, solamente durante la temporada de recolección, cuando el equipo de transporte queda escaso. Aún cuando las pérdidas en productos succulentos es más común y aparece en las tiendas minoristas o en casas, la pudrición de los cereales y leguminosas también es muy común y las pérdidas que produce son bastante considerables por su magnitud, las que se presentan a nivel de grandes

almacenes o depósitos de agricultores o comerciantes razón por la cual rara vez son observadas por el público en general (Serna, 1996; Agrios, 1997).

Los cereales son huéspedes de gran número de especies, tanto los microorganismos que invaden toda la semilla, como los que son contaminantes superficiales. Los hongos son los principales microorganismos de la microflora presentes en los granos almacenados y constituyen la más importante causa de pérdidas y deterioro durante el almacenamiento; prefieren ambientes o substratos con alto contenido de humedad y son los agentes responsables por el gran aumento de la respiración de los granos húmedos. Por lo general, los hongos que atacan los granos se dividen en dos grupos: hongos de campo y hongos de almacenamiento (Serna, 1996; Acquaah, 2002).

A los hongos que contaminan los granos antes de la cosecha, durante su desarrollo en la planta, o después de que es segado y amontonado antes de ser trillado se les denominan de campo. Las especies que predominan varían de acuerdo con el hospedero, la cosecha, la región o localización geográfica y el clima, siendo los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium*, *Rhizopus* y *Fusarium*, sus representantes mas frecuentes. Estos hongos necesitan para su desarrollo un alto contenido de humedad, esto es, granos en equilibrio con una humedad relativa ambiente entre 90 y 100 por ciento, condiciones que permiten la sobrevivencia de las esporas durante mucho tiempo; sin embargo, no germinan cuando el contenido de humedad de las semillas está en equilibrio con

humedades relativas inferiores al 75 por ciento. Los hongos de campo pueden provocar pérdida de la coloración natural y del brillo de los granos, con lo que se reduce el valor comercial del producto. En las semillas, además de reducir el poder germinativo y el vigor, pueden ocasionar putrefacción de las raíces y otras enfermedades de las plantas. Los hongos de almacén se desarrollan después de la cosecha, cuando el contenido de humedad de los granos está en equilibrio con una humedad relativa ambiente superior al 65 o 70 por ciento, comprenden con mayor frecuencia cerca de una docena de especies del género *Aspergillus* de las cuales cinco son las más comunes, una sola especie de *Penicillium*, una de *Sporendonema* y algunas especies de levaduras. En silos y bodegas, los daños causados por los hongos del almacenamiento son mayores que los producidos por los hongos de campo. Las condiciones que influyen en el desarrollo de los hongos del almacén en semillas almacenadas son las siguientes: 1) contenido de humedad; 2) temperatura; 3) período de tiempo de almacenamiento; 4) grado de invasión por hongos de almacén que se presenten antes de su arribo a un determinado sitio; 5) cantidad de material extraño presente en ellas, y 6) actividades de insectos y ácaros. El contenido de humedad mínimo requerido en algunos casos puede ser tan bajo como de 13 hasta 19%, por ejemplo para el desarrollo de para el desarrollo de *Aspergillus restrictas*, *A. glaucus* *A. candidus* *A. flavus* y *Penicillium* en semillas de maíz, y las temperaturas mínimas desde -5 hasta 15 °C, y óptimas entre 20 y 50 °C (Christensen, 1974; Serna, 1996; Acquaaah, 2002).

Además de las diferentes prácticas básicas ampliamente conocidas de manejo poscosecha para evitar el desarrollo de hongos en las semillas, también pueden tratarse con compuestos químicos fungicidas para contrarrestar el ataque de patógenos que se encuentren en su superficie o en el interior. Los productos pueden aplicarse por espolvoreo, pasta acuosa mezclada con las semillas, o bien estas últimas pueden humedecerse en una solución acuosa que contenga al compuesto químico para finalmente dejarlas que se sequen (Agrios, 1997). Al efectuar los tratamientos de la semilla el compuesto debe de quedar completamente adherido sin afectar la viabilidad de la misma; los productos empleados son principalmente compuestos inorgánicos de cobre o de zinc o compuestos orgánicos como el captán, carboxin, oxicarboxin, chloroneb, clorotalonil y otros, incluyendo antibióticos como la estreptomina agrícola. (De la Isla, 1987). En particular el captán (CISN-(triclorometil) tio)-4-ciclohexen-1,2 dicarboximida) es un producto que fue introducido en 1953 y actúa como un compuesto protector de las semillas de gramíneas, pertenece al grupo de las carboximidias de contacto. Se reporta que alrededor de 304,000 Kg son usados anualmente en los Estados Unidos para el tratamiento de semillas de maíz (Rosenstein 1993, Pedersen *et al* 1986, Barberá 1976).

Fungicidas agrícolas

Naturaleza.- Los primeros materiales empleados por el hombre como fungicidas fueron el azufre y sus derivados, popularizándose su empleo en los siglos XVII y XVIII al utilizarse el sulfato de cobre para el control de numerosos

carbones y la mezcla de cal y azufre para la cenicilla de los frutales. A finales del siglo XIX el descubrimiento del caldo bordelés para el control del Mildiú de la vid y de otras enfermedades, hizo que el control químico adquiriera gran relevancia. En los siguientes años se desarrollaron otros fungicidas inorgánicos a base de cobre y de azufre, siendo un hecho importante el descubrimiento de las propiedades fungicidas de los ditiocarbamatos realizado en 1930. En 1966 se consignó al grupo de las oxantinas como compuestos fungicidas de acción sistémica con lo cual se inició una nueva etapa en el control de enfermedades por métodos químicos. Los fungicidas utilizados en el control de fitopatógenos varían en cuanto a su espectro de acción dependiendo de sus propiedades químicas, siendo de restringido o amplio espectro en base al número de especies de hongos controlados; así como también, en cuanto a su origen químico se presentan los naturales y los sintéticos (Agrios, 1997; Oerke, *et al* 1999).

En México están registrados ante la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Substancias Tóxicas un total de 45 fungicidas agrícolas (de los cuales 22 tienen efectos adversos contra el medio ambiente después de hacer pruebas a nivel de laboratorio, predominando la toxicidad a peces y en casos particulares a organismos acuáticos, abejas, organismos de sangre caliente), divididos en dos grupos: los de acción local y los de acción sistémica; dentro de los primeros están los aceites (CICOPLAFEST, 1993).

Modo de acción.- Los fungicidas actúan reduciendo, desplazando o eliminando el inóculo en su fuente (erradicación), previniendo la enfermedad (protección), o curándola (terapia), la gran mayoría implica el principio de protección, impidiendo que el inóculo penetre en el huésped para producir la infección . La mayoría de los compuestos químicos tienen exclusivamente acción protectora externa cuyo efecto se manifiesta sólo en el área en que se aplican, y su eficacia es superficial. Sin embargo, ciertas sustancias, entre ellas, algunas volátiles pueden penetrar, dentro de ciertos límites, en los tejidos vegetales y ejercen acción terapéutica al erradicar al patógeno (NAS, 1980).

Selectividad.- Aunque la palabra fungicida sugiere como tal, a un compuesto no selectivo, que inhibe el desarrollo de todos los hongos, no es este el caso en la naturaleza, ya que existen diferencias muy marcadas en su actividad entre clases, familias, géneros y especies de este grupo; aún en compuestos inhibidores de multisitio como las quinonas. Solamente se apartan de una actividad selectiva agentes biocidas fuertes, tales como los derivados fenólicos (Lyr, 1987).

Los puntos fundamentales que debe de ofrecer un fungicida agrícola en el momento de su aplicación son: ser efectivo a concentraciones bajas, poseer acción selectiva, respetar a los predadores, controlar a las enfermedades y afectar lo menos posible al medio ambiente.

Agricultura orgánica

La agricultura orgánica, se define como una visión sistémica de la producción agrícola que usa como guía los procesos biológicos de los ecosistemas naturales, habiendo quienes sostienen que es una visión holística de la agricultura que promueve la intensificación de los procesos naturales para incrementar la producción; también puede definirse como una forma por la que el hombre puede practicar la agricultura acercándose en lo posible a los procesos que se desencadenan de manera espontánea en la naturaleza. Este acercamiento presupone el uso adecuado de los recursos naturales que intervienen en los procesos productivos, sin alterar su armonía. Por otra parte al constituirse en una visión holística de la agricultura, no solamente toma en cuenta los aspectos puramente técnicos del proceso productivo, sino que también le preocupa la situación social y económica de quienes están involucrados en su práctica, pues además de producir alimentos sanos y suficientes para satisfacer las demandas alimentarias del productor, de su familia y de los mercados, debe tratar de manera justa a quienes laboran para ello (Suquilanda, 1996).

En México se distinguen dos tipos de agricultura: una dedicada fundamentalmente a la producción de cultivos destinados a alimentos balanceados o productos de exportación, esto es, un sector asentado en las mejores tierras, con infraestructura, capital y alta tecnología, la otra, con pocos recursos, en la que participan la mayoría de los campesinos temporaleros, una agricultura tradicional

íntimamente relacionada con la naturaleza, la cual tiene la responsabilidad de la producción de los alimentos básicos para consumo nacional (Toledo *et al*, 1989).

Partiendo de la base de que la agricultura en México en un rango del 30% al 40% la desarrollan los agroindustriales y entre un 60 a un 70% los agricultores rurales, es importante por lo tanto una intensificación de este último tipo de desarrollo, aplicando para ello patrones diferentes y originales, no tomándose el modelo extensivista y alterante de los ecosistemas representado por la agricultura americana (convencional), sino la experiencia de la modernización de la agricultura europea (ecológica), así como retomar los modelos agrícolas autóctonos, lo que da como resultado la aplicación de una agricultura orgánica, la que propone entre otras técnicas el uso de metabolitos secundarios con propiedades pesticidas para fines de protección fitosanitaria; el uso de estos compuestos toma una gran importancia en la protección de granos almacenados, ya que si se logra poner a disposición de este tipo de campesinos un paquete tecnológico alternativo que incluya la obtención sencilla de extractos a partir de plantas silvestres presentes en su ecosistema de trabajo, cuyas propiedades pesticidas estén ya determinadas científicamente, por una parte se estará validando técnicas agrícolas autóctonas ancestrales (no se puede negar, por la información vernácula existente), y por otro lado, definitivamente se logrará abatir la falta de recursos económicos para la compra de otro tipo de insumos, que a largo plazo ha traído como ya se mencionó, una serie de disturbios ecológicos graves (Toledo *et al*, 1989; Suquilanda, 1996; Altieri, 1999).

Un ejemplo de lo anterior lo reporta en Nigeria, Poswal y col. en 1992, quienes indicaron el uso por parte de pequeños productores de métodos alternativos para el control de problemas de almacenaje de las cosechas, entre los cuales se involucra el empleo de extractos vegetales, aceites esenciales y ahumado entre otros, durante los últimos 10 años.

Metabolitos secundarios vegetales alelopáticos

Los antecedentes sobre estudios de ecofisiología química de las plantas se remontan a los estudios de De Candolle (1832) sobre inhibidores de origen vegetal y alelopáticos. Mas tarde, los estudios de Garb (1961), Bonner (1950), así como los de Gray y Bonner (1948), provocaron gran interés sobre el concepto de alelopatía, uno de los fenómenos ecoquímicos que controlan la distribución de la vegetación en algunas regiones. Aunque el fenómeno alelopático *per se* no tiene aplicación agrícola, es interesante hacer notar que una planta alelopática tiene altas posibilidades de convertirse en una planta útil. Se ha definido este término como la interacción bioquímica benéfica o perjudicial entre todos los tipos de plantas, incluyendo a los microorganismos. Desde el punto de vista evolutivo, la alelopatía puede considerarse tanto una adaptación como un accidente que confiere supervivencia a las especies, a través de la liberación de uno o varios compuestos químicos secundarios al medio, los que pueden ser estimulantes o inhibidores tanto a los microorganismos como a las plantas superiores presentes en el medio. El palabra alelopatía raramente se encuentra en la literatura fitopatológica; sin embargo, el desarrollo y morfogénesis de los patógenos, el

antagonismo entre patógenos, el desarrollo de los síntomas de la enfermedad y la resistencia de la planta hospedera a los patógenos, implican de una manera u otra agentes alelopáticos (Salisbury, *et al* 1994).

México es uno de los países con mayor diversidad vegetal en el mundo, estimándose que tiene entre 23,000 y 30,000 especies de plantas de las cuales, se utiliza una mínima cantidad (Sarukhan, 1995). Se presentan plantas endémicas en todos los tipos de climas que existen en la república y empíricamente se les ha dado a algunas una utilidad. La investigación del fenómeno alelopático se ha efectuado en muchos ecosistemas de los estados del centro y parte del noroeste (Estado de México, Michoacán, San Luis Potosí, Puebla, Nayarit, Veracruz, Tabasco, Chiapas, Oaxaca, Yucatán, Sinaloa, Sonora, Chihuahua) con resultados muy prometedores en cuanto a su potencial aplicación en la agricultura. La presencia de este fenómeno en las plantas superiores ha sido utilizado para la búsqueda de compuestos que muestren un potencial plaguicida, los que podrían ser empleados dentro de las medidas de control de fitopatógenos de importancia.

Metabolitos secundarios y su potencial fungicida.- Los agentes alelopáticos son metabolitos secundarios, los que a su vez son sustancias complejas resultado de un metabolismo secundario en el que se producen terpenoides, glicósidos cianogénicos, alcaloides y compuestos aromáticos dentro de los cuales se encuentran los fenoles, quinonas, cumarinas, terpenoides, flavonoides y taninos; de quienes se desconoce si son productos finales del metabolismo como resultado

de una evolución, o productos de deshecho. Independientemente de su origen, estos compuestos son potencialmente autotóxicos y por lo tanto, deben de ser liberados de la planta en alguna forma (Putnam y Duke, 1978; Salisbury *et al*, 1994).

Por lo que respecta al uso potencial de extractos y aceites esenciales vegetales como fungicidas de fitopatógenos, se han hecho innumerables estudios para evaluar su efectividad desde 1959 cuando Marusella y Baltter probaron 119 aceites esenciales sobre 12 fitopatógenos entre ellos especies de *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Botrytis* y *Claviceps*, un 80 % de ellos inhibieron a *Claviceps purpurea* y el 58% a *Alternaria tenuis* quién mostró ser más resistente. Posteriormente, en 1963 Barnes reportó la propiedad fungicida de aceites esenciales sobre el hongo causante de la roña del nogal causada por *Fusicladium effuscum*, cuyos resultados *in vitro* competían positivamente con los obtenidos por fungicidas comerciales. Fukui y colaboradores (1972) publican haber evaluado dos compuestos tóxicos obtenidos de frutos inmaduros de *Lupinus luteus* (Leguminoseae) sobre un grupo de 14 microorganismos, demostrando que presentan un elevado poder fungicida. Grant y Clebsch (1975) así como Feeney (1976) trabajaron con extractos de diferentes especies de la familia Compositae ricos en terpenos, observando que actúan óptimamente como fungicidas. En resumen, los estudios realizados sugieren que la actividad antifúngica de los metabolitos vegetales secundarios es un fenómeno frecuente, de la información recabada por Grainge y Ahmed en 1988 se desprende que existían hasta esa

fecha alrededor de 400 plantas reportadas con propiedades para inhibir el desarrollo de 142 especies de hongos fitopatógenos, clasificadas taxonómicamente dentro de 50 familias destacando algunas de ellas como Asteraceae, Fabaceae y Brassicaceae.

Naturaleza de los metabolitos secundarios con potencial fungicida y factores que influyen en su producción.- Los metabolitos pueden ser obtenidos de los diferentes órganos y tejidos vegetales por diversos métodos y según sea el utilizado, el producto obtenido se caracteriza como: aceite esencial, extractos crudos, acuosos y clorofórmicos; dentro de todos estos se han encontrado metabolitos que presentan acción fungicida, dividiéndose en dos grupos: aquellos que presentan un amplio rango de acción, y los de acción específica, predominando estos últimos (Montes-Belmont, 1996).

En el grupo de aceites fungicidas están clasificados los aceites esenciales, caracterizándose por ser de origen vegetal, solubles en agua, aromáticos y constituidos químicamente por mezclas de pequeñas moléculas orgánicas (a lo que deben su volatilidad) de terpenos, aldehidos y ésteres, los que se obtienen por arrastre en corriente de vapor de agua, encontrándose almacenados en órganos y estructuras anatómicas muy diversas. Un aceite esencial suele poseer de diez a quince componentes principales y otros tantos muy escasos, o trazas. El número y tipo de componentes, así como sus proporciones, pueden experimentar importantes cambios dentro de una misma especie botánica, sea por razones

ecológicas (luz, temperatura, altitud), agronómicas (época de corte, fertilización) o puramente genéticas (quimiotipos o variedades químicas) (García Vallejo, 1988).

Se ha determinado también que la variabilidad cualitativa y cuantitativa de los metabolitos, cambia en los diferentes órganos donde son producidos: raíz, tallo, hojas, flores y fruto e inclusive pueden estar ausentes en uno o varios de ellos. Ejemplo de lo antes mencionado es lo propuesto por Zangerl y Bazzaz en 1992, quienes indican que las condiciones ambientales pueden ser determinantes ya que la producción de un metabolito puede ser alta en una estación del año y escasa en otra; tal es el caso por ejemplo de la “gobernadora” *Larrea tridentata* (Hurtado *et al*, 1981), planta típica del noreste de México quien disminuye la producción de alcaloides y los aceites esenciales alelopáticos en el verano, como respuesta a las altas temperaturas. Svoboda, *et al* (1990), en contraste, reportan los resultados sobre el análisis del aceite volátil obtenido a partir de la *Satureja hortensis* (Ajedrea) creciendo durante la estación de verano en el oeste de Escocia que fue comparado durante cuatro estaciones contrastantes mostrando que, sin excepción, la calidad y cantidad del aceite producido fueron de un estandar aceptable. Este grupo de investigadores estudiaron además el estado fenológico como factor de influencia, determinando que el tiempo óptimo de cosecha para el rendimiento máximo y buena cantidad de aceite se encontró del inicio hacia la mitad de la floración, observándose que las condiciones secas y calientes no alteraron el contenido del aceite. Los trabajos de Itieva, (1990) con *Salvia sclarea* añaden a los factores antes citados la influencia de la geografía, al

estudiar tres diferentes regiones ecológicas de Bulgaria: (i) Samokov (1050 m de altitud), (ii) Sofia-Vranya (550 m) y (iii) Kazanluk (380 m), llevándose a cabo el monitoreo en diferentes fases del desarrollo de la planta, determinándose la calidad y el rendimiento del aceite esencial; los resultados indican que el contenido del aceite esencial fue superior (0.18-0.23%) en la estación de Kazanluk (380 m), mientras que la calidad del aceite esencial (expresada como contenido de acetato de linalil) fue superior (63-78%) en la estación de Samokov (1050 m de altitud).

Influencia de los factores botánicos y estacionales en la acción fungicida de los aceites esenciales.- Arras y Grella en 1992 al hacer una investigación sobre los cambios cualitativos y cuantitativos del aceite esencial de *Thymus capitatus* creciendo silvestremente en la región de Sardinia los que fueron estudiados mensualmente por un período de dos años (1987-1988); los hongos sobre los que fue probado fueron *Penicillium italicum* y *Alternaria alternata* los resultados mostraron que la máxima producción del aceite ocurrió en el mes de agosto ya sea que se usaran para su obtención hojas, flores o residuos de infrutescencias; el aceite provocó un efecto fungistático sobre *P. italicum* y fungicida a 400 ppm sobre *A. alternata* .

Dentro de los estudios efectuados a los aceites esenciales con potencial fungicida se ha investigado su acción selectiva, como es el caso de lo publicado por Mwangi y col. (1994), quienes probaron los aceites obtenidos de varias especies de *Lippia* sp. sobre *Colletotrichum coffeanum*, *Fusarium solani*,

Cercospora spp. y *Aspergillus spp.* mostrando una fuerte actividad fungicida sobre *Colletotrichum coffeanum*.

La efectividad de los aceites esenciales vegetales ha sido comparada con la de fungicidas comerciales tal fue el caso del aceite esencial obtenido de rizomas de *Curcuma longa* a diferentes concentraciones sobre *Aspergillus flavus*, utilizando al fungicida comercial Benlate como testigo, observando que se presentó una total inhibición del crecimiento del hongo a concentraciones del aceite de 0.025, 0.05 y 0.1% en comparación con las mismas del fungicida comercial (Ishrat-Niaz, 1994).

Investigaciones sobre el potencial fungicida de aceites esenciales para el control de hongos de poscosecha.- Mishra *et. al.* en 1990 probaron el aceite esencial obtenido de hojas frescas de nueve especies de plantas colectadas en Varanasi, India a 5000 ppm contra el hongo de almacén *Aspergillus flavus*. El porcentaje de inhibición mostrado fue de 100% por *Amomum subulatum*, 85% por *Aegle marmelos*, *Ageratum houstonianum*, *Alpinia galanga* y *Lippia alba*, 70% por *Curcuma longa*, 66.6% por *Artemisia vulgaris*, 60% por *Elettaria cardamomum* y 54% por *Salvia plebeia*. Posteriores investigaciones realizadas con el aceite de *A. subulatum* mostraron que la concentración inhibitoria mínima fue de 3000 ppm; las pruebas de germinación efectuadas a las semillas de arroz tratadas con estos aceites mostraron que no se presentaba un efecto negativo sobre las mismas. Este mismo grupo de investigadores publicó posteriormente en ese mismo año los

resultados obtenidos de la investigación realizada con hojas de 15 plantas superiores entre las cuales las de duraznero inhibieron completamente el desarrollo de *Aspergillus flavus*. El aceite no fue fitotóxico para la germinación de las semillas y el crecimiento de plántulas de trigo.

Gangrade y col. en 1991, determinaron la actividad *in vitro* contra *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium sp.* de los aceites esenciales obtenidos a partir del follaje de *Cymbogonum martinii var. motia*, de semillas de *Pimpinella anisum* y raíces de *Vetiveria zizanooides*. Cuatro diluciones de dimetilsulfóxido (1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10,000) fueron comparadas con el aceite puro; así como la cicloheximida y el hamicin fueron usados como fungicidas testigo. Los aceites puros de las tres especies inhibieron el crecimiento de los patógenos de un 70 a 80%, comparado con los testigos. Garg y col. en 1991 probaron la actividad antifungal del aceite esencial de *Capilhipediura foetidum* obtenido de inflorescencias frescas y probado sobre *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. candidus* y *A. ochraceus*, la griseofulvina fué usada como testigo al determinar la actividad antifungal del aceite quién mostró excelente actividad a una dilución baja de 1:200.

Singh *et al* en 1992 investigaron aceites esenciales extraídos de seis plantas con propiedades alelopáticas de las cuales *Callistemon citrinus*, *Eucalyptus tereticornis*, *Ageratum conyzoides*, y *Ocinum kelmandescherium* inhibieron el crecimiento de *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A.*

parasiticus, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum truncatum* y *Helminthosporium tericum*.

Acción fungicida de aceites esenciales volátiles.- En particular investigaciones sobre la actividad antifungal de aceites esenciales volátiles son reportadas por Dubey en 1991 al investigar el efecto volátil y no volátil de los aceites obtenidos del epicarpio de toronja y de hojas frescas de *Ocimum canurn* (*O. americanum*) y *Pinus roxburghii* sobre la germinación de esclerocios viables de *Macrophomina phaseolina*. El aceite esencial de *O. americanum* fue el más tóxico mostrando solamente el 5% de esclerocios germinados a una concentración de 0.05%. Los esclerocios expuestos a 0.3% del aceite esencial de toronja y *P. roxburghii* tuvieron un rango de germinación de 25 y 28% respectivamente. Esto ha sugerido la aplicación del aceite esencial durante el almacenamiento de semillas siendo de mucha ayuda para eliminar la sobrevivencia del inóculo en las mismas. Del mismo modo Tiwari y Dixit (1994) reportan la actividad fungicida de los gases emitidos por algunas plantas superiores sobre hongos de almacén indicando que el vapor emitido por la corteza de *Cinnamomum zeylanicum* inhibió completamente el crecimiento micelial de *Aspergillus flavus* y *A. niger* y fue el vapor mas efectivo de 20 especies probados contra el crecimiento de estos hongos.

Investigaciones sobre la actividad fungicida de los componentes químicos de los aceites esenciales.- Takur y col. en 1989 realizaron estudios *in vitro* de

actividades antifungales de seis aceites esenciales aromáticos obtenidos de *Ocimum gratissimum*, *O. viridae*, *O. canum* (*O. americanum*) *O. basilicum*, *Cymbopogon winterianus* y *C. martinii* var. *motia* en donde el eugenol, timol, linalol, metil cavicol, citronela y geraniol respectivamente, fueron probados. Los resultados mostraron que el eugenol al 0.1% provocó un halo de inhibición sobre *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia spp.* y *Alternaria alternata*, el timol inhibió a *R. solani* y *S. rolfsii*, el linalol inhibió el crecimiento de *R. solani* mientras que el aceite de citronela inhibió a *S. rolfsii*, al igual que el geraniol para *R. solani*. *S. rolfsii*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia spp.* Garg y Siddiqui (1992) reportan los efectos del cumaldehído aislado del aceite esencial de las semillas de *Cuminum cyminum*; del 1-8-cineol aislado del aceite de los frutos de *Luvunga scanders* y del cariofileno y el eugenol aislado a partir del aceite de las hojas de *Ocimum sanctum* sobre *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Absidia glauca*, *Colletotrichum capsici*, *Fusarium moniliforme*, *Helminthosporium orizae*, *Phytophthora parasítica*, *Penicillium expansum*, *Pestalotia psidii*. El concentrado y las diluciones del cumaldehído mostraron una muy buena actividad al probarse contra *A. niger*, *C. capsici*, *A. alternata*, *P. psidii*, *F. moniliforme* y *P. expansum* comparado con la griseofulvina a 1000 ppm. El eugenol presentó una actividad fuerte contra *A. Níger*, *C. capsici*, *F. moniliforme* y *P. psidii* en todas las diluciones. El cariofileno mostró una fuerte actividad antifungal contra *A. glauca* en todas las diluciones. El 1, 8-cineol presentó una muy buena actividad contra *A. alternata* y *F. moniliforme* y una actividad de buena a moderada contra el resto de los hongos tratados. En un análisis químico y espectrofotométrico del aceite esencial de *Cupressus*

sempervirens y de *Algeria cypress* llevado a cabo por Chanegriha y col. (1994) reportan la identificación de 70 compuestos, entre los que predominaban en mayor cantidad el alfa-pineno, el delta-3-careno, el limoneno y el acetato de terpenilo, su actividad antifungal contra *Fusarium oxysporum* fue investigada mostrando ser inhibido por el alfa-pineno y el delta-3-careno, no mostrando actividad fungicida el limoneno y el acetato de terpenilo.

Investigaciones sobre la actividad fungicida de extractos vegetales acuosos.- Extractos acuosos fueron investigados por Figueroa y col. en 1997 quienes indican que se probaron los extractos obtenidos de 58 especies de plantas sobre la germinación de esporas, desarrollo del micelio y protección de granos de maíz contra *Aspergillus flavus*. Los extractos que inhibieron la germinación de esporas fueron *Chenopodium album* (80%), *Ficus tecualensis* (75%), *Raphanus raphinistrum* (80%) y *Larrea divericata* (80%), se concluye que los extractos actúan eficientemente sobre los procesos fisiológicos del hongo. Montes en 1995 indica que se probaron los extractos de 52 especies de plantas para determinar su efecto sobre la germinación de esporas, desarrollo micelial y protección de granos de maíz atacados por el hongo *Aspergillus flavus*. El follaje de las plantas se secaron y se pulverizaron; con los polvos se elaboraron extractos acuosos al 2%. Los resultados mostraron que se redujo la contaminación de granos de maíz con *Psidium guajava* en un 23%, *Rosmarinus officinallis* en un 61%, *Coleus blumei* en un 40.5%, *Lantana camara* en un 20% y *Coffea arabica* en un 43%, se concluyó

de esta investigación que la protección del grano se debió a la cobertura del extracto.

Montes en 1999 en base a la poca eficacia mostrada por el fungicida Captán en la protección de semilla comercial de sorgo contaminada con *Fusarium moniliforme* probó el uso de extractos acuosos, alcohólicos y polvos obtenidos de epazote, orégano, clavo, canela, tomillo, así como el bicarbonato de sodio (Bna), sobre semillas contaminadas con el hongo para determinar su acción fungicida, dejando como testigo al mismo Captán; observando que los mejores resultados fueron con el polvo en la combinación clavo+Bna.

Estudios realizados a Helietta parvifolia

La “barreta”, “barreto” o “palo blanco” *Helietta parvifolia* Gray (Benth) es un arbusto originario del noreste de México, se presenta formando parte de la flora dominante del matorral submontano citado por Rzedowsky, encontrándose distribuida en la parte sur del estado de Texas a unos cuantos kilómetros al este del Río Grande en los E.U.A., donde originalmente era muy abundante. En México se reporta su presencia en las laderas o porciones bajas de la altiplanicie y en las vertientes este y oeste de la parte norte de la Sierra Madre Orienta en los estados de Hidalgo, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas y Nuevo León. En el estado de Nuevo León donde esta planta en particular recibe el nombre común de barreta, se localiza en las laderas de la Sierra Madre Oriental en los municipios de Monterrey, Hualahuises, Santiago, Allende, Montemorelos, Rayones, Linares,

Gral. Terán, General Bravo, China, Villa Juárez, Cadereyta, Los Ramones y Doctor González; así como también, en las sierras de Lampazos, La Iguana, Minas Viejas, Del Fraile y Las Minas y en las estribaciones orientales de Sierra de Picachos (Correl y Johnston, 1970; Rzedowski, J. 1978).

Es un arbusto sin espinas, que llega a medir de 2 a 4 metros de altura. La corteza de sus ramas y troncos es de color café pálido y lisa. Presenta hojas opuestas, trifoliadas de 35 a 50 cm de largo siendo en su mayoría glabras, pueden ser sésiles o casi sésiles, generalmente oblongas u ovadas, pero en ambos casos redondeadas en el ápice. Las flores se agrupan una inflorescencia tipo panícula, son terminales perfectas y pequeñas, con un cáliz seccionado en 3 o 4 partes de 2mm de ancho con 3 o 4 pétalos imbricados en botón, elípticas de 2.5 a 3mm de largo con 3 a 4 estambres y ovarios de 3 a 4 lobulosos frutos presentan 3 a 4 carpelos indehiscentes de tipo sámara, que se separan en la madurez, alados en la parte dorsal, de 10 a 15 mm de largo, con 2 óvulos en cada cavidad, quedando las semillas solitarias al liberarse (Correl y Johnston, 1970).

A nivel de laboratorio se han obtenido a través de destilación con arrastre por vapor a partir de follaje, dos tipos de extractos: el primero una solución acuosa y el segundo, un aceite esencial concentrado.

El aceite esencial de las hojas de esta planta fue analizado por Domínguez *et al* (1971) quién reporta está compuesto por 12 constituyentes, entre los que

destacan el isosafrol, safrol, eugenol y el o-metil-eugenol. Chang *et al* (1976) reportan después de analizar extractos etéreos de hojas y ramas pequeñas la presencia de los alcaloides heliparvifolina, o-demetilptelina, flindersamina, isoflindersamina, furoquinolina y tetraconazol. El aceite esencial extraído con cloroformo fue analizado por Fisher (citado por González ,1985) quién reportó la presencia de 17 compuestos de los cuales identificó los siguientes: B-felandreno, limoneno, un isómero del limoneno, linalol, safrol, un isómero del safrol, isosafrol, eugenol, cariofileno e isoeugenol.

Por su parte Graue y Rovalo (1982), reportan que la “barreta” ejerce dominancia en número y biomasa en su comunidad debido a la liberación de sustancias alelopáticas como las cumarinas, alcaloides del tipo de las furanoquinolinas y aceites esenciales al suelo, que evitan la germinación de semillas ahí presentes. También reportan estudios preliminares sobre su actividad microbicida, donde se destaca el poder inhibitorio del aceite esencial probado *in vitro* sobre especies de hongos saprofitos del suelo, en los que se presentó una inhibición de crecimiento total.

En el noreste de México los campesinos explotan los troncos de este arbusto en la elaboración de estacas para cercas de alambre y para la construcción de casas, su madera es bastante apreciada por su gran resistencia al deterioro fungoso, pudiendo durar hasta más de 30 años en buenas condiciones (Tamez, 1984).

Arana (1982) y Solares (1982) evaluaron la toxicidad aguda del aceite esencial y extractos acuosos obtenidos del follaje, al administrarlo por vía oral y por inyección dérmica, utilizando pollos jóvenes, por un período de siete semanas. Los resultados indicaron ausencia de síntomas especiales. El análisis histopatológico reveló no haber alteraciones en los tejidos.

MATERIAL Y METODOS

Colecta y manejo del follaje de Helietta parvifolia

El follaje de la planta fue colectado en la ladera del Cerro de la Silla en el sureste de la ciudad de Monterrey, N. L. a una altura de 700 m sobre el nivel del mar, así como en el municipio de Santiago, N. L. en las laderas de la Sierra Madre Oriental que colindan con la Presa de la Boca (550 m), ambas áreas con vegetación tipo subinerme. Las colectas del material vegetal que se llevaron a cabo fueron completamente al azar, durante las diferentes estaciones del año representando los diferentes estados fenológicos de la planta y las diferentes condiciones climatológicas imperantes en el área anualmente. El follaje fue llevado al laboratorio en donde se procedió a separar las hojas; una porción de ellas, se procesaron en fresco y el resto se dejó en los sacos arpilleros bajo condiciones ambientales hasta su total deshidratación, después de la cual se sacudían vigorosamente para desprender y recolectar las hojas, logrado esto se almacenaron a temperatura ambiente en bolsas de plástico oscuras e inodoras hasta su empleo.

Obtención de los extractos vegetales

Para la obtención del agua de arrastre se montó y utilizó inicialmente un equipo tradicional de destilación con arrastre por vapor utilizado para la extracción de aceites esenciales, en donde el agua obtenida es el resultado del vapor de

agua proveniente de la ebullición del agua contenida en un matraz Erlenmayer, el que pasa por entre las hojas contenidas en un matríz bola recogiendo los aceites para posteriormente condensarse en un refrigerante. La cantidad de follaje fresco utilizado fue de 275 g, y el tiempo promedio de extracci3n fue de dos horas.

Posteriormente para hacer accesible esta metodología al pequeño productor agrícola o aquel que desarrolla agricultura de subsistencia se adecu3 el equipo tradicional de arrastre por vapor, empleando para ello una cubeta de lámina de 19 litros de capacidad la que substituy3 al equipo de vidrio. A esta cubeta se le adapt3 un anillo met lico que sostenía una rejilla de metal debajo de la cual se depositaba el agua, en el tercio inferior de la misma, sobre ésta se colocaba luego una bolsa de tela de tul blanco conteniendo 500 g de follaje. A la tapa de la cubeta se le hizo un orificio en el que se coloc3 una manguera de PVC transparente unida por su otro extremo a un refrigerante. La cubeta se colocaba sobre tres tripi s encendiéndose tres mecheros Bunsen. Una vez que se iniciaba el arrastre se dejaba correr una hora la extracci3n.

En base a los resultados obtenidos de los equipos anteriores y para optimizar la obtenci3n de agua de arrastre y por ende aumentar la cantidad de aceite extraído, se adapt3 al equipo tradicional una olla de presi3n, en la cual se vertieron cuatro litros de agua, se coloc3 en el interior una parrilla y sobre ella una bolsa de tul conteniendo un kilogramo de hojas. En la válvula de seguridad de la olla se conect3 una manguera que a su vez se conectaba a un refrigerante, donde

se condensaba el vapor de agua el cual era recuperado en forma de agua de arrastre en un matr az Erlenmeyer; el tiempo de destilación era de 1 hora.

Para la obtención del aceite esencial el agua de arrastre fue lavada con cloroformo a partes iguales y se agitó vigorosamente manualmente durante diez minutos, se dejó reposar durante 24 h. Posteriormente se procedió a la separación del agua, empleándose para ello un embudo de separación. El solvente fue evaporado y sus vapores condensados en un refrigerante donde se recogian para su reutilización, quedando el aceite esencial en el recipiente original, de donde se pasaba a un frasco oscuro y se refrigeraba hasta su utilización. En esta metodología no se incluyó el empleo de Soxhlet, ya que se pretendió que fuera fácil de utilizar en cualquier laboratorio mínimamente equipado.

Pruebas fisicoquímicas

Para descartar un efecto inhibitorio fungoso debido a una presión osmótica elevada o un potencial hidrógeno inadecuado del aceite esencial, agua de arrastre y de los medios de cultivo papa-dextrosa-agar y Czapeck's se procedió a realizar los siguientes análisis:

Presión osmótica.- Esta fue calculada por la prueba de Shardakov, la cual consiste en preparar una serie de soluciones de sacarosa en agua destilada con diferentes concentraciones: 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.10 M agregándole para el caso una

alícuota del material a probar, se considera que la concentración a la cual se difunde en el medio, es equivalente a su presión osmótica.

Potencial hidrógeno.- Se utilizó un potenciómetro y se determinó el pH de los compuestos arriba mencionados.

Obtención y aislamiento de hongos que afectan en poscosecha a semillas almacenadas

Semillas sin desinfectar de maíz var. NL-V-S-2, frijol var. Delicias, sorgo var. Melacero y trigo var. Monterrey 78-100, procedentes del Campo Agrícola Experimental del ITESM ubicado en Apodaca, N.L. fueron colocadas (cinco semillas de maíz y frijol, y diez de trigo y sorgo), sobre placas de papa-dextrosa-agar (PDA) que se incubaron a 28°C por espacio de 96 h. Una vez obtenidas las colonias fungosas fueron resembradas para su aislamiento y posterior purificación e identificación taxonómica.

Evaluación de la actividad fungicida de los extractos vegetales in vitro sobre hongos que afectan semillas en poscosecha

Efecto fungicida del aceite esencial por contacto y volatilidad.- Con 0.1 ml del aceite esencial concentrado se impregnaron dos discos de papel filtro Whatman No. 40 de 2 cm de diámetro, que se depositaron sobre la superficie de la placa de PDA para determinar su efecto por contacto y sobre la parte inferior de la tapa de otra caja petri para determinar así su efecto volátil. Previamente las placas se sembraron depositando sobre la superficie dos porciones cada una en la

parte centro lateral en dirección opuesta a los discos con los hongos *Aspergillus niger*, *A. ochraceus*, *A. flavus*, *Penicillium sp*, *Rhizopus stolonifer* y *Fusarium oxysporum*, cada tratamiento se corrió por quintuplicado como testigo se utilizó agua destilada estéril. Se incubaron a 28°C realizando observaciones a las 96 h, y se midió el diámetro del halo formado alrededor de cada disco (esquema 1).

Esquema 1. Evaluación del efecto fungicida del aceite esencial de *Helietta parvifolia* por contacto y volatilidad en cajas petri conteniendo placas de papa dextrosa agar.



En base a los resultados obtenidos en el experimento anterior y con el fin de eliminar posibles fallas en la cantidad y viabilidad del inóculo depositado sobre la placa de PDA se montó otro bioensayo, sembrando en esta ocasión los hongos por el método de difusión en placa. Se hicieron cinco repeticiones de cada tratamiento y se incubó a 28°C haciendo observaciones a las 96 h, determinándose el diámetro del halo de inhibición formado alrededor del disco.

Efecto fungicida del agua de arrastre por contacto.- De los resultados obtenidos en el experimento con el aceite esencial concentrado en donde se determinó su actividad fungicida por contacto y volátil y con la finalidad de

corroborar la efectividad de éste a una concentración de 1,000 ppm obtenida en el agua de arrastre al destilar el follaje empleando el equipo adaptado para ser usado por el pequeño productor, se sembraron los hongos *Aspergillus niger*, *A. ochraceus*, *A. flavus*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium oxysporum*, por difusión en el medio de PDA en donde se substituyó el agua destilada requerida para su preparación por el agua de arrastre. Cada tratamiento se realizó por quintuplicado, incubándose a 28°C, haciéndose el conteo del número de colonias presentes a las 96 h.

Debido a los resultados obtenidos en este experimento con las especies de género *Aspergillus*, y para determinar con mayor precisión los mismos, se realizó un conteo de esporas tanto a las cajas tratadas como a las testigo a las 96 h de incubación, para lo cual se agregaron 2 ml de agua jabonosa a la superficie de la placa de agar con la finalidad de arrastrarlas, y recuperándose aproximadamente la misma cantidad de agua con una pipeta Pasteur, se diluyó en agua destilada para tener una dilución de 1:10; de ésta se tomó una alícuota y se depositó en un hematocitómetro, realizando el conteo. Así también se tomaron muestras de los hongos y se observaron al microscopio compuesto en montajes frescos analizándose la morfología de las hifas vegetativas y reproductoras para determinar alteraciones en ellas.

Actividad fungicida del aceite esencial extraído de follaje colectado en diferentes áreas geográficas.- Con el fin de determinar si se presentaba diferencia

en el efecto fungicida de los aceites extraídos de follaje colectado en la ladera del Cerro de la Silla en el sureste de la ciudad de Monterrey, N. L., y en las laderas de la Sierra Madre Oriental que colindan con la Presa de la Boca en Santiago, N. L. se sembraron los hongos *Aspergillus niger*, *A. ochraceus*, *A. flavus*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus stolonifer*, y *Fusarium oxysporum* depositando sobre la placa de PDA dos porciones del micelio cada una en la parte centro lateral y colocándose en dirección opuesta dos discos de papel filtro Whatman No.40 de 2 cm de diámetro impregnados con 0.1 ml del aceite esencial. Los testigos llevaban los discos impregnados con agua destilada estéril. Se sembraron cinco repeticiones de cada tratamiento, se incubaron a 28°C y se hicieron las observaciones a las 96 h se midió el diámetro del halo formado alrededor de cada disco.

Actividad fungicida del aceite esencial obtenido en diferentes estaciones climáticas del año.- Se montó este bioensayo con el fin de hacer un análisis comparativo del potencial fungicida del aceite esencial obtenido del follaje de plantas que fueron marcadas y muestreadas en los meses de abril (primavera), julio (verano), octubre (otoño) y enero (invierno), representando a las cuatro estaciones climáticas del año. Las colectas se realizaron en la ladera del Cerro de la Silla en el sureste de la ciudad de Monterrey, N. L. a una altura de 700 m sobre el nivel del mar. Las placas se sembraron depositando sobre la superficie dos porciones cada una en la parte centro lateral en dirección opuesta a los discos los hongos *Aspergillus niger*, *A. ochraceus*, *A. flavus*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.*, y *Fusarium oxysporum*; se impregnaron dos discos de papel filtro (Whatman No.

40) de 2 cm de diámetro con 0.1 ml aceite esencial y se colocaron sobre la superficie de la placa. Los testigos llevaban los discos impregnados con agua destilada estéril. Se sembraron cinco repeticiones de cada tratamiento, se incubaron a 28°C haciéndose las observaciones a las 96 hrs. midiéndose el diámetro del halo formado alrededor de cada disco.

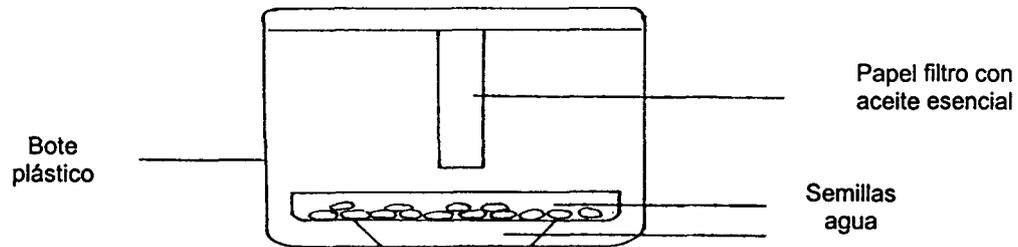
Actividad fungicida del aceite esencial obtenido bajo diferentes condiciones.- Para determinar si el efecto inhibitor del aceite no era modificado al ser extraído de follaje con diferentes condiciones de humedad, o aún si cambiaba al ser extraído de follaje deshidratado bajo condiciones naturales o artificiales o si se veía modificado al ser calentado hasta quemarse se obtuvieron cuatro muestras de aceite esencial extraídas de: follaje fresco, follaje deshidratado al medio ambiente, follaje deshidratado en estufa y de follaje deshidratado en estufa y su aceite calentado hasta quemarse. Se tomó 0.1 ml de cada uno de los aceites fue difundido en el medio de PDA contenido en cajas petri (con la finalidad de que tuvieran contacto directo con las esporas de los hongos tratados), y un testigo sin aceite, posteriormente fueron sembradas por difusión con *Aspergillus niger*, *A. ochraceus*, *A. flavus*, *Penicillium sp*, *Rhizopus stolonifer*, y *Fusarium oxysporum*. Se realizaron cinco repeticiones de cada tratamiento, incubándose a 28°C, se hizo el conteo del número de colonias presentes a las 96 hrs.

Evaluación de la actividad fungicida del aceite esencial in vivo en la protección de semillas almacenadas

Acción protectora del aceite esencial volátil sobre semillas almacenadas a humedad relativa saturada.- Para evaluar la acción fungicida del aceite esencial volátil se usaron recipientes de plástico de 13.5 cm de alto por 11.5 cm de diámetro que se acondicionaron como cámaras de almacenaje herméticamente cerradas (minicámaras de almacenamiento). El porcentaje de humedad relativa de las cámaras se elevó a saturación al colocarse un recipiente con agua destilada estéril y sobre este una tapa de caja petri de plástico conteniendo 10 g de semilla de: maíz var. NL-V-S-2, frijol var. Delicias, sorgo var. Melacero y trigo var. Monterrey 78-100 obtenidas del Campo Agrícola Experimental del ITESM, eligiéndose éstas por ser las mas almacenadas en nuestro país. La temperatura ambiente promedio fue de 25 a 30°C. El tratamiento consistió en colocar una tira de papel filtro impregnada con 0.1 ml de aceite esencial en la parte interior de la tapa de la cámara sin llegar a tener contacto con las semillas; como testigo agua destilada estéril. Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento. Tanto al inicio como al terminar el período de almacenaje de ocho semanas se realizó un análisis para determinar el número de esporas de hongos de almacén presentes en las mismas y así determinar su calidad fitosanitaria. Se tomó una muestra de 5 g de la semilla y se licuó durante un minuto en 500 ml de agua-agar al 0.1%, posteriormente se hizo una dilución de ésta tomando 5 ml de la mezcla y agregándose a 45 ml de agua-agar, se tomó 1 ml y se difundió en medio de Czapeck's. Se realizaron cinco repeticiones en cada tratamiento, al finalizar se

incubaron a 28°C y se llevó a cabo el conteo del número de colonias presentes a las 96 h las que se multiplicaron por el factor de dilución determinándose así el número de esporas presentes por gramo (esquema 2).

Esquema 2. Evaluación de la acción protectora del aceite esencial volátil de *Helietta parvifolia* sobre semillas almacenadas a humedad relativa saturada en minicámaras de almacenamiento.



Efecto del aceite esencial por contacto sobre semillas almacenadas a dos niveles de humedad relativa.- En base a los resultados obtenidos en el experimento anterior, se determinó la efectividad del aceite esencial por contacto incrementando la cantidad de semilla tratada a 100 g, almacenándose a dos niveles de humedad relativa: ambiente y saturada, a una temperatura promedio de 25 a 30°C ; utilizando las minicámaras de almacén. Se emplearon semillas de maíz var. NL-V-S-2, frijol var. Delicias, sorgo var. Melacero y trigo var. Monterrey 78-100; las cuales fueron puestas en contacto con 25 discos de papel filtro impregnados con 0.1 ml del aceite de esencial utilizándose como testigo aceite comestible de cártamo en la misma concentración. Se utilizaron cinco repeticiones por tratamiento. Se determinó inicialmente el porcentaje de germinación de las semillas, y se cuantificó en medio Czapeck's , el contenido de esporas de hongos

de almacén inicial. Se almacenaron, y se tomó una muestra de cada repetición, a las ocho semanas; el tratamiento almacenado a humedad relativa ambiente se dejó hasta completar 40 semanas, después de las cuales se repitió el muestreo. Se sembraron cinco repeticiones por muestra de semilla almacenada en el análisis y se llevó a cabo el conteo del número de colonias presentes a las 96 h las que se multiplicaron por el factor de dilución determinándose así el número de esporas presentes por gramo. Se determinó el porcentaje de germinación de las semillas tratadas al final de cada experimento.

Dosis óptima del aceite esencial por contacto en la protección de semillas de maíz almacenadas.- Se llevó a cabo un experimento empleando minicámaras de almacenamiento en cuyo interior se colocaron 10 g de semilla de maíz var. NL-V-S-2 la que fue almacenada durante ocho semanas a una humedad relativa saturada y una temperatura promedio de 25 a 30°C. Los tratamientos consistieron en impregnar discos de papel filtro con cloroformo y el aceite esencial, las concentraciones utilizadas de éste fueron: 0.5, 1, 3, 6, 12, 25%, el testigo semillas sin tratamiento. Se hicieron cinco repeticiones de cada tratamiento. Al momento de iniciarse el experimento se realizó un análisis cuantitativo de esporas presentes en la semilla empleándose el medio de Czapeck's, repitiéndose al finalizar el mismo. Se tomó una muestra de cada tratamiento, sembrándose cinco repeticiones de cada una de ellas haciéndose el conteo del número de colonias presentes a las 96 h, las que se multiplicaron por el factor de dilución determinándose así el número de esporas presentes por mililitro.

Estudio comparativo de la actividad fungicida por contacto del aceite esencial y el fungicida comercial Captán sobre semillas almacenadas.- De los resultados obtenidos al tratar semillas con el aceite esencial aplicado en discos de papel filtro la semilla, almacenándose a dos niveles de humedad relativa, se hizo este bioensayo para determinar la eficacia del aceite esencial por contacto contra la de un fungicida comercial, almacenándose a dos niveles de humedad. Se emplearon 100 g por tratamiento de semillas de maíz var. NL-V-S-2, las que fueron tratadas con 0.1 ml del aceite de esencial impregnado en 25 discos de papel filtro; 2.5 g de Captán espolvoreado a la semilla y como testigo aceite comestible de cártamo a la misma concentración del aceite esencial. Los tratamientos se colocaron dentro de minicámaras a dos niveles de humedad relativa: ambiente y saturada, la temperatura promedio fue de 25 a 30°C para su almacenamiento. Se hicieron cinco repeticiones por tratamiento. Se determinó inicialmente el porcentaje de germinación de las semillas, así como a través del análisis cuantitativo en medio Czapeck's, el contenido de esporas de hongos de almacén. Se almacenaron, tomando una muestra de cada repetición a las ocho semanas, sembrándose cinco repeticiones por muestra durante el análisis de esporas y se hizo el conteo del número de colonias presentes a las 96 h, las que se multiplicaron por el factor de dilución determinándose así el número de esporas presentes por gramo.

Evaluación de la actividad fungicida del agua de arrastre in vivo empleando diferentes métodos de aplicación

Con el propósito de evaluar el efecto inhibitor del agua de arrastre sobre el desarrollo de hongos que afectan semillas almacenadas se realizó este experimento en donde además se probaron cuatro métodos diferentes de aplicación para determinar su efectividad. Para tal motivo se utilizaron tanques de lámina de 200 litros de capacidad provistos de una rejilla metálica que se colocó a 20 cm de la base del mismo. Los tanques se llenaron con agua hasta una cuarta parte de su altura para proporcionar un ambiente saturado de humedad, y sobre la rejilla se colocaron en cada tanque 67 Kg de semillas de maíz var. NL-V-S-2 obtenidas en el Campo Agrícola Experimental del ITESM y contenidas en sacos de yute. El agua de arrastre empleada en este experimento se obtuvo del equipo de destilación al cual se le adaptó una olla de presión por lo cual la concentración del aceite esencial fue de 2,500 ppm. En cada uno de los tanques se dispusieron los siguientes tratamientos:

Tratamiento I. El saco de maíz en el interior del tanque

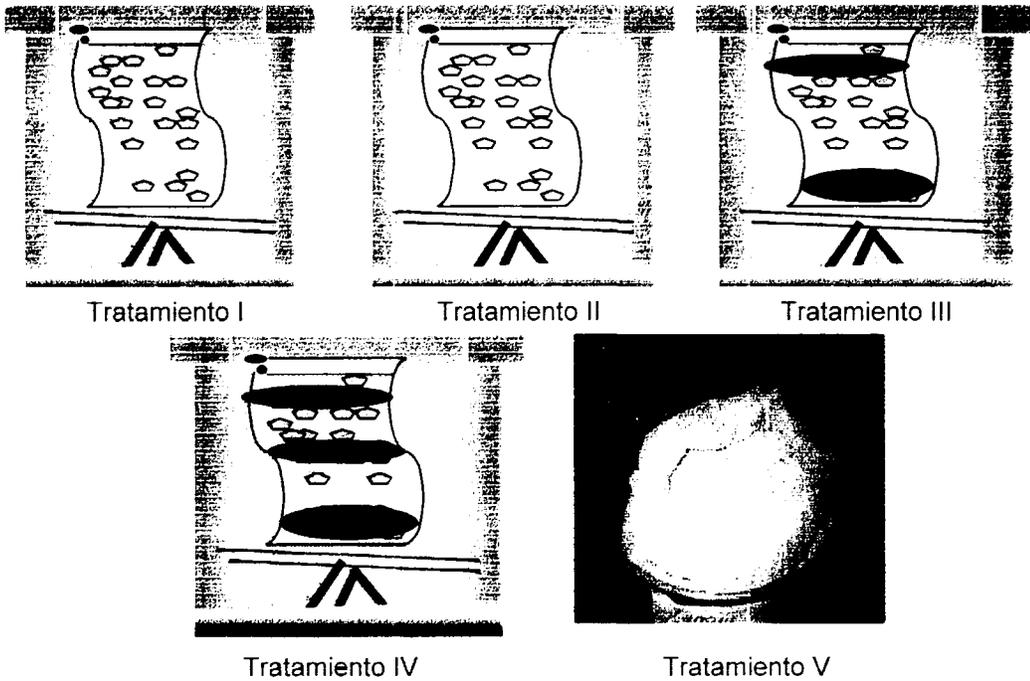
Tratamiento II. Se impregnaron con 360 ml de agua de arrastre dos bandas de papel manila, secándose posteriormente al medio ambiente para después colocarse colgadas de la tapa del tanque a los lados del saco.

Tratamiento III.- Se impregnaron dos círculos de papel manila cuyo diámetro era igual al del saco con 360 ml de agua de arrastre secándose posteriormente al medio ambiente para después colocarlos en la base y la superficie del saco de maíz.

Tratamiento IV.- Se colocaron tres círculos de papel manila cuyo diámetro era igual al del saco, impregnados con 360 ml de agua de arrastre secados posteriormente al medio ambiente, en la parte inferior, media y superior del saco conteniendo la semilla.

Tratamiento V.- Se impregnaron 380g de papel confeti con 360 ml de agua de arrastre, se dejaron secar al medio ambiente para después mezclarse con la semilla (esquema 3).

Esquema 3. Evaluación de la actividad fungicida del agua de arrastre de *Helietta parvifolia* sobre semillas de maíz var. NL-V-S-2 empleando diferentes métodos de aplicación.



A las ocho semanas de iniciado el experimento se tomaron cinco muestras totalmente al azar de cada tratamiento y en el laboratorio se les determinó el número de esporas de hongos de almacén presentes (metodología antes

descrita), empleando el medio Czapeck's sembrándose cinco repeticiones por muestra e incubándose a 28°C durante 96 hrs. Se hizo el conteo del número de colonias presentes las que se multiplicaron por el factor de dilución determinándose así el número de esporas por gramo. Así también al inicio y fin del experimento se determinó el porcentaje de germinación de las semillas.

Evaluación in vivo de la actividad fungicida del follaje deshidratado sobre semillas almacenadas

Para determinar si el aceite esencial volátil presente en el follaje deshidratado tenía la capacidad para inhibir hongos de almacén al ponerse en contacto directamente con la semillas; se diseñó un experimento preeliminar, el cual consistió en poner dentro de una caja de madera (de las empleadas para almacenar verduras) una hoja de plástico oscuro e inodoro sobre el cual se colocó 1.5 Kg del follaje deshidratado y sobre éste una tela de tul (que fue previamente lavada para quitar cualquier sustancia extraña) sobre la que se depositó una capa de 1.5 Kg de la semilla, se tapó todo con un plástico. El testigo estuvo conformado por 1.5 Kg de la semilla cubierta directamente con la hoja de plástico. Las cajas se colocaron en el laboratorio donde el almacenaje fue bajo condiciones ambientales no controladas. Se hicieron tres repeticiones de cada tratamiento. El experimento duró ocho semanas, se determinó el porcentaje de germinación de las semillas y el número de esporas de hongos de almacén presentes a través del análisis cuantitativo de éstas (metodología antes descrita) al inicio y al fin del mismo; se

tomaron cinco muestras de cada tratamiento sembrándose cinco repeticiones de cada uno en el medio de cultivo Czapeck's incubándose a 28°C durante 96 hrs.

El experimento se repitió posteriormente utilizando diferentes proporciones de semilla-follaje: 1:1, 1:2, 1:3, respectivamente. En esta prueba se manejaron 500 g de semilla de maíz variedad N.L.V-S-2 y 500, 1,000 y 1500 g de hojas deshidratadas respectivamente, para el testigo se empleó la cantidad de semilla ya mencionada. El montaje del experimento fue similar al preeliminar, analizándose los mismos parámetros con la metodología ya descrita.

Análisis estadístico de resultados

Los resultados de los experimentos llevados a cabo *in vitro* e *in vivo* fueron analizados estadísticamente mediante un arreglo factorial AXB con un diseño completamente al azar y AXBXC con un diseño de bloques al azar, realizándose análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey.

RESULTADOS

Obtención de los extractos vegetales

Por el sistema tradicional de arrastre por vapor, a partir de 275 g de follaje se obtuvieron 200 ml de agua de arrastre en 2 h, obteniéndose después del lavado del agua con el solvente y la evaporación de éste, 0.3 ml. de un líquido amarillo fuertemente aromático caracterizado como aceite esencial. Al modificarse el sistema de destilación y emplearse el recipiente de lámina se logró acortar el tiempo de destilación a una hora e incrementarse el rendimiento, obteniéndose a partir de 500 g de follaje, 1 litro de agua con un rendimiento de 1 ml de aceite equivalente a 1,000 ppm; sin embargo la utilización de una olla de presión para hacer la extracción permitió obtener 2 litros de agua de arrastre en una hora a partir de 1 Kg de follaje, con un rendimiento de aceite esencial de 5 ml, equivalente a 2,500 ppm. Este rendimiento se mantuvo constante durante todas las extracciones que se realizaron a las muestras de follaje colectadas las distintas estaciones climáticas, en las diferentes regiones geográficas, en los diferentes estados fenológicos de la planta y aún en las colectas efectuadas en la misma fecha de un año a otro.

Pruebas fisicoquímicas

La presión osmótica del aceite esencial y del agua de arrastre fue de 0.06 a 0.1 M equivalente a miliosmoles y un pH de 5 para ambos extractos. En el caso de

los medios de cultivo papa-dextrosa-agar y Czapeck's, la presión osmótica en ambos fue de 0.15 a 0.2 M equivalente a miliosmoles, con un pH de 7 .

Obtención y aislamiento de hongos que afectan en poscosecha a semillas almacenadas

Las muestras de semillas que se procesaron arrojaron la presencia de los hongos: *Penicillium sp.*, *Rhizopus stolonifer.*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *A. ochraceus* y *A. flavus*.

Evaluación de la actividad fungicida de los extractos vegetales in vitro sobre hongos de poscosecha

Efecto fungicida del aceite esencial por contacto y volatilidad.- Los hongos sembrados directamente en placa presentaron una inhibición total en su crecimiento al ser tratados con el aceite esencial aplicado por contacto, como en forma volátil. Los testigos presentaron un crecimiento normal, llegando las colonias a cubrir la totalidad de la superficie de la placa (9.0 cm). En la segunda parte del bioensayo en la que se sembraron los hongos por difusión, las observaciones mostraron que los testigos no formaron halo de inhibición, por lo que se procedió a realizar el análisis de varianza comparando solamente el efecto del aceite esencial sobre las diferentes especies tratadas; el análisis mostró que existen diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre las variables especies y modo de acción, así como en su interacción (cuadro 1).

La comparación múltiple de medias aplicada a la variable especies mostró la formación de cuatro grupos estadísticamente diferentes, siendo las especies *Penicillium sp* y *Rhizopus stolonifer* las que presentan un mayor diámetro en el halo de inhibición (9cm), mientras que *Aspergillus ochraceus* y *A. flavus* muestran el menor alcanzando poco más de los 3 cm. (cuadro 2). Por otra parte, se observa también que en la variable modo de acción: contacto y por volátil, existen diferencias estadísticamente significativas al registrarse 6.58 y 5.81 cm respectivamente, en el promedio del diámetro del halo de inhibición (cuadro 3).

Al analizar la interacción de la variable anterior sobre cada una de las especies se presentan diferencias estadísticamente significativas únicamente en *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* y *A. flavus* (figura 1).

Cuadro 1. Análisis de varianza para el diámetro del halo de inhibición (cm) en seis especies de hongos tratadas *in vitro* por contacto y volatilidad con aceite esencial de *Helietta parvifolia*.

F.V.	GL	SC	CM	F	P>F	
Factor A (Especies)	5	332.11	66.42	236.45	**	0.00
Factor B (Modo de acción)	1	9.05	9.05	32.21	**	0.00
Interacción	5	10.32	2.06	7.35	**	0.00
Error	48	13.48	0.28			
Total	59	364.97				
C.V.		8.56%				

** Valores con diferencias altamente significativas (P<0.01).

Cuadro 2. Comparación múltiple de medias (Tukey) del diámetro del halo de inhibición (cm) para la variable especies de hongos, tratadas *in vitro* por contacto y volatilidad con aceite esencial de *Helietta parvifolia*.

Especies	Promedio de diámetro del halo de inhibición (cm)	
	Contacto	Volátil
<i>Penicillium sp</i>	9.00	A
<i>Rhizopus stolonifer</i>	9.00	A
<i>Fusarium oxysporum</i>	7.35	B
<i>Aspergillus niger</i>	4.65	C
<i>A. ochraceus</i>	3.84	D
<i>A. flavus</i>	3.33	D

Cuadro 3. Comparación múltiple de medias (Tukey) del diámetro del halo de inhibición para la variable tratamientos con aceite esencial de *Helietta parvifolia* aplicados a seis especies de hongos *in vitro*

Tratamientos	Promedio de diámetro del halo de inhibición (cm)	
	Contacto	Volátil
Contacto	6.58	A
Volátil	5.81	B

NOTA: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$)

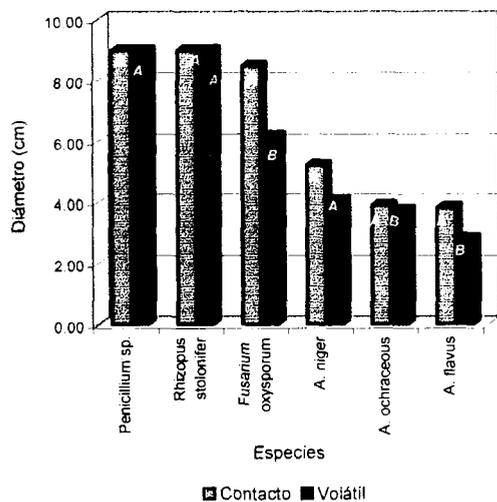


Figura 1. Valores promedio del diámetro del halo de inhibición en la interacción de la variable modo de acción en cada una de las especies tratadas con aceite esencial de *Helietta parvifolia*

Efecto fungicida del agua de arrastre por contacto.- Al evaluarse el efecto del agua de arrastre sobre el número de colonias de las especies tratadas, el análisis de varianza mostró que existe diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las especies, y altamente significativa ($P < 0.01$) entre los tratamientos (testigo y agua de arrastre), así como en la interacción de ambas fuentes de variación (cuadro 4).

La comparación múltiple de medias mostró la formación de dos grupos para la variable especies. En el primero *Aspergillus flavus* al registrar 84 colonias en promedio es estadísticamente diferente al resto de las especies, mientras que en el segundo *Penicillium sp* es estadísticamente diferente a las otras especies, registrando el mayor número de colonias (178) (cuadro 5). En relación a la variable tratamientos se encontró que estos son estadísticamente diferentes, teniéndose un mayor número de colonias (222) en el testigo, el cual disminuye a 24 colonias en el agua de arrastre (cuadro 6).

Al analizar la interacción de los tratamientos con cada una de las especies, se presentan diferencias estadísticamente significativas (figura 2).

Cuadro 4. Análisis de varianza para el número de colonias de seis especies de hongos tratadas *in vitro* con agua de arrastre obtenida de la destilación del follaje de *Helietta parvifolia*.

F.V.	GL	SC	CM	F	P>F
Factor A (Especies)	5	55511.50	11102.30	3.09*	0.017
Factor B (Tratamientos)	1	584896.19	584896.19	162.58**	0.000
Interacción	5	98183.88	19636.78	5.46**	0.001
Error	48	172684.75	3597.60		
Total	59	911276.31			
C.V.	48.83%				

** Valores con diferencias altamente significativas ($P < 0.01$); * Valores con diferencias significativas ($p < 0.05$).

Cuadro 5. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de colonias para la variable especies de hongos, tratadas *in vitro* con agua de arrastre obtenida de la destilación del follaje de *Helietta parvifolia*.

Especies	Promedio del número de colonias	
<i>Penicillium sp</i>	177.5	A
<i>Rhizopus stolonifer</i>	143.8	A B
<i>Fusarium oxysporum</i>	120.3	A B
<i>A. niger</i>	107.9	A B
<i>A. ochraceus</i>	103.8	A B
<i>A. flavus</i>	83.7	B

NOTA: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05)

Cuadro 6. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de colonias de la variable tratamientos de aceite esencial de *Helietta parvifolia* aplicados a seis especies de hongos

Tratamientos	Promedio del número de colonias	
Testigo	221.6	A
Agua de Arrastre	24.1	B

NOTA: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05)

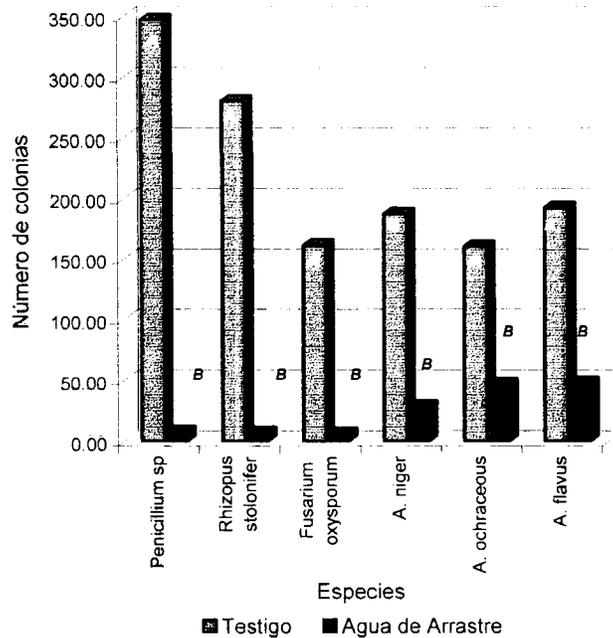


Figura 2. Valores promedio del número de colonias en la interacción de los tratamientos con cada una de las especies de hongos tratadas *in vitro* con agua de arrastre obtenida de la destilación del follaje de *Helietta parvifolia*.

Se observó además, que las tres especies del género *Aspergillus* presentaron un incremento en el tiempo de crecimiento de la colonia, así como una disminución en la intensidad de esporulación, manifestándose a simple vista por una disminución en la pigmentación de las colonias. Al realizarse el análisis de varianza al número de esporas presentes en cada una de las tres especies se advirtió que existían diferencias significativas ($P < 0.05$) entre especies, así como en la interacción de las fuentes de variación, y altamente significativas ($P < 0.01$) se presentaba entre los tratamientos (cuadro 7).

La comparación múltiple de medias aplicada a la variable especies demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ellas (cuadro 8). Entre los tratamientos se presentan diferencias significativas (cuadro 9), observándose un total de 3,758 esporas en el testigo, las que disminuyen a 765 en los tratamientos con el agua de arrastre.

El análisis de la interacción de los tratamientos dentro de cada una de las especies presentó diferencias estadísticamente significativas (figura 3) .

Cuadro 7. Análisis de varianza para el número de esporas en tres especies de *Aspergillus*, tratadas *in vitro* con agua de arrastre obtenida de la destilación del follaje de *Helietta parvifolia*.

F.V.	GL	SC	CM	F	P>F
Factor A (Especies)	2	4033552.00	2016776.00	3.41*	0.048
Factor B (Tratamientos)	1	67191360.00	67191360.00	113.71**	0.000
Interacción	2	4328128.00	2164064.00	3.66*	0.040
Error	24	14181632.00	590901.31		
Total	29	89734672.00			
C.V.		33.99%			

** Valores con diferencias altamente significativas (P<0.01); * Valores con diferencias significativas (p<0.05)

Cuadro 8. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas de la variable especies de *Aspergillus*, tratadas *in vitro* con agua de arrastre obtenida de la destilación del follaje de *Helietta parvifolia*.

Especies	Valores promedio del número de esporas	
<i>Aspergillus flavus</i>	2564.4	A
<i>A. niger</i>	2474.7	A
<i>A. ochraceus</i>	1745.6	A

NOTA: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05)

Cuadro 9. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas en la variable tratamientos aplicados a tres especies de *Aspergillus*, *in vitro*.

Tratamientos	Valores promedio del número de esporas	
Testigo	3758.13	A
Agua de Arrastre	765.00	B

NOTA: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05)

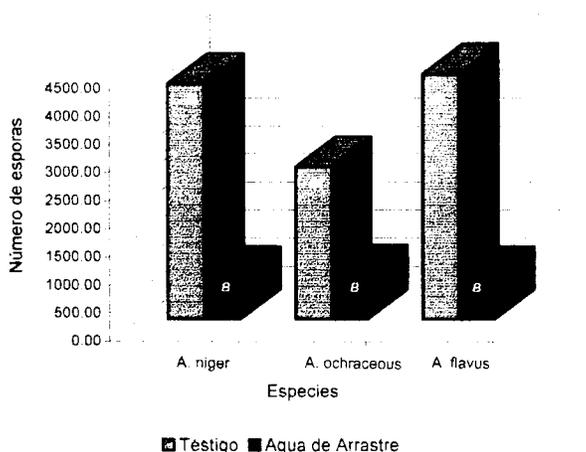


Figura 3. Valores promedio del número de esporas en la interacción de los tratamientos con cada una de las especies de *Aspergillus*, tratadas *in vitro* con agua de arrastre obtenida de la destilación del follaje de *Helietta parvifolia*.

El estudio microscópico realizado a las tres especies reveló que en *Aspergillus niger* y *A. flavus* se observan hifas acortadas (septos cercanos unos de otros) y las cabezuelas del conidióforo muy pequeñas al compararse con los testigos, mientras que *A. ochraceus* presenta conidias y conidióforos muy pequeños en comparación con los testigos, además de ser la cabezuela del conidióforo oval y presentar estrangulaciones en la base de la vesícula.

Actividad fungicida del aceite esencial extraído de follaje colectado en diferentes áreas geográficas.- El análisis de varianza llevado a cabo al diámetro del halo de inhibición (cm) en seis especies de hongos tratadas con el aceite esencial obtenido del follaje colectado en diferentes localidades arrojó diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre las variables especies, tratamientos (localidades) y la interacción de ambos factores (cuadro 10).

Por su parte la comparación múltiple de medias de la variable especies evidenció la formación de cuatro grupos estadísticamente diferentes, observándose en el primero a *Penicillium sp* y *Rhizopus stolonifer* cuyo halo de inhibición fueron de 6 y 5.73 cm, mientras que en el cuarto y con los valores más bajos se presentan *A. ochraceus* y *A. flavus* con 2.72 y 2.33 cm de diámetro respectivamente (cuadro 11). Asimismo en la comparación de la variable tratamientos se observó la formación de dos grupos: en el primero el testigo con 0.00 cm de inhibición y en el segundo los tratamientos de Monterrey y Santiago con 6.48 y 6.31 cm (cuadro 12). Es importante notar que en este caso el origen geográfico de las plantas a partir de las cuales se obtuvieron los aceites esenciales no influyó sobre los resultados.

Dado lo anterior, se encontró que en la interacción de los tratamientos con cada una de las especies existen diferencias estadísticamente significativas entre los extractos de Monterrey y Santiago y el testigo (figura 4).

Cuadro 10. Análisis de varianza para el diámetro del halo de inhibición (cm) en seis especies de hongos tratadas *in vitro* con aceite esencial de *Helietta parvifolia* obtenido del follaje colectado en diferentes localidades.

<i>F.V.</i>	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>P>F</i>
<i>Factor A (Especies)</i>	5	189.02	37.80	108.15**	0.000
<i>Factor B (Tratamientos)</i>	2	818.76	409.38	1171.16**	0.000
<i>Interacción</i>	10	95.80	9.58	27.41**	0.000
<i>Error</i>	72	25.17	0.35		
<i>Total</i>	89	1128.75			
<i>C.V.</i>	13.86%				

** Valores con diferencias altamente significativas ($P < 0.01$).

Cuadro 11. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el diámetro del halo de inhibición entre especies de hongos tratadas *in vitro* con aceite esencial de *Helietta parvifolia* obtenido del follaje colectado en diferentes localidades.

Especies	Promedio del diámetro del halo de halo de inhibición	
<i>Penicillium sp</i>	6.00	A
<i>R. stolonifer</i>	5.73	A B
<i>F. oxysporum</i>	5.20	B
<i>A. niger</i>	3.60	C
<i>A. ochraceus</i>	2.72	D
<i>A. flavus</i>	2.33	D

Cuadro 12. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el diámetro del halo de inhibición entre tratamientos aplicados a seis especies de hongos *in vitro*.

Tratamientos	Promedio del diámetro del halo de inhibición	
Testigo	0.00	A
Monterrey	6.48	B
Santiago	6.31	B

Nota: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

Nota: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

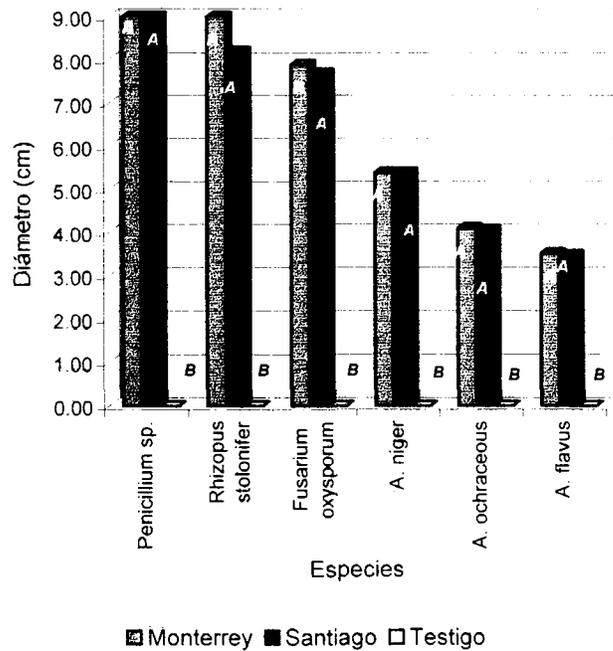


Figura 4. Valores promedio para el diámetro del halo de inhibición (cm) en la interacción de los tratamientos en cada una de las especies de hongos tratadas *in vitro* con aceites esenciales de *Helietta parvifolia* obtenidos de diferentes localidades.

Actividad fungicida del aceite esencial obtenido en diferentes estaciones climáticas del año.- El análisis de varianza para el diámetro del halo de inhibición (cm) en seis especies de hongos tratadas con aceites esenciales obtenidos de follajes colectados en diferentes estaciones climáticas (abril, julio, octubre y enero), manifestó que existen diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre especies, tratamientos (estaciones climáticas) y la interacción de ambos factores (cuadro 13).

Por su parte la comparación múltiple de medias entre la variable especies evidenció la formación de cuatro grupos estadísticamente diferentes. El primero constituido por *Penicillium sp* y *Rhizopus stolonifer* cuyo halos de inhibición fueron de 7.20 cm, mientras y en el cuarto grupo, con los valores más bajos se presentan *A. ochraceus* y *A. flavus* con 3.18 y 2.99 cm de diámetro respectivamente (cuadro 14). Así mismo en la comparación múltiple de medias entre los tratamientos se observó la formación de dos grupos: en el primero el testigo sin inhibición y en el segundo los tratamientos con halos de 6.57, 6.55, 6.48 y 6.46 cm respectivamente (cuadro 15), lo que indica que la fecha de colecta del material para los extractos no influye sobre la acción fungicida obtenida sobre las diferentes especies.

Dado lo anterior, se encontró que en la interacción de la variable tratamientos con cada una de las especies, existen diferencias estadísticamente significativas entre los aceites (abril, julio, octubre y enero) y el testigo (figura 5).

Cuadro 13. Análisis de varianza para el diámetro del halo de inhibición (cm) en seis especies de hongos tratadas *in vitro* con aceites esenciales de *Helietta parvifolia* obtenidos de follajes colectados en diferentes estaciones climáticas (abril, julio, octubre y enero).

F.V.	GL	SC	CM	F	P>F
Factor A (Especies)	5	469.60	93.92	913.08**	0.000
Factor B (Tratamientos)	4	1018.94	254.73	2476.50**	0.000
Interacción	20	118.06	5.90	57.39**	0.000
Error	120	12.34	0.10		
Total	149	1618.94			
<hr/>					
C.V.	6.15%				

** Valores con diferencias altamente significativas (P<0.01)

Cuadro 14. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el diámetro del halo de inhibición entre especies de hongos tratadas *in vitro* con aceites esenciales de *Helietta parvifolia* obtenidos de follajes colectados en diferentes estaciones climáticas.

Especies	Promedio de halo de inhibición	
Penicillium sp	7.20	A
Rhizopus stolonifer	7.20	A
Fusarium oxysporum	6.30	B
Aspergillus niger	4.39	C
A. ochraceus	3.18	D
A. flavus	2.99	D

Nota: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

Cuadro 15. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el diámetro de halo de inhibición entre tratamientos aplicados a seis especies de hongos *in vitro*.

Tratamientos	Promedio de halo de inhibición	
Testigo	0.00	A
Abril	6.57	B
Julio	6.55	B
Octubre	6.48	B
Enero	6.46	B

Nota: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

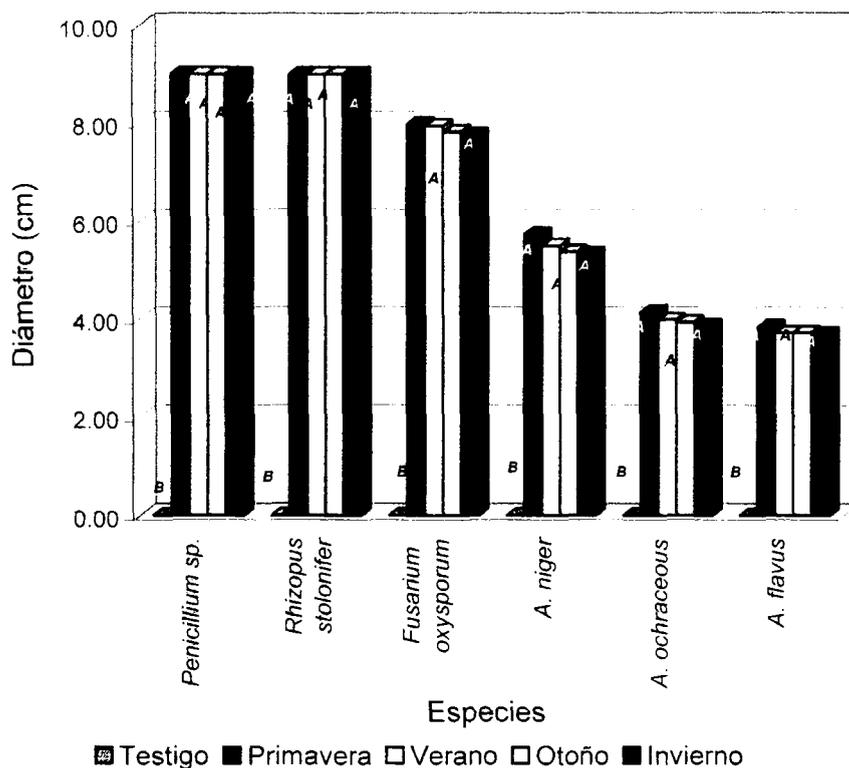


Figura 5. Valores promedio para el diámetro del halo de inhibición (cm) en la interacción de los tratamientos en cada una de las especies de hongos tratadas *in vitro* con aceites esenciales de *Helietta parvifolia* obtenidos en diferentes estaciones climáticas.

Actividad fungicida del aceite esencial obtenido bajo diferentes condiciones.-

El análisis de varianza para el número de colonias en seis especies de hongos tratadas con aceites esenciales obtenidos del follaje bajo diferentes condiciones, mostró que existen diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre especies, no presentándose diferencias entre tratamientos (aceite obtenido de: follaje fresco, follaje deshidratado al medio ambiente, follaje deshidratado en estufa y de follaje deshidratado en estufa y su aceite calentado hasta quemarse) ni en la interacción de ambas fuentes de variación (cuadro 16).

La comparación múltiple de medias de los valores obtenidos en la variable especies mostró la formación de tres grupos estadísticamente diferentes (cuadro 17). El primero correspondiendo a *Aspergillus flavus* y *A. ochraceus*, que presentaron el mayor número de colonias con 46 y 42 respectivamente; en el segundo se presentó *A. niger* con 23 colonias y finalmente en el tercero *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer* y *Penicillium sp* con 9, 8 y 8 colonias respectivamente. El comportamiento general de estos resultados puede ser apreciado en la figura 6.

Cuadro 16. Análisis de varianza para el número de colonias en seis especies de hongos tratadas *in vitro* con aceite esencial del follaje de *Helietta parvifolia* obtenido bajo diferentes condiciones.

F.V.	GL	SC	CM	F	P>F
Factor A (Especies)	5	30690.75	6138.14	203.28**	0.000
Factor B (Tratamientos)	3	3.02	1.01	0.03NS	0.991
Interacción	15	39.23	2.62	0.09NS	1.000
Error	96	2898.79	30.20		
Total	119	33631.79			
C.V.		24.38%			

** Valores con diferencias altamente significativas (P<0.01). NS. Valores con diferencias no significativas.

Cuadro 17. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el promedio del número de colonias para la variable especies de hongos, tratadas *in vitro* con aceite esencial del follaje de *Helietta parvifolia* obtenido bajo diferentes condiciones.

Especies	Promedio del número de colonias	
<i>Aspergillus flavus</i>	45.6	A
<i>A. ochraceus</i>	42.05	A
<i>A. niger</i>	23.15	B
<i>Rhizopus stolonifer</i>	8.75	C
<i>Fusarium oxysporum</i>	7.9	C
<i>Penicillium sp</i>	7.8	C

Nota. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

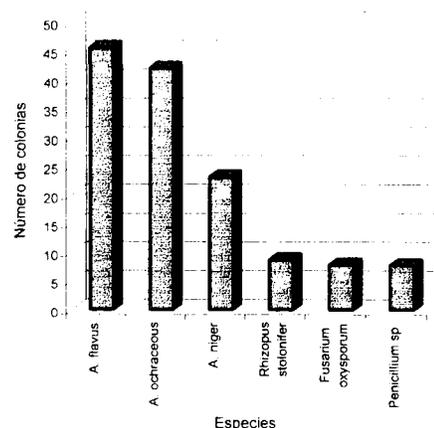


Figura 6. Valores promedio del número de colonias entre especies de hongos tratadas *in vitro* con aceite esencial del follaje de *Helietta parvifolia* obtenido bajo diferentes condiciones.

Evaluación de la actividad fungicida del aceite esencial in vivo en la protección de semillas almacenadas

Acción protectora del aceite esencial volátil sobre semillas almacenadas a humedad relativa saturada.- El análisis de varianza realizado al número de esporas presentes por gramo de semilla tratada, indicó diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) tanto entre especie de semilla (maíz var. NL-V-S-2, frijol var. Delicias, trigo var. Monterrey 78-100 y sorgo var. Melacero), como entre tratamientos (testigo, aceite esencial volátil), así como en la interacción de ambas fuentes de variación (cuadro 18).

La comparación múltiple de medias para la variable especie de semilla mostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre ellas,

resultando la formación de tres grupos, de los cuales las de frijol var. Delicias resultaron ser estadísticamente diferentes al resto de las semillas por presentar el menor número de esporas, 54,680 por gramo (cuadro 19). Del mismo modo se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre la variable tratamientos obteniéndose 149,681 esporas por gramo en el testigo, las que disminuyeron a 39, 151 en el aceite esencial volátil (cuadro 20).

La interacción de los tratamientos dentro de cada una de las especies de semillas presentó diferencias estadísticamente significativas (figura 7).

La fluctuación en el número de esporas por gramo presentes en semillas tratadas y testigo almacenadas a humedad relativa saturada se puede observar en la figura 8.

Cuadro 18. Análisis de varianza para el número de esporas por gramo en semillas de cuatro especies tratadas con aceite esencial volátil de *Helietta parvifolia*, almacenadas a humedad relativa saturada durante ocho semanas.

F.V.	GL	SC	CM	F	P>F
Factor A (Especie de semilla)	3	22125346816.00	7375115776.00	73.41**	0.000
Factor B (Tratamientos)	1	122170343424.00	122170343424.00	1216.05**	0.000
Interacción	3	42349920256.00	14116639744.00	140.51**	0.000
Error	32	3214868480.00	100464640.00		
Total	39	189860478976.00			
C.V.		10.62 %			

** Valores con diferencias altamente significativas (P<0.01).

Cuadro 19. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas por gramo entre especies de semillas tratadas con aceite esencial volátil de *Helietta parvifolia*, almacenadas a humedad relativa saturada durante ocho semanas.

Especie de Semilla	Promedio del número de esporas por gramo	
Sorgo	114124.8	A
Maíz	109155	A B
Trigo	99703.6	B
Frijol	54680.1	C

Cuadro 20. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas por gramo entre tratamientos aplicados a cuatro especies de semillas, almacenadas a humedad relativa saturada durante ocho semanas.

Tratamientos	Promedio del número de esporas por gramo	
Testigo	149681.34	A
Aceite esencial	39150.64	B

Nota: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

Nota: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

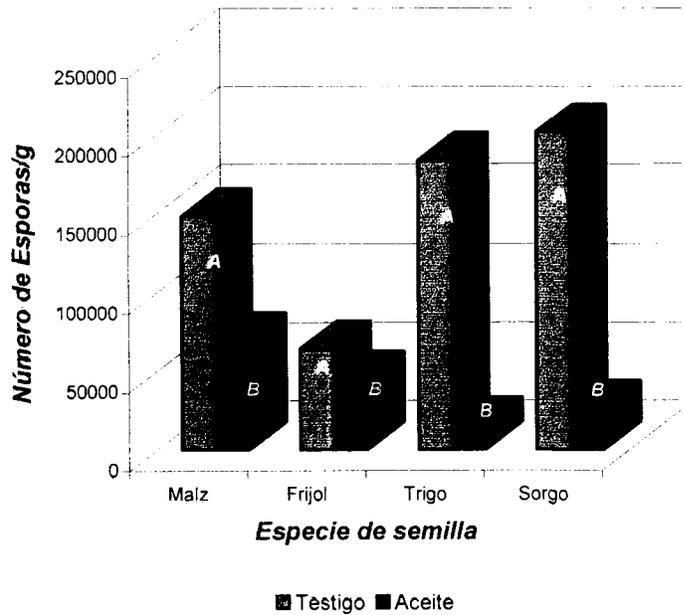
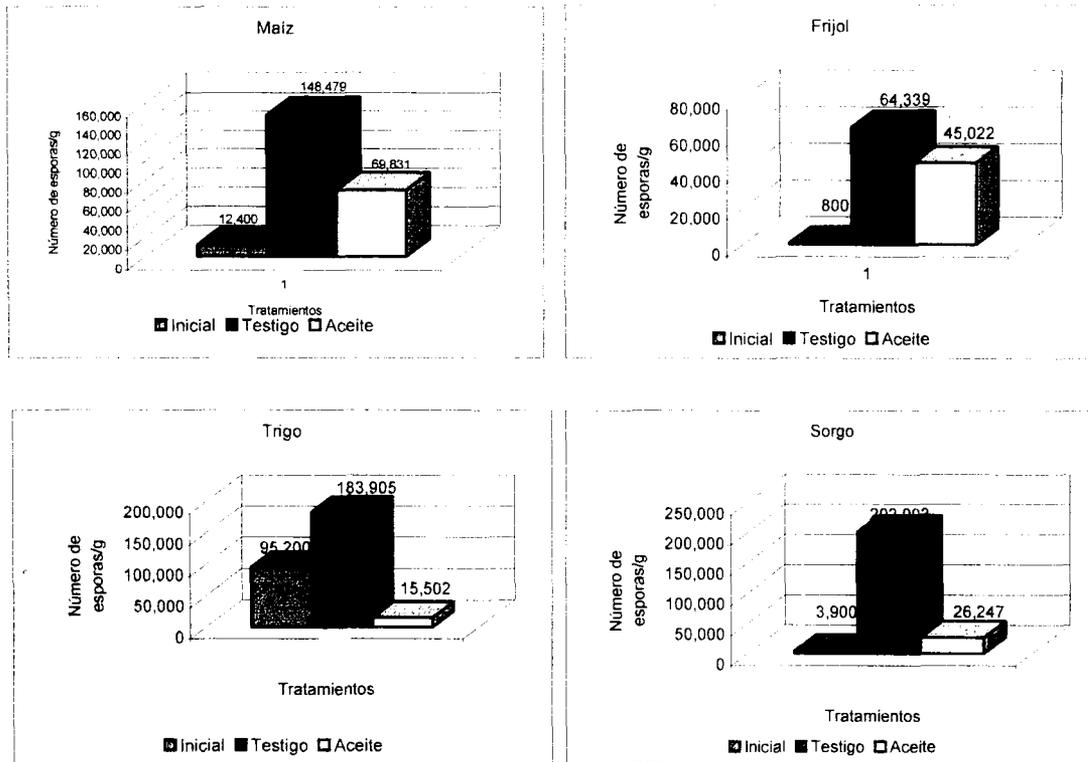


Figura 7. Valores promedio del número de esporas por gramo en la interacción de los tratamientos con cada especie de semillas.

Figura 8. Fluctuación del número de esporas por gramo presentes en semillas de maíz var. NL-V-S-2, frijol var. Delicias, trigo var. Monterrey 78-100 y sorgo var. Melacero, tratadas con aceite esencial volátil de *Helietta parvifolia*, almacenadas a humedad relativa saturada durante ocho semanas.



Efecto del aceite esencial por contacto sobre semillas almacenadas a dos niveles de humedad relativa:- El análisis de varianza llevado a cabo al número de esporas por gramo en semillas de cuatro especies tratadas con aceite esencial por contacto almacenadas a dos niveles de humedad relativa reveló que existen diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre las variables especie de semilla (maíz var NL-V-S-2, frijol var. Delicias, trigo var. Monterrey 78-100 y sorgo var. Malacero), tratamientos (testigo y aceite esencial) y niveles de humedad relativa (saturada y ambiente) así como en la interacción de cada una de las fuentes de variación (Cuadro 21).

Por otra parte la comparación múltiple de medias para las variables especie y tratamiento mostró diferencias estadísticamente significativas, alcanzándose el mayor número de esporas (130,275 por gramo) en las semillas de trigo var. Monterrey 78-100 testigo, número que se reduce a 39,389 al aplicar el aceite esencial por contacto (cuadro 22). Del mismo modo se presentaron diferencias entre la variable niveles de humedad relativa, siendo nuevamente en el trigo var. Monterrey 78-100 donde se presenta una mayor cantidad de esporas por gramo en el tratamiento de humedad relativa saturada 97,091; disminuyendo a 72, 573 en el tratamiento de humedad relativa ambiente (cuadro 23).

El comportamiento de los valores promedio obtenidos en la interacción de estos factores puede ser analizado en la figura 9.

La fluctuación en el número de esporas por gramo presentes en semillas tratadas, almacenadas a dos niveles de humedad relativa se puede observar en las figuras 10, 11, 12, 13 y 14.

Cuadro 21. Análisis de varianza para el número de esporas por gramo en semillas de cuatro especies tratadas con aceite esencial por contacto, de *Helietta parvifolia* y almacenadas a humedad relativa saturada y ambiente, durante ocho semanas.

F.V.	GL	SC	CM	F	P>F
Factor A (Especie de semilla)	3	73246162944.00	24415387648.00	1176.89**	0.000
Factor B (Tratamientos)	1	33540300800.00	33540300800.00	1616.73**	0.000
Factor C (Niveles de humedad)	1	6013698048.00	6013698048.00	289.88**	0.000
A X B	3	21198757888.00	7066252800.00	340.61**	0.000
A X C	3	1250148352.00	416716128.00	20.09**	0.000
B X C	1	652664832.00	652664832.00	31.46**	0.000
A X B X C	3	1459871744.00	486623904.00	23.46**	0.000
Error	64	1327726592.00	20745728.00		
Total	79	138689331200.00			
C.V.		13.37%			

** Valores con diferencias altamente significativas (P<0.01)

Cuadro 22. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas por gramo entre tratamientos aplicados a cuatro especies de semillas almacenadas a dos niveles de humedad relativa, durante ocho semanas.

Tratamientos	Especie de semilla			
	Maiz	Frijol	Trigo	Sorjo
Testigo	50062.89 A	30164.6 A	130275.2 A	7628.7 A
Aceite esencial	3850.5 B	6929.1 B	39389.1 B	4157.2 B

Nota: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

Cuadro 23. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas por gramo entre tratamientos aplicados a cuatro especies de semillas, almacenadas durante ocho semanas.

Tratamientos	Especie de semilla			
	Maiz	Frijol	Trigo	Sorgo
<i>H. R. Saturada</i>	37081 A	28866.3 A	97091.4 A	7870.5 A
<i>H. R. Ambiente</i>	16832.4 B	8227.4 B	72572.9 B	3915.4 B

Nota: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

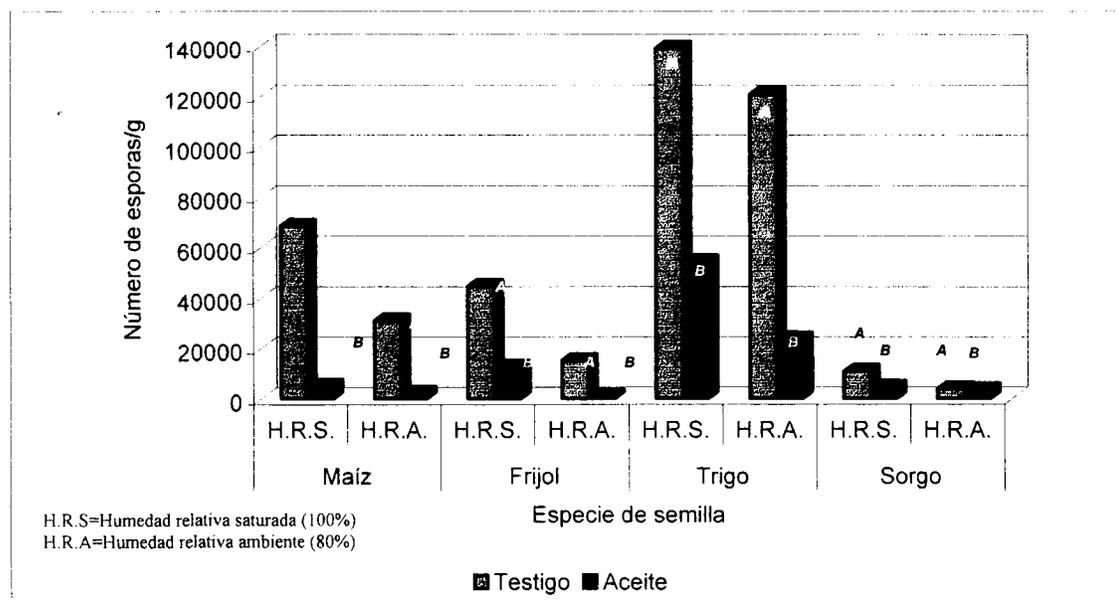
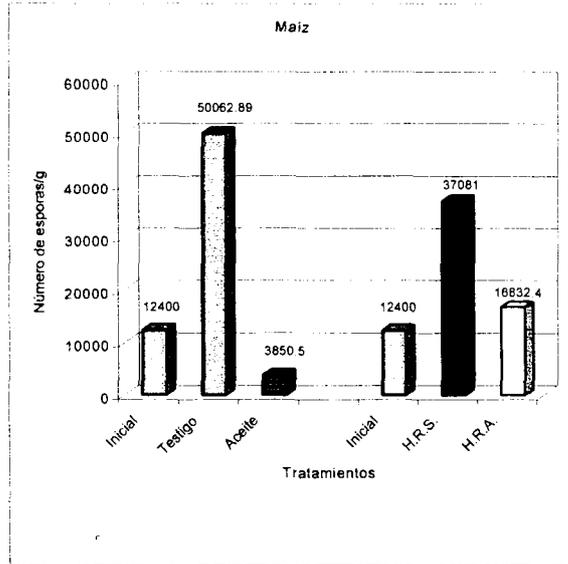


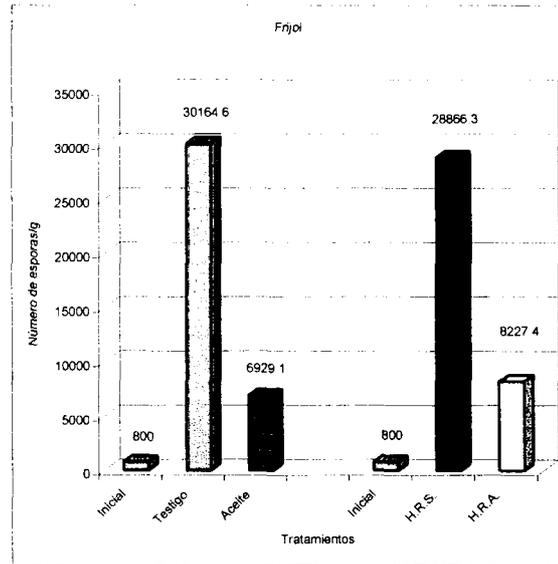
Figura 9. Valores promedio del número de esporas por gramo en la interacción de las especies de semilla con cada uno de los tratamientos.

Figura 10. Fluctuación en el número de esporas por gramo, presentes en semillas de maíz tratadas con aceite esencial de *Helietta parvifolia*, almacenadas a humedad relativa saturada y ambiente durante ocho semanas.



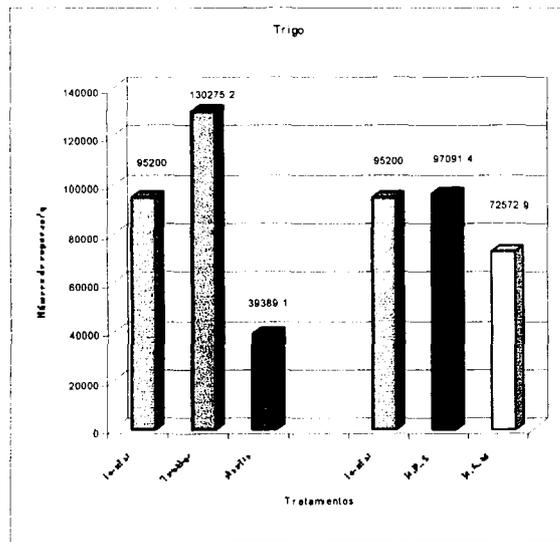
H.R.S= Humedad relativa saturada
H.R.A= Humedad relativa ambiente

Figura 11. Fluctuación en el número de esporas por gramo, presentes en semillas de frijol tratadas con aceite esencial de *Helietta parvifolia*, almacenadas a humedad relativa saturada y ambiente durante ocho semanas.



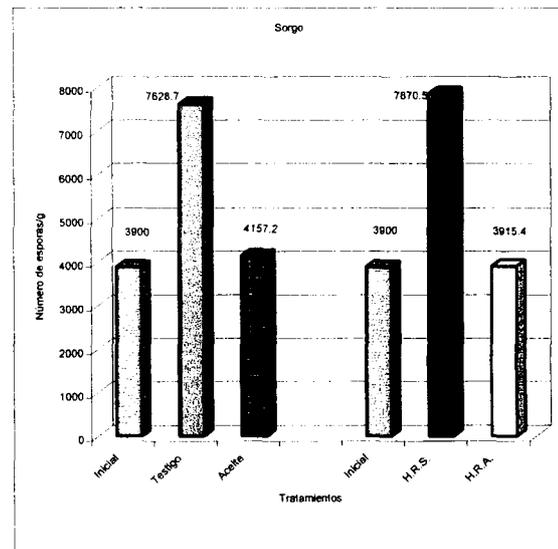
H.R.S= Humedad relativa saturada
H.R.A= Humedad relativa ambiente

Figura 12. Fluctuación en el número de esporas por gramo, presentes en semillas de trigo tratadas con aceite esencial de *Helietta parvifolia*, almacenadas a humedad saturada y ambiente durante ocho semanas.



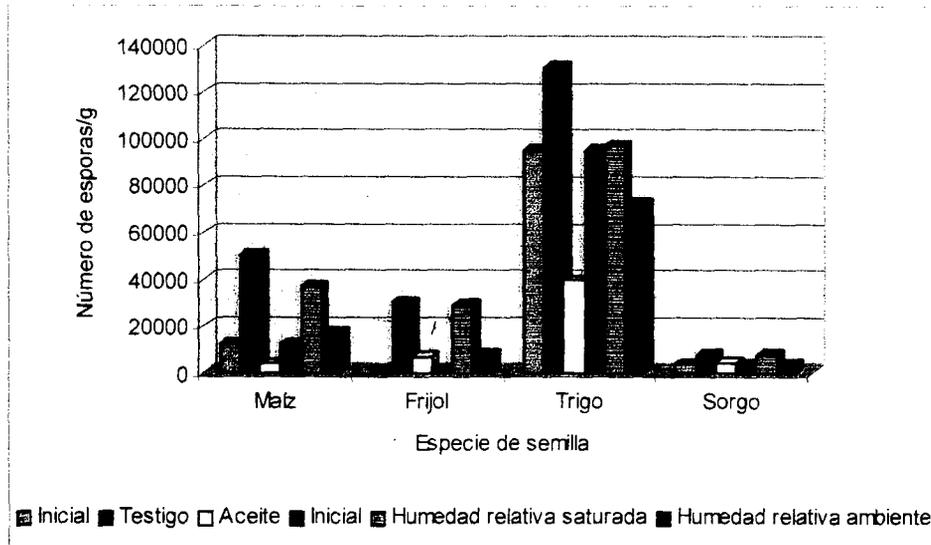
H.R.S= Humedad relativa saturada
H.R.A= Humedad relativa ambiente

Figura 13. Fluctuación en el número de esporas por gramo, presentes en semillas de sorgo tratadas con aceite esencial de *Helietta parvifolia*, almacenadas a humedad relativa saturada y ambiente durante ocho semanas.



H.R.S= Humedad relativa saturada
H.R.A= Humedad relativa ambiente

Figura 14. Comparación de la Fluctuación del número de esporas por gramo presentes en semillas de maíz, frijol, trigo y sorgo tratadas con aceite esencial de *Helietta parvifolia* y almacenadas a humedad relativa saturada y ambiente durante ocho semanas.



El análisis de varianza llevado a cabo al número de esporas por gramo presentes en las semillas de cuatro especies tratadas con aceite esencial por contacto almacenadas a humedad relativa ambiente después de 40 semanas, mostró que existen diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre especies (maíz var. NL-V-S-2, frijol var. Delicias, trigo var. Monterrey 78-100 y sorgo var. Melacero), tratamientos (testigo, aceite esencial) y tiempo de almacenaje (8 y 40 semanas), así como en la interacción de cada una de las fuentes de variación consideradas en este experimento (cuadro 24).

Por otra parte la comparación múltiple de medias para la variable especie de semilla (cuadro 25) en relación al efecto de la variable tratamientos (testigo y aceite esencial por contacto) mostró diferencias estadísticamente significativas,

alcanzándose el mayor número de esporas por gramo (399,472) en las semillas de maíz var. NL-V-S-2 testigo, número que se reduce a 2,524 al aplicar el aceite esencial. Del mismo modo se presentaron diferencias entre los tratamientos de 8 y 40 semanas (cuadro 26) siendo nuevamente en las semillas de maíz var. NL-V-S-2 donde se presenta una mayor cantidad de esporas por gramo (385,164) a las 40 semanas, disminuyendo a 16,832 en el tratamiento de 8 semanas, ambas almacenadas durante 40 semanas a humedad relativa ambiente.

El comportamiento de los valores promedio obtenidos en la interacción de estos factores puede ser analizado en las figura 15.

Cuadro 24. Análisis de varianza para el número de esporas por gramo en semillas de cuatro especies tratadas por contacto con aceite esencial *Helietta parvifolia* almacenadas durante ocho y cuarenta semanas a humedad relativa ambiente.

F.V	GL	SC	CM	F	P>F
Factor A (Especies de semillas)	3	403027066880.00	134342352896.00	146.52**	0.000
Factor B (Tratamientos)	1	657542152192.00	657542152192.00	717.16**	0.000
Factor C (Tiempo)	1	432859185152.00	432859185152.00	472.10**	0.000
A X B	3	432661397504.00	144220471296.00	157.30**	0.000
A X C	3	470315499520.00	156771827712.00	170.99**	0.000
B X C	1	426796580864.00	426796580864.00	465.49**	0.000
A X B X C	3	468262912000.00	156087631872.00	170.24**	0.000
Error	64	58679885824.00	916873216.00		
Total	79	3350144745472.00			

C.V. 12.09%

** Valores con diferencias altamente significativas (P<0.01).

Cuadro 25. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas por gramo entre tratamientos aplicados a cuatro especies de semillas almacenadas a humedad relativa ambiente durante cuarenta semanas.

Tratamientos	Especies de semillas							
	Maiz		Frijol		Trigo		Sorgo	
	Número de esporas por gramo							
Testigo	399472.09	A	225720.59	A	128267.8	A	4959.4	A
Aceite esencial	2523.9	B	2640.2	B	24803.8	B	3170.2	B

Nota: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Cuadro 26. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas por gramo entre tratamientos aplicados a cuatro especies de semillas almacenadas a humedad relativa ambiente.

Tratamientos	Especies de semillas							
	Maiz		Frijol		Trigo		Sorgo	
	Número de esporas por gramo							
40 Semanas	385163.59	A	220133.41	A	80498.7	A	4214.2	A
8 Semanas	16832.4	B	8227.4	B	72572.9	B	3915.4	A

Nota: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

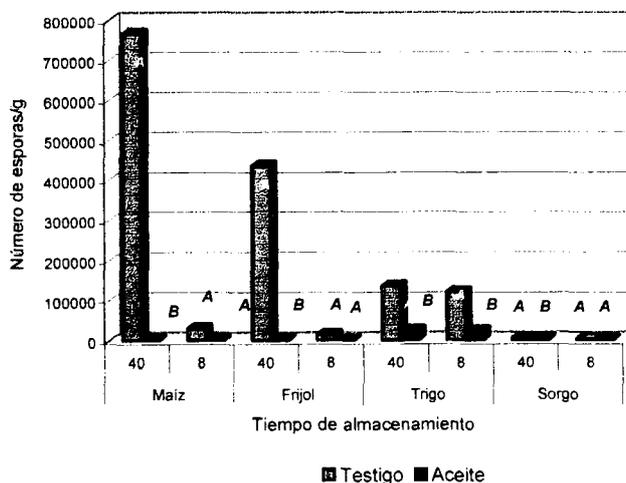


Figura 15. Valores promedio del número de esporas por gramo en la interacción de las especies de semillas con cada uno de los tratamientos.

En la tabla 1 aparecen los resultados del porcentaje de germinación de las semillas tratadas y testigo, almacenadas bajo condiciones de humedad relativa ambiente y saturada tanto al inicio como al final del experimento, observándose que las primeras se mantienen sin cambio aún después de 40 semanas.

Tabla 1. Porcentaje de germinación de las semillas tratadas por contacto con el aceite esencial de *Helietta parvifolia*, almacenadas a dos niveles de humedad relativa, durante ocho y cuarenta semanas.

Especies de semillas	8 Semanas					40 Semanas	
	Humedad Ambiente			Humedad Saturada		Humedad Ambiente	
	Inicial	Testigo	Aceite	Testigo	Aceite	Testigo	Aceite
	<i>Porcentaje de germinación</i>						
Maíz	94	85	93	20	80	45	93
Frijol	88	83	85	55	75	66	85
Trigo	86	81	86	10	80	71	86
Sorgo	81	76	80	66	78	64	80

Dosis óptima del aceite esencial por contacto en la protección de semillas de maíz almacenadas.- Los resultados obtenidos del análisis de varianza realizado al número de esporas por gramo, presentes en semillas de maíz var. NL-V-S-2 tratadas por contacto con diferentes dosis del aceite esencial mostraron que existen diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre tratamientos (testigo, 1.0, 3.0, 6.0, 12.0, 25.0%), (cuadro 27).

La comparación múltiple de medias indicó la formación de siete grupos estadísticamente diferentes, correspondiendo cada uno de ellos al tratamiento

aplicado. El mayor número de esporas por gramo se presentó en el testigo, alcanzando 137,482, número que disminuyó gradualmente hasta 33,772 en el tratamiento con el aceite esencial al 25% (cuadro 28 y figura 16).

La fluctuación en el número de esporas por gramo presentes en las semillas tratadas y testigo aparecen en la figura 17.

Cuadro 27. Análisis de varianza para el número de esporas por gramo en semillas de maíz tratadas con diferentes concentraciones de aceite esencial de *Helietta parvifolia* aplicado por contacto, almacenadas a humedad relativa saturada durante ocho semanas.

	FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos		6	46871314432.00	7811885568.00	4112.87**	0.000
Error		28	53182464.00	1899373.75		
Total		34	46924496896.00			
<hr/>						
C.V.		1.47%				

** Valores con diferencias altamente significativas ($P < 0.01$).

Cuadro 28. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas por gramo entre tratamientos aplicados a semillas de maíz var. NL.-V-S-2 almacenadas a humedad relativa saturada durante ocho semanas.

Tratamientos	Promedio del número de esporas por gramo	
Testigo	137482.4	A
0.5	132641.2	B
1.0	117384.6	C
3.0	99317.2	D
6.0	83786.6	E
12.0	52967.4	F
25.0	33772.4	G

Nota. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

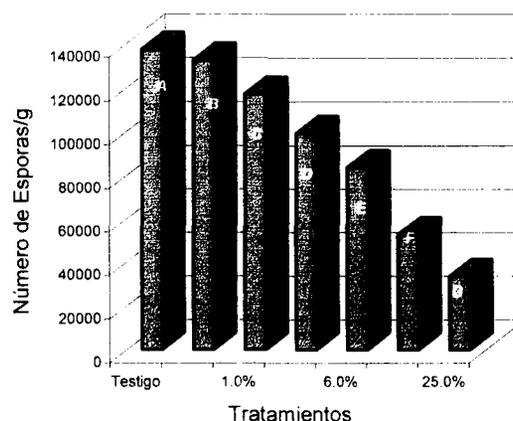
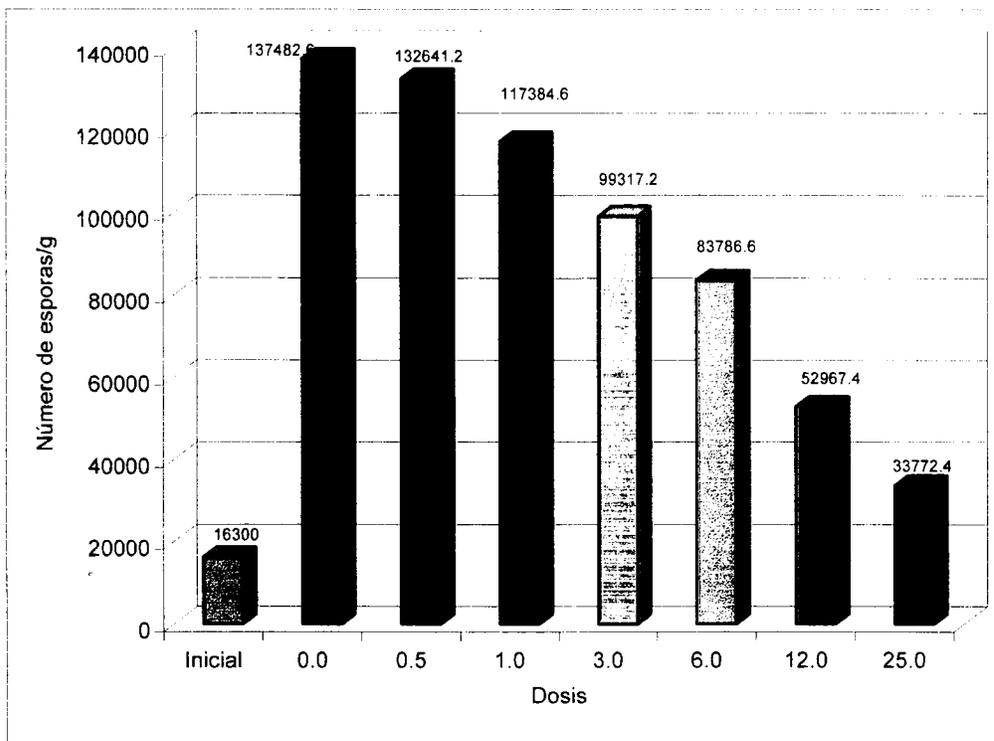


Figura 16. Valores promedio del número de esporas por gramo entre los tratamientos aplicados a semillas de maíz var. NL.-V-S-2 almacenadas a humedad relativa saturada durante ocho semanas.

Figura 17. Fluctuación en el número de esporas por gramo presentes en semillas de maíz var. NL-V-S-2 tratadas por contacto con diferentes concentraciones de aceite esencial de *Helietta parvifolia* almacenadas a humedad relativa saturada durante ocho semanas.



Estudio comparativo de la actividad fungicida por contacto del aceite esencial y el fungicida comercial Captán sobre semillas almacenadas.- El análisis de varianza llevado a cabo al número de esporas por gramo presentes en semillas de maíz var. NL-V-S-2 tratadas con aceite esencial por contacto y el fungicida comercial captán, almacenadas a dos niveles de humedad relativa mostró que existen diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) tanto entre los niveles de humedad relativa como entre los tratamientos aplicados (testigo, captán, aceite esencial), así como en la interacción de ambas fuentes de variación (cuadro 29). La comparación múltiple de medias mostró además que los valores

obtenidos en los diferentes niveles de humedad relativa son estadísticamente diferentes obteniéndose 49,503 esporas por gramo a humedad relativa saturada y 16,096 en la humedad relativa ambiente (cuadro 30), asimismo la comparación múltiple de medias de los diferentes tratamientos mostró diferencias estadísticamente significativas presentándose en el testigo 57,840 esporas por gramo de semilla, mismas que disminuyeron a 37,379 con la aplicación de captán y hasta 3,181 con el aceite esencial (cuadro 31). El comportamiento de los valores promedio obtenidos en la interacción de estos factores puede ser analizado en la figura 18. La fluctuación en el número de esporas por gramo presentes en semillas las semillas tratadas puede ser observada en la figura 19.

Cuadro 29. Análisis de varianza para el número de esporas por gramo en semillas de maíz tratadas por contacto con aceite esencial de *Helietta parvifolia* y el fungicida comercial Captán almacenadas bajo condiciones de humedad relativa saturada y ambiente durante ocho semanas.

	F.V.	GL	SC	CM	F	P>F
Factor A (Niveles de humedad)		1	8370075648.00	8370075648.00	1220.47**	0.000
Factor B (Tratamientos)		2	15252768768.00	7626384384.00	1112.03**	0.000
Interacción		2	3659986944.00	1829993472.00	266.84**	0.000
Error		24	164593664.00	6858069.50		
Total		29	27447425024.00			
<hr/>						
C.V.		7.98%				

** Valores con diferencias altamente significativas (P<0.01).

Cuadro 30. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas por gramo entre niveles de humedad en semillas de maíz var. NL-V-S-2 tratadas por contacto con el aceite esencial de *Helietta parvifolia* y el fungicida comercial Captán, almacenadas durante ocho semanas.

Niveles de Humedad relativa	Promedio de número de esporas por gramo	
Saturada	49503.29	A
Ambiente	16096.47	B

Nota: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05)

Cuadro 31. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas por gramo entre tratamientos aplicados a semillas de maíz var. NL-V-S-2, almacenadas a dos niveles de humedad relativa durante ocho semanas.

Tratamientos	Promedio de número de esporas por gramo	
Testigo	57840.0	A
Captán	37378.9	B
Aceite esencial	3180.6	C

Nota: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05)

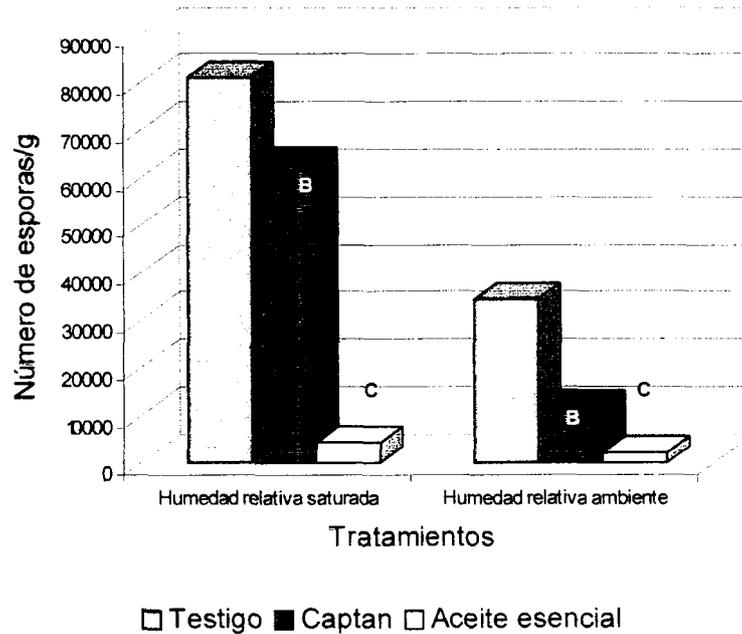


Figura 18. Valores promedio del número de esporas por gramo en la interacción de los tratamientos en cada uno de los niveles de humedad relativa.

En la tabla 2 aparecen los resultados del porcentaje de germinación de las semillas tratadas al inicio y fin del experimento.

Figura 19. Fluctuación en el número de esporas por gramo presentes en semillas de maíz var. NL-V-S-2 tratadas con aceite esencial de *Helietta parvifolia* por contacto y el fungicida comercial Captán, almacenadas a dos niveles de humedad relativa durante ocho semanas.

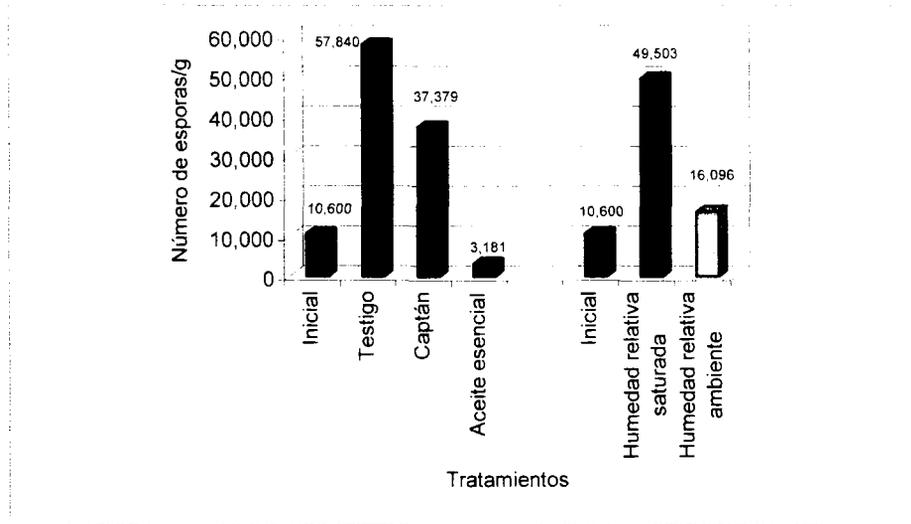


Tabla 2. Porcentaje de germinación de las semillas de maíz var NL-V-S-2 tratadas por contacto con el aceite esencial de *Helietta parvifolia* y el fungicida comercial Captán, almacenadas a dos niveles de humedad relativa durante ocho semanas.

Tratamientos	Humedad de Almacenaje	
	Ambiente	Saturada
Porcentaje de germinación		
<i>Inicial</i>	92	92
<i>Testigo</i>	80	40
<i>Captan</i>	88	70
<i>Aceite Esencial</i>	92	90

Evaluación de la actividad fungicida del agua de arrastre in vivo empleando diferentes métodos de aplicación

El análisis de varianza llevado a cabo al número de esporas por gramo presentes en semillas de maíz var. NL-V-S-2, tratadas con agua de arrastre

empleando diferentes métodos de aplicación mostraron que existen diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre tratamientos (testigo, dos bandas, dos círculos, tres círculos, confeti) (cuadro 32). La comparación múltiple de medias mostró la formación de cuatro grupos estadísticamente diferentes, correspondiendo al primero el testigo donde se contabilizaron 103,000 esporas por gramo de semilla; el segundo grupo con 70,400 esporas por gramo, correspondiendo al tratamiento en donde se aplicó el agua de arrastre en dos bandas; en el tercer grupo se situaron los tratamientos en donde se aplicó el agua de arrastre en dos y tres círculos con 54,800 y 47,600 esporas por gramo respectivamente, siendo estadísticamente iguales; en el cuarto grupo se situó el tratamiento donde el agua de arrastre se aplicó en confeti registrándose 9,400 esporas por gramo, lo que hace que este tratamiento en comparación con el resto sea el más efectivo (cuadro 33). El comportamiento general de estos resultados puede ser observado en la figura 20.

La fluctuación en el número de esporas por gramo presentes en las semillas tratadas se presentan en la figura 21.

Cuadro 32. Análisis de varianza para el número de esporas por gramo en semillas de maíz var. NL-V-S-2 tratadas con agua de arrastre obtenida de la destilación del follaje de *Helietta parvifolia* empleando diferentes métodos de aplicación, almacenadas a humedad relativa saturada durante ocho semanas.

F.V.	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	4	23272562688.00	5818140672.00	87.59**	0.000
Error	20	1328414720.00	66420736.00		
Total	24	24600977408			

** Valores con diferencias altamente significativas ($P < 0.01$).

Cuadro 33. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas por gramo entre tratamientos aplicados a semillas de maíz var. NL-V-S-2 almacenadas a humedad relativa saturada durante ocho semanas.

Tratamientos	Promedio de número de esporas por gramo	
Testigo	103000	A
Dos Bandas	70400	B
Dos Círculos	54800	C
Tres Círculos	47600	C
Confeti	9400	D

Nota. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

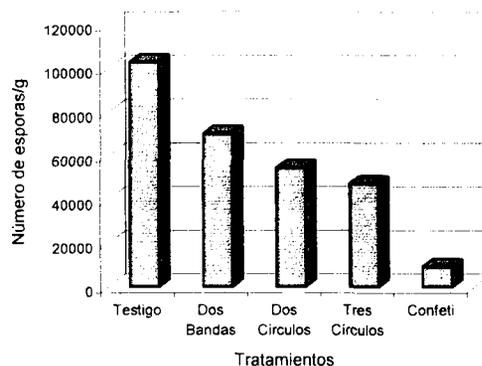
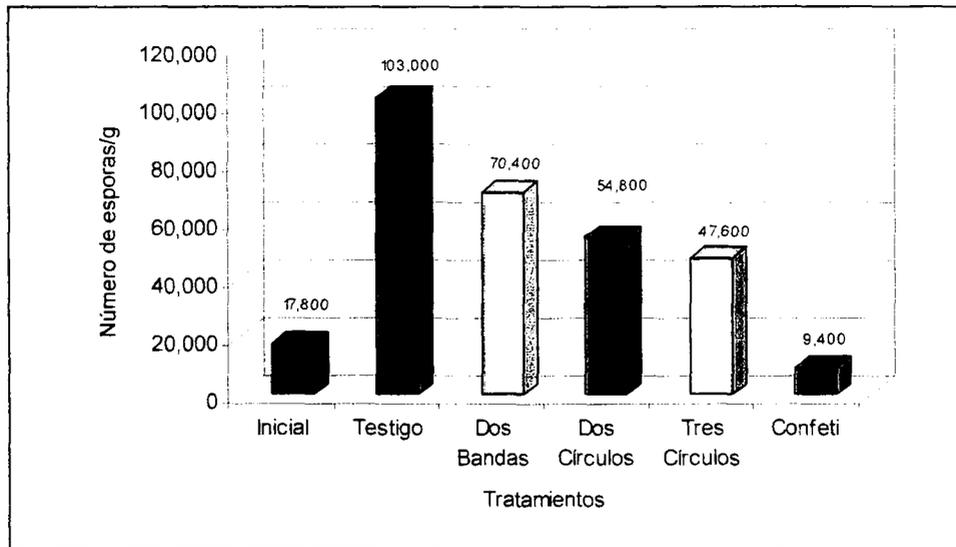


Figura 20. Valores promedio del número de esporas por gramo en semillas de maíz var. NL-V-S-2 tratadas con agua de arrastre obtenida de la destilación del follaje de *Helietta parvifolia* empleando diferentes métodos de aplicación, almacenadas a humedad relativa saturada durante ocho semanas.

Figura 21. Fluctuación en el número de esporas por gramo presentes en semillas de maíz var. NL-V-S-2 tratadas con agua de arrastre obtenida de la destilación del follaje de *Helietta parvifolia* empleando diferentes métodos de aplicación almacenadas a humedad relativa saturada, durante ocho semanas.



En la tabla 3 aparecen los resultados del porcentaje de germinación de las semillas tratadas al inicio y fin del experimento.

Tabla 3. Efecto del agua de arrastre obtenida de la destilación del follaje de *Helietta parvifolia* empleando diferentes métodos de aplicación, sobre el porcentaje de germinación de semilla de maíz var. NL-V-S-2 almacenada a humedad relativa saturada durante ocho semanas.

Tratamientos	Humedad Saturada de Almacenaje
Inicial	90
Testigo	20
Dos Bandas	60
Dos Círculos	10
Tres Círculos	20
Confeti	84

Evaluación in vivo de la actividad fungicida del follaje deshidratado sobre semillas almacenadas

El análisis de varianza realizado al número de esporas presentes por gramo de semilla de maíz var. NL-V-S-2 tratada con follaje deshidratado en diferentes proporciones (1:1, 1:2, 1:3), almacenadas a humedad relativa ambiente mostró que existen diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre tratamientos (cuadro 34).

La comparación múltiple de medias mostró la formación de cuatro grupos estadísticamente diferentes correspondiendo cada uno de ellos a las diferentes proporciones utilizadas. El mayor número de esporas por gramo se presentó en el testigo alcanzando en promedio 112,605, número que disminuyó conforme se incrementó la proporción de follaje deshidratado, teniéndose el menor número de esporas (18, 612) en la proporción 1:3 (cuadro 35). El comportamiento general de estos resultados puede ser apreciado en la figura 22.

La figura 23 presenta la fluctuación en el número de esporas por gramo presentes en las semillas tratadas.

Cuadro 34. Análisis de varianza para el número de esporas por gramo en semillas de maíz VAR. NL-V-S-2 tratadas con diferentes proporciones de follaje deshidratado de *Helietta parvifolia*, almacenadas a humedad relativa ambiente durante ocho semanas.

	F.V	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos		3	83464372224.00	27821457408.00	38750.15**	0.000
Error		56	40206336.00	717970.31		
Total		59	83504578560.00			

C.V. 1.73%

** Valores con diferencias altamente significativas (P<0.01).

Cuadro 35. Comparación múltiple de medias (Tukey) para el número de esporas por gramo entre tratamientos aplicados a semillas de maíz var. NL-V-S-2 almacenadas a humedad relativa ambiente durante ocho semanas.

Tratamientos	Promedio del número de esporas por gramo	
Testigo	112605.6	A
Proporción 1:1	37076	B
Proporción 1:2	27714.8	C
Proporción 1:3	18612.86	D

Nota: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

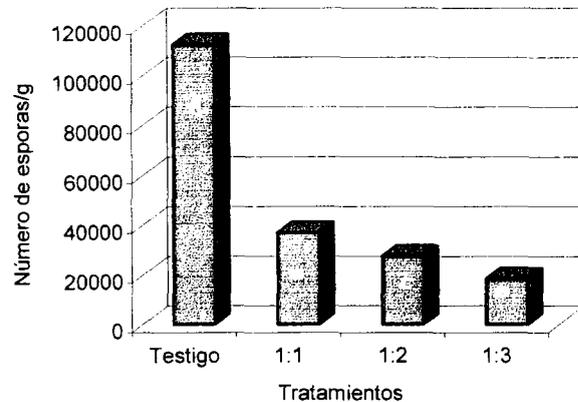
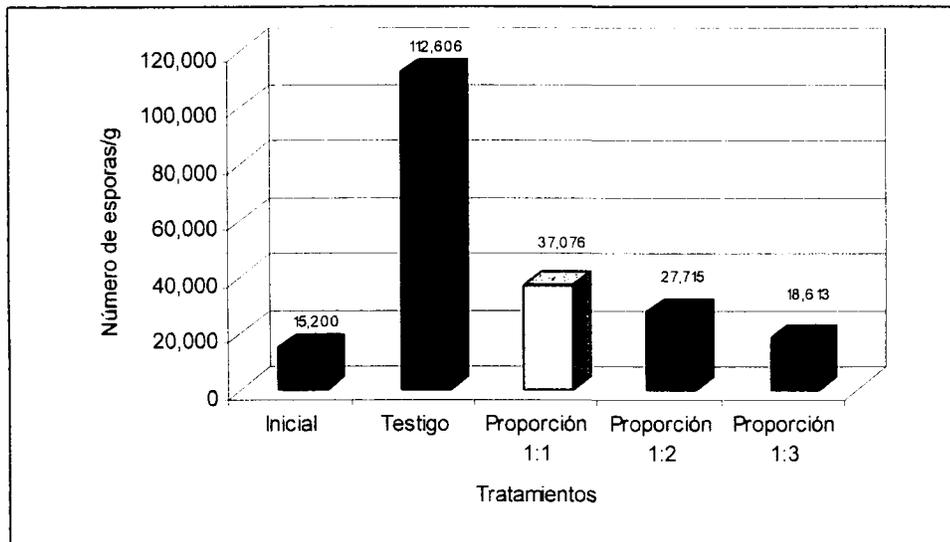


Figura 22. Valores promedio del número de esporas por gramo en semillas de maíz var NL-V-S-2 tratadas con diferentes proporciones de follaje deshidratado de *Helietta parvifolia*, almacenadas a humedad relativa ambiente durante ocho semanas..

Figura 23. Fluctuación en el número de esporas por gramo presentes en semillas de maíz var. NL-V-S-2 tratadas con diferentes proporciones de follaje deshidratado de *Helietta parvifolia*, almacenadas a humedad relativa ambiente durante ocho semanas.



El porcentaje de germinación de la semilla al inicio del experimento fue del 90%, al finalizar el mismo el tratamiento testigo presentaba un 88% y el tratamiento con cada una de las proporciones semilla-follaje un 90%.

DISCUSION

En base a los resultados de esta investigación, al obtener los extractos vegetales se observa que los dos equipos de destilación de arrastre por vapor implementados, optimizaron el rendimiento de agua de arrastre y aceite esencial a partir del follaje de *Helietta parvifolia*, acortando además, el tiempo del proceso. El sistema también mostró ser adecuado para la obtención de extractos a nivel de campo, ya que se puede implementar fácilmente, empleando para ello utensilios económicos, como botes de lámina y mangueras de plástico, consiguiéndose resultados similares en rendimiento a los de laboratorio, lo que abre la puerta para ofrecer a los pequeños productores agrícolas de regiones donde se explota esta planta un paquete tecnológico alternativo cuya metodología es accesible y confiable conduciéndolos hacia la aplicación de una agricultura orgánica propuesta para países de América Latina por Toledo y col. (1989) así como por Suquilanda (1996).

Con respecto al rendimiento del aceite esencial se pudo observar que la cantidad obtenida no cambió al ser extraído de plantas colectadas en las distintas estaciones climáticas anuales, lo que concuerda con lo publicado por Svoboda, et al (1990), quienes reportan los resultados del análisis efectuado al aceite esencial volátil obtenido a partir de *Satureja hortensis* que fue comparado durante las cuatro estaciones, mostrando sin excepción, que la cantidad del aceite producido

fue similar; no así con lo propuesto por Hurtado y col. (1981), quienes indican que el rendimiento de los alcaloides y los aceites esenciales de *Larrea tridentata* se ven influenciados por las altas temperaturas del verano que hacen en general que disminuya su rendimiento. Así mismo, se observó que tampoco influyó la altitud geográfica de las localidades en las que se colectaron las plantas, discrepando con lo reportado por Itieva, (1990) al trabajar con *Salvia sclarea* proveniente de tres diferentes regiones de Bulgaria, en donde la cantidad obtenida de aceite esencial si se vió mermada.

Otro factor que se reporta influye en el rendimiento de los aceites esenciales es el estado fenológico de la planta al momento de la colecta, observándose en esta investigación que éste no influyó en la cantidad de aceite esencial obtenido, discrepando con lo reportado por Svoboda, *et al* (1990) quién reporta un incremento en el rendimiento del aceite esencial volátil de *Satureja hortensis* que aumenta, del inicio a la mitad de la floración.

Por lo que respecta al empleo de follaje fresco o deshidratado al hacer la extracción del aceite esencial por el método de destilación con arrastre por vapor, Domínguez (1978) recomienda para el caso de plantas aromáticas el empleo de muestras frescas ya que aumenta el rendimiento del mismo; sin embargo, en esta investigación se observó que el grado de humedad del follaje no impactó en el mismo, obteniéndose constantemente la misma cantidad.

Con respecto a los resultados del análisis fisicoquímico del potencial hidrógeno llevado a cabo al aceite esencial y agua de arrastre de la *H. parvifolia*, así como a los medios de cultivo papa-dextrosa-agar y Czapeck's, éstos indicaron que están dentro de los niveles normales tolerados por los hongos probados; así como también la presión osmótica, que mostró estar por debajo de 2.0 M límite que reporta Cochrane (1958) para las especies de hongos aquí tratadas, por lo que se pudo eliminar como posible factor de inhibición en el crecimiento de las mismas.

En base a los resultados obtenidos al probar el aceite esencial *in vitro* para determinar su efectividad por contacto y volatilidad sobre hongos que afectan a semillas almacenadas, se puede asumir que se presentó una acción fungicida total al ser sembrados directamente sobre la placa de PDA, no así al ser sembrados por difusión, donde se presentó una acción selectiva en las dos formas de aplicación, lo que coincide con los resultados obtenidos por Mwangi y col. (1994), quienes probaron la actividad de los aceites esenciales obtenidos de varias especies de *Lippia* sp. sobre *Colletotrichum coffeanum*, *Fusarium solani*, *Cercospora* spp. y *Aspergillus* spp. mostrando una fuerte actividad fungicida sobre *Colletotrichum coffeanum*. La respuesta a este comportamiento selectivo es propuesto por Lyr (1987) quién indica que es un fenómeno común en productos comerciales de origen vegetal, como es el grupo de las carboxiamidas u oxantinas y propone es debida a diferencias en la acumulación del fungicida en la célula, diferentes estructuras del receptor o del sistema objetivo, diferencias en la

habilidad para toxificar (activar) un compuesto, la habilidad para detoxificar un compuesto y diferentes grados de importancia del receptor o del sistema objetivo para la supervivencia del hongo. Los resultados indicaron también en este experimento que el aceite esencial tuvo una acción fungicida tanto al ser aplicado por contacto, como en forma volátil, presentándose sin embargo, diferencias a nivel estadístico que mostraron mayor efecto por contacto, lo cual se explica por la capacidad que tienen los fungicidas de contacto de desplazar al inóculo, impidiendo su crecimiento o avance en el medio, por lo que la mayoría de ellos se comportan como protectores; sin embargo para que un producto sea mas efectivo es deseable además que presente cierto grado de volatilidad, lo que le da la capacidad a sus moléculas para penetrar en el hongo provocando un efecto terapéutico, fenómeno que se pudo comprobar en este bioensayo al observar la formación de halos sobre el medio de cultivo, en las áreas correspondientes a los discos colocados en la parte inferior de las tapas de las cajas petri.

Por lo que respecta al efecto fungicida del agua de arrastre probada *in vitro* a una concentración del aceite esencial de 1 000 ppm, se pudo observar que hubo una reducción del 60% en el número de colonias de *Aspergillus flavus* concordando en cuanto a efecto con lo reportado por Mishra y col. (1990) quienes probaron los aceites esenciales obtenidos de nueve especies de plantas sobre el mismo hongo, indicando que la inhibición causada por *Artemisia vulgaris* fue del 66.6%, por *Elettaria cardamomum* del 60% y por *Salvia plebeya* del 54%, requiriendo en este caso para lograr este resultado, una concentración de 5,000

ppm; así mismo con lo publicado por el mismo grupo de investigadores en 1991 donde probaron el aceite esencial de *Cinnamomum camphora* a 4000 ppm. sobre la misma especie. Es importante resaltar que la concentración utilizada en esta investigación fue menor que la empleada en esas investigaciones, obteniéndose resultados similares. En relación a la decoloración observada en las colonias de la especies de *Aspergillus niger*, *A. ochraceus* y *A. flavus* en este bioensayo, se puede considerar que lo publicado por Ghfir y col. (1997) está relacionado con lo encontrado en este experimento ya que observaron una alteración similar en las paredes celulares de las hifas en desarrollo de *Aspergillus flavus* en presencia del aceite esencial de *Hisopus officinalis*, las aislaron y su composición química fue analizada. La presencia del aceite esencial permitió una reducción en los niveles de azúcares neutros, ac. urónico y proteínas, mientras que los aminoazúcares, y los niveles de fósforo se incrementaron. La presencia del aceite esencial en el medio de cultivo indujo cambios muy marcados en el contenido de galactosa y galactosamina. Estos investigadores concluyen que las alteraciones en el color fueron debidas a cambios en la estructura de las células tratadas. Por lo que respecta a las alteraciones observadas en ésta investigación en la morfogénesis de estas especies, es factible que fueran causadas por el eugenol, metileugenol, safrol e isosafrol, compuestos presentes en el aceite esencial de la *H. parvifolia*, reportados como agentes causales de toxicidad celular por Lypsky, *et al* (1981), impactando en el proceso de diferenciación, el cual se produce, según lo indican NAS (1980) y Curtis, *et al* (2000) a través de la acumulación de ciertas substancias específicas sobre pared, membrana y organelos celulares. A nivel

bioquímico, es probable que estas malformaciones pudiesen estar asociadas con una interferencia causada por los componentes del aceite esencial, en la síntesis de la quitina (un polímero de N-acilglucosamina) principal componente de la pared celular fungosa, al inhibir la acción de la enzima transferasa quitina-UDP- N-acetilglucosamina, con la consecuente acumulación de UDP-N-acetilglucosamina lo que dá como consecuencia una malformación micelial, ya que Kremlin (1989) indica que ciertos fungicidas como el Kitazin P actúan de esta forma.

Las alteraciones observadas en la morfología de las especies de *Aspergillus*, provocadas por el aceite esencial indican que cumple con las propiedades que requiere para ser un fungicida eficaz (NAS, 1980), ya que al presentarse éste tipo de daño, en particular sobre las conidias, puede llegar a impedir su germinación o si se presenta, es anormal, de tal forma que el proceso de penetración e infección al hospedero se ve afectado o no se presenta.

Itieva, en 1990 al estudiar el aceite esencial proveniente de *Salvia sclarea* concluye que un factor determinante sobre su producción en la planta y efectividad fungicida, después de haberse extraído, es la altitud geográfica a la que se desarrollan y colectan las mismas, y dentro de ésta, la temperatura ambiente prevaleciente en cada ecosistema; los resultados obtenidos en esta investigación difieren de lo anterior ya que estadísticamente no se presentó diferencia entre el efecto fungicida del aceite esencial obtenido del follaje colectado en la ladera del Cerro de la Silla en el sureste de la ciudad de Monterrey, N. L. a una altura de 700 m sobre el nivel del mar, y el colectado en el municipio de Santiago, N. L. en las

laderas de la Sierra Madre Oriental que colindan con la Presa de la Boca a 550 m, lo cual indica que los metabolitos que conforman el aceite esencial no sufrieron cambios en su toxicidad, aún proviniendo de plantas desarrolladas en microclimas diferentes.

Otro aspecto que influenciaba la acción antifungal de un aceite esencial son las estaciones climáticas, en esta investigación se pudo observar que no hubo diferencias estadísticas significativas entre la acción producida por el aceite extraído en primavera (Abril), verano (Julio), otoño (Octubre) e invierno (Enero) y probado *in vitro* sobre los diferentes géneros, discrepando con lo observado por Arras y Grella en 1992 al hacer una investigación con el aceite esencial de *Thymus capitatus* creciendo silvestremente en la región de Sardinia, Italia sobre los hongos *Penicillium italicum* y *Alternaria alternata* en donde el aceite provocó un efecto fungistático sobre *P. italicum* y fungicida sobre *A. alternata* solamente en las extracciones del mes agosto, coincidiendo por ser las más abundantes.

Debido a que en plantas aromáticas se recomienda la extracción de sus aceites esenciales a partir de follaje fresco (Domínguez, 1978), en esta investigación se pudo comprobar que al probarse los aceites extraídos de follaje deshidratado al medio ambiente, así como el deshidratado en estufa y aún el aceite obtenido por este método y calentado hasta quemarse, no se presentaron diferencias estadísticas significativas en cuanto a su acción antifungal, lo que indica que sus componentes químicos fueron estables aún al

ser sometidos a diferentes temperaturas y humedad del tejido, abriendo este resultado la puerta a su empleo dentro de un paquete tecnológico de fácil aplicación.

El efecto volátil del aceite esencial del *Helietta parvifolia in vivo* se pudo comprobar después de probarse sobre semillas de maíz var. NL-V-S-2, frijol var. Delicias, sorgo var. Melacero y trigo var. Monterrey 78-100, almacenadas bajo condiciones de humedad saturada, mostrando los resultados del análisis estadístico diferencias altamente significativas entre el aceite con respecto al testigo, lo cual indica que la reducción en el número de esporas, se debió a la capacidad de penetración de los constituyentes del aceite en los tejidos de las semillas; cumpliendo con los requerimientos físicos que debe de poseer un fumigante líquido; esto es, alta volatilidad a temperatura ambiente (Cremlyn, 1989). Por lo que respecta a la diferencia en el número de esporas por gramo cuantificadas con respecto a su testigo al final del experimento en cada especie tratada, éstas pudieron ser debidas a diversos factores, entre los cuales están las condiciones fitosanitarias que presentaban al inicio del experimento, en particular la concentración de inóculo fungoso, la cual influye en la eficacia del fungicida, ya que si ésta es baja, el producto tiene mas probabilidades de reducirla. Otro factor de influencia es la distribución normal de la susceptibilidad al producto en la población del inóculo fungoso, la cual es variable, impactando directamente en su reducción (NAS, 1980). Los resultados obtenidos en este experimento concuerdan con lo reportado por Dubey (1991) al estudiar la acción fungicida de aceites

esenciales volátiles obtenidos del epicarpio de toronja y de hojas frescas de *Ocinum canurn* (*O. americanum*) y *Pinus roxburghii* los cuales impidieron la germinación de esclerocios viables de *Macrophomina phaseolina*.

Al probar el efecto del aceite esencial por contacto sobre semillas de maíz var. NL-V-S-2, frijol var. Delicias, sorgo var. Melacero y trigo var. Monterrey 78-100, almacenadas a humedad relativa saturada y ambiente durante ocho semanas, se presentaron diferencias entre tratamientos, así como entre niveles de humedad. Para que un producto controle eficientemente una población fungosa es necesario una amplia cobertura de la superficie a tratar, para lo cual se requiere la aplicación de una cantidad suficiente del producto, hasta el nivel de derrame; por lo cual es conveniente el empleo de productos fumigantes los cuales a su vez presentan la desventaja de ser poco persistentes (NAS, 1980), el aceite esencial en este experimento presentó ambas características considerándose por lo tanto un producto eficiente. A pesar de que la literatura reporta que la eficacia de los fungicidas cambia con la humedad del medio ambiente, en este experimento se encontró que el aceite esencial fue efectivo aún cuando esta condición, fue favorable para el desarrollo de los hongos de almacén. Lo anterior puede deberse a que el aceite es poco hidrosoluble lo cual hace que el producto pueda permanecer adherido a la superficie de la semilla sin ser arrastrado por la humedad, proporcionándole protección a la misma. (Christensen, 1974; Serna, 1996; Acquaah, 2002). Para que un producto sea eficaz una vez depositado, debe resistir el deterioro debido a las condiciones del medio ambiente; su persistencia

sobre la superficie tratada dependerá en gran parte de la firmeza con la cual sus partículas se adhieren a la misma, evitando ser lavado por la humedad ambiente (Manners, 1986); el aceite esencial cumplió con las características antes mencionadas, ya que después de 40 semanas de montado el experimento, la cantidad de inóculo presente en la semilla tuvo un ligero incremento al compararse con los datos obtenidos a las 8 semanas de almacenamiento.

Como ya se ha mencionado en este escrito, los productos químicos se han utilizado para el control de los fitopatógenos desde hace siglos, pero la industria de los plaguicidas surge después de la segunda guerra mundial y nuevos productos se han desarrollado en los últimos 30 años como resultado de investigaciones que siguen un protocolo científico, dentro del cual como uno de los pasos iniciales están las pruebas biológicas en las cuales se utilizan dosis constantes hasta confirmar la efectividad del producto probado, una vez que se establece ésta, se hacen una serie de ensayos en donde se manejan diferentes dosis con la finalidad de determinar la mas adecuada (Cremllyn, 1991). En esta investigación se llevó a cabo un experimento *in vivo* empleando semillas de maíz var. NL-V-S-2 que fueron tratadas con diferentes concentraciones del aceite esencial almacenándose a humedad relativa saturada para determinar la dosis óptima fungicida; encontrando que el número de esporas por gramo de semilla tuvo una variación inversamente proporcional a la concentración del aceite aplicado, resultando la concentración 25% como la mas efectiva, concordando con lo reportado por Mishra y col. (1990) al probar el aceite esencial obtenido de hojas

de duraznero a diferentes concentraciones contra *Aspergillus flavus*, así como con lo publicado por Garg y col. (1991) al probar el aceite esencial de *Capilhipediura foetidum* y ser probado sobre *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. candidus* y *A. ochraceus*.

En base a que la efectividad de los aceites esenciales vegetales ha sido comparada con la de fungicidas comerciales como fue el caso del aceite esencial obtenido de rizomas de *Curcuma longa* a diferentes concentraciones sobre *Aspergillus flavus*, utilizando al fungicida comercial Benlate como testigo (Ishrat-Niaz, 1994), en esta investigación se comparó el aceite esencial de la *Helietta parvifolia* con el fungicida comercial Captán en la inhibición de hongos de almacén presentes en semillas de maíz var. NL-V-S-2, encontrando que igual a lo reportado por Montes (1999) el cual probó extractos acuosos, alcohólicos y polvos obtenidos de epazote, orégano, clavo, canela y tomillo y bicarbonato de sodio, sobre semillas de sorgo contaminadas con *Fusarium moniliforme* dejando como testigo al Captán, observando que la combinación de clavo-bicarbonato de sodio fué la que mostró mejores resultados; en esta investigación el aceite esencial mostró ser mas efectivo que el fungicida comercial, aún bajo condiciones de humedad saturada.

En la actualidad la agricultura orgánica propone entre otras cosas poner a disposición de los pequeños productores un paquete tecnológico alternativo que incluya la obtención sencilla de extractos a partir de plantas silvestres presentes en su ecosistema de trabajo, cuyas propiedades pesticidas estén ya determinadas

científicamente, así como, técnicas de aplicación simples; para abatir la falta de recursos en la compra de otro tipo de insumos (Toledo et al, 1989 y Suquilanda, 1996). En esta investigación al probarse *in vivo* sobre semilla de maíz var. NL-V-S-2 (67Kg) diferentes métodos para la aplicación del agua de arrastre obtenida de la destilación del follaje de *Helietta parvifolia*, se trató en primer lugar de contribuir a la aplicación de una agricultura orgánica y en segundo lugar determinar científicamente su eficacia en el control de hongos que afectan a semillas en almacén. Los resultados mostraron después de ser analizado el número de esporas por gramo de semilla, la efectividad de impregnar con el agua de arrastre discos de papel confeti (empleado para fiestas), ya que a diferencia de los otros métodos probados, lograron ampliar el área tratada por contacto aumentando así su efectividad, además de ser un producto de fácil adquisición. La efectividad del extracto acuoso aquí observada concuerda con lo publicado por Figueroa y col. (1997) quienes probaron extractos acuosos obtenidos de 58 especies de plantas sobre la germinación de esporas, desarrollo del micelio y protección de granos almacenados de maíz contra *Aspergillus flavus*. Los extractos que redujeron la contaminación de granos de maíz fueron *Tridax coronopifolia*, *Larrea divaricata*, *Raphanus raphanistrum* y *Euphorbia dentata*.

Otro método implementado en esta investigación que es factible de emplearse en la agricultura orgánica dado los resultados obtenidos, fue el tratamiento de semilla de maíz var. NL-V-S-2 almacenada en condiciones de humedad relativa ambiente, sobre diferentes cantidades de follaje deshidratado de

Helietta parvifolia, en donde se encontró que los aceites volátiles presentes tuvieron la capacidad para penetrar la semilla, alcanzar los propágulos y estructuras vegetativas de los hongos de almacén, permaneciendo el tiempo suficiente para inhibirlos; observándose que conforme se incrementó la cantidad del mismo, aumentó su eficacia. Los resultados coinciden con las observaciones publicadas por Tiwari y Dixit (1994) sobre la actividad fungicida de los gases emitidos por algunas plantas superiores sobre hongos de almacén, indicando que el vapor emitido por la corteza de *Cinnamomum zeylanicum* inhibió completamente el crecimiento micelial de *Aspergillus flavus* y *A. niger*.

El efecto fungicida que presentaron los extractos obtenidos de follaje y el follaje *per se* de la *Helietta parvifolia* en esta investigación probablemente fué debido a alguno de sus componentes, ya que existen reportes de investigaciones realizadas como la publicada por Takur y col. (1989) quienes probaron *in vitro* seis aceites esenciales aromáticos obtenidos de *Ocimum gratissimum*, *O. viridae*, *O. canum* (*O. americanum*) *O. basilicum*, *Cymbopogon winterianus* y *C. martinii* var. *motia*, en donde el eugenol y el linalol, entre otros, presentaron efecto fungicida; al igual Garg y Siddiqui (1992) reportan los efectos del eugenol aislado a partir del aceite de las hojas de *Ocimum sanctum* probado sobre nueve especies de hongos, inhibiendo a *Aspergillus niger* y *Fusarium moniliforme*.

Por lo que respecta a la germinación de las semillas de las diferentes especies tratadas con el aceite esencial, agua de arrastre y follaje deshidratado

de *Helietta parvifolia*, se puede establecer que los compuestos presentes en ellos tuvieron una toxicidad diferencial penetrando las membranas celulares del hongo con mayor rapidez que las del huésped, sin presentarse alteraciones en su viabilidad. Graue (1981), al probar el aceite esencial de esta planta reporta que se presentó un efecto alelopático al inhibirse la germinación de semillas de maíz, así como al observarse una estimulación en semillas de frijol; lo cual difiere con lo observado en esta investigación.

CONCLUSIONES

Evidencias claras en esta investigación indican que el aceite esencial de *Helietta parvifolia* es un fungicida eficaz, afectando totalmente el crecimiento de *Rhizopus stolonifer* y *Penicillium* sp, hongos sensibles a su acción, así como causando malformaciones anatómicas y fisiológicas en *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* y *Aspergillus niger*, hongos que muestran ser más tolerantes.

El aceite esencial mostró efectos similares óptimos al ser aplicado por volatilidad y por contacto, lo cual es muy importante debido a que esto amplía su aplicación en la práctica agrícola.

Se demostró claramente que el aceite esencial es un fungicida efectivo para el control de hongos de almacén que afectan a semillas en poscosecha aún bajo condiciones de humedad relativa saturada, resultando tener mejor comportamiento que el fungicida comercial Captán contra el que fue comparado.

Es factible el empleo de los extractos para la protección de semillas almacenadas a humedad relativa saturada hasta por ocho semanas, así como, a humedad relativa ambiente por 40 semanas. El follaje deshidratado *per se* puede ser empleado a humedad relativa ambiente por ocho semanas.

Se puede recomendar el uso de los extractos, así como del follaje deshidratado, en la protección de semillas almacenadas, cuando sean destinadas para siembra, ya que no afectan la germinación de las mismas.

Para el pequeño agricultor de las regiones donde se desarrolla ésta planta, de la cual se comercializan los troncos y desechan el follaje, puede llegar a ser un recurso de fácil obtención para el control de las pudriciones poscosecha de semillas almacenadas, ya que la metodología empleada en esta investigación para la obtención de los extractos se puede implementar en el campo a un bajo costo, y fácil adquisición, impulsando así el desarrollo de una agricultura orgánica.

RESUMEN

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, estima que a escala mundial se pierde el 5% de las semillas en poscosecha, en México fluctúan entre el 5 y el 25%, reportándose como agentes causales insectos, hongos y roedores (Colín, 2002). El uso de compuestos químicos para el control de enfermedades fungosas, actualmente es de gran importancia económica (Lyons *et al* 1990, Zalomon *et al* 1990, Acquaah 2002). La FAO al respecto afirma que el uso prolongado y extensivo de fungicidas, especialmente los de alta residualidad, ha conducido a un deterioro ambiental (Diouf, 2003), motivo por lo cual se plantea buscar y utilizar productos de origen natural, como son los extractos de plantas superiores que ejercen su acción a dosis bajas, convirtiéndose en una alternativa orgánica muy importante por ser estables en su acción, de baja o nula residualidad y biodegradables. Además, se propone que se puedan obtener bajo condiciones de tecnología simple y su aplicación a nivel de campo sea accesible para los agricultores, sobre todo por aquellos de escasos recursos económicos (Suquilanda, 1996). Esta investigación presenta los resultados de los estudios realizados a *Helietta parvifolia* (Gray) Benth, especie alelopática que forma parte de la flora del matorral submontano en el noreste de México. El objetivo fue evaluar la actividad fungicida de extractos obtenidos del follaje, así como del follaje *per se* y su aplicación en la protección de semillas almacenadas, como una alternativa tecnológica en el desarrollo de una agricultura orgánica.

La metodología aplicada consistió inicialmente en llevar a cabo la colecta del follaje de la planta en las laderas de la Sierra Madre Oriental. Los extractos (agua de arrastre y aceite esencial) fueron obtenidos a través de destilación con arrastre por vapor, implementándose modificaciones al sistema, para hacerlo accesible al pequeño productor agrícola o aquel que desarrolla agricultura de subsistencia. Se llevó a cabo un análisis fisicoquímico (pH y presión osmótica) a los extractos y medios de cultivo para descartar un efecto inhibitorio fungoso indirecto. Los hongos de almacén fueron aislados de semillas de maíz var. NL-V-S-2, frijol var. Delicias, sorgo var. Melacero y trigo var. Monterrey 78-100. Se valuó *in vitro* sobre *Aspergillus niger*, *A. ochraceus*, *A. flavus*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus stolonifer* y *Fusarium oxysporum*, el efecto fungicida del aceite esencial por contacto y volatilidad; el efecto del agua de arrastre por contacto; la actividad fungicida del aceite esencial extraído de follaje colectado en: diferentes áreas geográficas y diferentes estaciones climáticas del año; así como el obtenido bajo diferentes condiciones. Se evaluó *in vivo* sobre semillas almacenadas de maíz var. NL-V-S-2, frijol var. Delicias, sorgo var. Melacero y trigo var. Monterrey 78-100, la actividad fungicida del aceite esencial por volatilidad a humedad relativa saturada y por contacto a dos niveles de humedad relativa; sobre semillas de maíz var. NL-V-S-2 se determinó la dosis óptima del aceite esencial por contacto a humedad relativa saturada; sobre semillas de maíz var. NL-V-S-2 se llevó a cabo un estudio comparativo de la actividad fungicida por contacto del aceite esencial y el fungicida comercial Captán a dos niveles de humedad relativa. La actividad fungicida del agua de arrastre se evaluó *in vivo* empleando diferentes métodos de aplicación

sobre semillas de maíz var. NL-V-S-2 almacenadas a humedad relativa saturada; así como el efecto del follaje deshidratado se evaluó *in vivo* sobre semillas de maíz var. NL-V-S-2 almacenadas a humedad relativa ambiente. Se analizaron estadísticamente los resultados mediante un arreglo factorial AXB con un diseño completamente al azar y AXBXC con un diseño de bloques al azar, realizándose análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey.

Los resultados indicaron que al modificarse el sistema de destilación empleando el recipiente de lámina, o una olla de presión, se acortó el tiempo de la misma y aumentó el rendimiento de los extractos. Las pruebas fisicoquímicas indicaron que tanto los extractos como los medios de cultivo están dentro de los niveles normales para el crecimiento fungoso. Se aislaron los hongos de almacén: *Penicillium sp.*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *A. ochraceus* y *A. flavus*. En la evaluación de la actividad fungicida de los extractos vegetales *in vitro* sobre hongos que afectan semillas en poscosecha, al determinarse el efecto fungicida del aceite esencial por contacto y volatilidad los hongos sembrados directamente en placa presentaron una inhibición total del crecimiento en las dos formas de acción. Al sembrarse por difusión, *Penicillium sp* y *Rhizopus stolonifer* presentan el mayor diámetro en el halo de inhibición, *Aspergillus ochraceus* y *A. flavus* el menor (cuadro 2). Al evaluarse el efecto del agua de arrastre sobre el número de colonias en las especies tratadas; *Aspergillus flavus* registró el menor número de colonias (84), mientras que *Penicillium sp* el mayor con 178 colonias (cuadro 5). En las especies del género *Aspergillus* se

presentaron alteraciones en el tiempo de crecimiento de la colonia y en la intensidad de esporulación, así como a nivel microscópico cambios morfológicos. Después de analizarse estadísticamente la actividad fungicida de los aceites esenciales extraídos de follaje colectado en diferentes áreas geográficas; en diferentes estaciones climáticas del año; y bajo diferentes condiciones, se observó que no hubo diferencias en su efecto, por lo que el origen de las plantas y su manipulación en laboratorio no influyó sobre los resultados (cuadros 12, 15, 16). Por lo que respecta a la actividad fungicida del aceite esencial *in vivo* en la protección de semillas almacenadas, después de evaluarse la acción protectora del aceite esencial volátil sobre semillas de maíz var. NL-V-S-2, frijol var. Delicias, trigo var. Monterrey 78-100 y sorgo var. Melacero almacenadas a humedad relativa saturada se observó que se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, obteniéndose 149,681 esporas de hongos de almacén por gramo en el testigo, las que disminuyeron a 39, 151 en las tratadas con el aceite esencial volátil (cuadro 20). Al determinar la dosis óptima del aceite esencial por contacto en la protección de semillas de maíz almacenadas a humedad relativa saturada, se observó que el mayor número de esporas se presentó en el testigo, disminuyendo gradualmente hasta el tratamiento al 25% que presentó el número mas bajo (cuadro 28 y figura 16). En el estudio comparativo de la actividad fungicida por contacto del aceite esencial y el fungicida comercial Captán sobre semillas de maíz almacenadas a dos niveles de humedad relativa se presentaron diferencias tanto entre los niveles de humedad relativa (cuadro 30), como entre los tratamientos aplicados: testigo, captán, aceite esencial

(cuadro 31), presentándose en el testigo la mayor cantidad de esporas por gramo de semilla, mismas que disminuyeron con la aplicación de captán, para reducirse significativamente con el aceite esencial. En la estimación de la actividad fungicida del agua de arrastre *in vivo* sobre semillas de maíz empleando diferentes métodos de aplicación se presentaron diferencias entre los tratamientos (testigo, dos bandas, dos círculos, tres círculos, papel confeti), registrando el de papel confeti el menor número de esporas por gramo (cuadro 33, figura 20). Al evaluarse *in vivo* de la actividad fungicida del follaje deshidratado en diferentes proporciones (1:1, 1:2, 1:3), sobre semillas de maíz almacenadas a humedad relativa ambiente, se registró el mayor número de esporas por gramo en el testigo, disminuyendo conforme se incrementó la proporción del follaje, teniéndose el menor número de esporas en la proporción 1:3 (cuadro 35, figura 22). Al determinarse el efecto del aceite esencial por contacto sobre semillas de maíz var. NL-V-S-2, frijol var. Delicias, trigo var. Monterrey 78-100 y sorgo var. Melacero, almacenadas a dos niveles de humedad relativa (saturada y ambiente), el mayor número de esporas se presentó en las semillas de trigo testigo, número que se redujo en el tratamiento al aplicar el aceite (cuadro 22); del mismo modo se presentaron diferencias entre los niveles de humedad relativa, en donde el trigo presentó la mayor cantidad de esporas por gramo en el tratamiento humedad relativa saturada; disminuyendo a humedad relativa ambiente (cuadro 23).

Se concluye en esta investigación que el aceite esencial de *Helietta parvifolia* es un fungicida eficaz, afectando totalmente el crecimiento de ciertas especies de

hongos de almacén sensibles a su acción, así como causando malformaciones anatómicas y fisiológicas a otras que revelaron ser más resistentes; mostrando efectos óptimos al ser aplicado por volatilidad y por contacto. Se demostró claramente que el aceite esencial es un fungicida efectivo para el control de hongos de almacén aún bajo condiciones de humedad relativa saturada, resultando tener mejor comportamiento que el fungicida comercial Captán, contra el que fue comparado; por lo cual es factible su empleo en la protección de semillas almacenadas a humedad relativa ambiente hasta por 40 semanas, así como, el empleo de los extractos y el follaje deshidratado a humedad relativa saturada hasta por ocho semanas. Se recomienda su uso, en semillas destinadas para siembra, por no afectar su germinación. Para el pequeño agricultor de las regiones donde se desarrolla ésta planta, es un recurso de fácil obtención para el control de las pudriciones poscosecha de semillas almacenadas, ya que la metodología empleada en esta investigación se puede implementar en el campo, a un bajo costo y fácil adquisición, impulsando así, el desarrollo de una agricultura orgánica.

BIBLIOGRAFIA

Acquaah, G. 2002. Principles of Crop Production. Prentice-Hall. London. p.p 8 - 10; 376-377.

Agrios, G. N. 1997. Plant Pathology. 4th. Edition. Academic Press. pp. 207-221; 364 - 367.

Altieri, M. A. 1999. Agroecología. Ed. Nordan-Comunidad. Montevideo. 338P.

Arana, J. M. 1982. Evaluación de la toxicidad del aceite esencial de la Barreta (*Helietta parvifolia*) Gray (Benth) en pollos. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. Tesis de no publicada.

Arras, G. y G. E. Grella. 1992. Wild thyme, *Thymus capitatus*, essential oil seasonal changes and antimycotic activity. Journal of Horticultural Science 67: 197-202.

Barberá , C. 1976. Pesticidas Agrícolas. Omega. Madrid. pp. 278 - 281.

Bell, D. T. 1974. The influence of osmotic pressure in tests for allelopathy. Trans III. State . Acad. Sci. 67: 312 - 317.

Chanegriha, N., N. Sabaou, A. Baaliouamer y B. Y. Meklati. 1994. Antibacterial and antifungal activity of essential oil of *Algerian cypress*. Revista Italiana EPPOS 12:5 - 12.

Chang, A. T., O. G. H. Aynilian, G. A. Cordell y N. R. Franworth. 1976. Isolation of flindersamine, isoflindersamine and a new aldaloid heliparvifoline from *Helietta parvifolia* (Rutaceae). Jour. Pharm. Sci. 65(4):561 - 563.

Christensen, C. M. y H. H. Kaufmann. 1976. Contaminación por granos almacenados. Pax. México. pp. 32 - 42.

CICOPLAFEST. 1993. Catálogo Oficial de Plaguicidas. SAGAR, SEDESOL, SEDESA, SECOFI, México, pp. 238. Cochrane, V. 1958. Physiology of fungi. Wiley. New York . pp. 25 - 26.

Colín G., H. 2002. El manejo de la humedad, alternativa para almacenar granos. Ciencia: <http://www.cuautitlan2.unam.mx/comunidad/2002/num17/uc2.17.htm>.

Correl, D. S. y M. C. Johnston. 1970. Manual of the vascular plants of Texas. Texas Research Foundation, Renner, Tx. pp. 88.

Cremlyn, R. J. 1989. Plaguicidas Modernos y su Acción Bioquímica. Limusa. México. 356 P.

_____. 1991. Agrochemicals. Wiley. New York. pp. 341 - 348.

Curtis, H. y N. S. Barnes. 2000. Biología. Ed. Médica Panamericana, 6ª. Edición. México. pp. 483.

De la I. de Bauer, M. L. 1987. Fitopatología. Limusa. México. pp. 332 - 333.

Domínguez, X. A. 1978. Métodos de Investigación Fitoquímica. Limusa, México. 204 P.

_____, A. Canales, J. A. Garza, E. Gómez y L. Garza. 1971. Constituents of leaves and branches of *Helietta parvifolia* . Phytochemistry 10 (8):1966.

Diouf, J. 2003. World Agriculture: towards 20015 / 2030. FAO summary report. <http://www.fao.org/docrep/004>.

Dubey, R.C. 1991. Fungicidal effect of essential oils of three higher plants on sclerotia of *Macrophomina phaseolina*. Indian Phytopathology 44 (2): 241 - 244.

Figuroa, B. R., B. R. Montes y M. M. Carvajal. 1995. Extractos acuosos de plantas silvestres para el control de *Aspergillus flavus* en maíz. Memorias del XXII Congreso Nacional de la Soc. Mex. de Fitopatología. Guadalajara, Jal., Mex.

Gangrade, S.K., R.D. Shrivastava, O.P. Sharma, N.K. Jain y K.C. Trivedi. 1991. *In vitro* antifungal effect of the essential oil. Indian Perfumer 35: 46 - 48.

García Vallejo, M. C. 1988. Importancia de la investigación química en la explotación de los aceites esenciales. VII Jornadas sobre plantas aromáticas. Alcoy.

Garg, S. C., J. Rajshree y R. Jain. 1991. Antifungal activity of *Capillipedium foetidum* oil . Indian Perfumer 35 (1):19 - 21.

Garg, S. C. and N. Siddiqui. 1992. Antifungal activity of some essential oil isolates. Pharmazie 47: 467 - 468.

González, A.M. E. 1985. Evaluación del efecto insecticida de la Barreta *Helietta parvifolia* Gray (Benth) (Rutaceae), sobre la mosca mexicana de la fruta (*Anastrepha ludens* Loew). Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. Tesis no publicada.

Grainge, M. and S. Ahmed. 1988. Handbook of plants with pest control properties. Wiley. New York. 470 P.

Graue, W. , B. y M. Rovalo M. 1982. Potencial alelopático y microbicida de *Helietta parvifolia* . Biótica 7(3): 405 - 408.

Graue, W., B. 1981. Estudio del potencial inhibitor y alelopático de *Helietta parvifolia* -Gray (Benth) especie del matorral submontano de Nuevo León, México. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. Tesis no publicada.

Hoseney, R. C. 1991. Principios de Ciencia y Tecnología de los Cereales. Acribia. Madrid. pp 109 - 114 y 124 - 126.

Ishart, N., A. R. Kazmi, y J. Ghulam. 1994. Effect of turmeric derivatives on radial colony growth of different fungi. Sarhad Jour. of Agriculture 10: 571 - 573.

Itieva, S. 1990. Effect of ecological conditions on *Salvia sclarea* L. growth, yield and essential oil quality. Proceedings of the 11th International Congress of Essential Oils, Fragrances and Flavours. New Delhi, India, 12-16 November, 1989 (edited by Bhattacharya, S. C. ; N. Sen and K. L. Senthil) Vol. 3: 13 - 16.

Lipsky, M. M., D. E. Hinton, J. E. Klauning and F. B.Trump. 1981. Biology of hepatocellular neoplasia in the mouse. 1. Histogenesis of safrole induced hepatocellular carcinoma. J. Natl. Cancer Institute 67:393 - 405.

Lyons, J. And F. Zalom. 1990. Progress report: Vice President's task force on pest control alternatives. California Agriculture 44(4): 20 - 22.

Lyr, H. 1987. Selectivity in modern fungicides and its basis. In: Lyr, H. (Ed.). 1987. Modern Selective Fungicides-Properties, Applications, Mechanisms of Action. Longman Group, UK Ltd. London, and VEB Gustav Verlang, Jena. Pp. 31 - 38.

Manners, J. G. 1980. Introducción a la Fitopatología. Limusa. México. 295 P.

Mishra, A. K. y N. K. Dubey. 1990. Fungitoxicity of essential oil of *Amomum subulatum* against *Aspergillus flavus*. Economic Botany 44: 530 - 533.

_____, y N. K. Dubey. 1990. Fungitoxic properties of *Prunus persica* oil. Hindustan-Antibiotics Bulletin 32: 91 - 93.

_____, S. K. Dwivedi, N. Kishore, y N. K. Dubey. 1991. Fungistatic properties of essential oil of *Cinnamomum camphora*. International Journal of Pharmacognosy 29: 259 - 262.

Montes-Belmont, R. 1996. Productos de origen vegetal para el control de fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología 14: 9 - 14.

Montes-Belmont, R., B. R. Figueroa y M. M. Carvajal. 1995. Determinación de extractos acuosos de plantas cultivadas para el control de *Aspergillus flavus* en maíz. Memorias del XXII Congreso Nacional de la Soc. Mex. de Fitopatología. Guadalajara, Jal., Mex.

_____, y M. H. E. Flores. 1999. Tratamiento de semillas de sorgo con productos naturales para el combate de *Claviceps africana* y *Fusarium moniliforme*. Memorias del XXVI y Congreso Nacional de la Soc. Mex. de Fitopatología y X Congreso Latinoamericano de la Soc. Latinoamericana de Fitopatología. Guadalajara, Jal., Mex.

_____, R., V. Cruz-Cruz, G. Martínez-Martínez, G. Sandoval-García, R. García-Licona, S. Zilch-Domínguez, L. Bravo-Luna, K. Bermúdez-Torres, H. Flores-Moctezuma, y M. Carvajal-Moreno. 2000. Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. Rev. Mex. de Fitopatología 18: 125 - 131.

Mwangi, J. W., E. W. Njunge, I. Addea-Mensah, R. W. Munavu, y W. Lwande. 1994. Antimicrobial activity of essential oil of *Lippia* species in Kenya. Discovery and Innovation 6: 58 - 60.

N.A.S. 1980. Desarrollo y control de las enfermedades de las plantas. Limusa. pp.171 - 187.

Nimarla, K., S. K. Singh, N. K. Dubey, and N. Kishore. 1988. Fungitoxic activity of essential oil of *Juniperus communis*. Indian Perfumer 33: 25 - 29.

Oerke, E. C., H. W. Dehne, F. Schönbeck and A. Weber. 1999. Crop Production and Crop Protection. Elsevier. Amsterdam. Pp. 59 - 62.

Oloke, J. K. 1992. Fungicidal effects of the volatile oil of *Aframomum melegueta*. Fitoterapia 63: 269 - 270.

Organización de las Naciones Unidas. 2003. Informe de estadísticas demográficas y de población. División de estadísticas de las Naciones Unidas. <http://www.onu.org/bases/BD Estadísticas.htm>.

Pedersen, W. L. , J. M. Perkins and D. G. White. 1986. Evaluation of Captan as a seed treatment for corn. Plant Disease 70:45 - 49.

Poswal-Mat, Akpa-Ad, Ooi-Pac (ed), Gs-Lim (ed), Teng-Ps. 1992. Proceedings of the 3rd International Conference on Plant Protection in the Tropics. No. 6, 161-167; 31 ref. Malaysian Plant Protection Society.

Putnam, A. R. and W. B. Duke. 1978. Allelopaty in agroecosystems. Ann. Rev. Phytopathology 16:431 - 451.

Rosentein, S., E. 1993. Diccionario de especialidades agroquímicas. 113 p.

Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Limusa. pp.432.

Salisbury, F. B. Y Ross C. W. 1994. Fisiología Vegetal. Ed. Iberoamerica, México, pp. 347 - 354.

Sandoval, S. A., M. A. Apodaca y B. Quintero. 1995. Efecto del extracto de semilla de toronja contra *Rhizoctonia solani* y *Erwinia carotovora in vitro*. Memorias XXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C. Guadalajara, Jal., Mex.

Singh, S.P. 1992. Allelopathic effect of some essential oils of plants on phytopathogenic fungi. Indian Society of Allelopathy, CCS Haryana Agricultural University. Hisar India. 187 - 188 pp.

Solares, C. 1982. Evaluación de la toxicidad del aceite esencial de la Barreata *Helietta parvifolia* Gray (Benth) en pollos de engorda. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. Tesis no publicada.

Suquilanda, V. M. 1996. Agricultura Orgánica. Alternativa Tecnológica del Futuro. UPS . 654 P.

Svoboda, K. P., R.K.M. Hay and P.G. Waterman. 1990. Growing summer savory (*Satureja hortensis*) in Scotland: quantitative and qualitative analysis of the volatile oil and factors influencing oil production.

Taméz, C. J. 1984. Estudios preeliminares sobre la propagación de la Barreta, *Helietta parvifolia* Gray (Benth). México. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. Tesis no publicada.

Thakur, R. N., P. Singh and M.K. Khosla. 1989. *In vitro* studies on antifungal activities of some aromatic oils. Indian Perfumer 33 (4): 257 - 260.

Tiwari, R. and V. Dixit. 1994. Fungitoxic activity of vapours of some higher plants against predominant storage fungi. National Academy Science Letters 17: 3 - 4, 55 - 57.

Toledo, V., J. Carabias, C. Toledo, C. González-Pacheco. 1989. La Producción Rural en México: alternativas ecológicas. Fundación Universo Veintiuno. pp. 23 - 27.

Torgesen, D. C. 1969. Fungicides an Advanced Treatise. Chemistry an Physiology Vol. II. Academic Press, New York. 373 P.

Vallejo-Cohen, S., M. A. Martínez-Téllez e I. C. Vargas-Arispuro. 1999. Evaluación *in vitro* del efecto de extractos vegetales sobre el desarrollo micelial de *Tilletia indica*, agente causal de Carbón parcial en trigo. Revista Mexicana de Fitopatología 17: 128 - 130.

Zalom, F. and J. Strand. 1990. Alternatives to targeted pesticides: the DANR database. *California Agriculture* 44(4): 16 - 19.

Zangerel, R. A. and F. A. Bazzaz. 1992. Theory and pattern in defense allocation. In: Fritz, R. S. and E. L. Simms. *Plant resistance to herbivores and pathogens. Ecology, Evolution and Genetics*. Univ. of Chicago Press. pp 345 - 362.

