

EFFECTO ANTIFÚNGICO DE EXTRACTOS DE GOBERNADORA (*LARREA TRIDENTATA* L.) SOBRE LA INHIBICIÓN *IN VITRO* DE *ASPERGILLUS FLAVUS* Y *PENICILLIUM* SP.

**S. Moreno-Limón¹, L.N. González-Solís², S.M. Salcedo-Martínez¹,
M.L. Cárdenas-Avila³ y A. Perales-Ramírez¹**

¹Departamento de Botánica, ²Unidad de Fitopatología del Laboratorio de Micología y Fitopatología del Departamento de Microbiología e Inmunología, ³Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Apartado Postal F 16. San Nicolás de los Garza, N.L. México. Correo electrónico: morenolimón@yahoo.com.mx

RESUMEN

México es un país importante como productor y consumidor de granos, de los cuales, el maíz destaca por su gran utilización como alimento de consumo humano. La problemática fitosanitaria se expresa por la alta susceptibilidad de los granos a ser contaminados por micotoxinas cuando son colonizados principalmente por hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. En esta investigación se evaluó la actividad fungicida de extractos alcohólicos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. La evaluación de la actividad se realizó mediante dos técnicas; la técnica del pozo en agar con la adición de 50 µL del extracto en concentraciones de 100, 200, 400 y 600 mg/mL; y la técnica dilución de extracto en agar, consistió en hacer una mezcla homogénea entre los extractos en concentración de 100 mg/mL y el agar papa dextrosa (PDA). La actividad del extracto se reflejó por la formación de un halo de inhibición en la primera técnica y por el crecimiento radial del hongo en la segunda. Los resultados arrojados por ambas técnicas permitieron detectar los efectos antifúngicos

que presentaron los extractos; destacando especialmente los etanólicos y metanólicos, ya que con ellos se lograron inhibiciones de hasta el 100% en ambas cepas, mostrando concentraciones mínimas inhibitorias que van de 3 a 7 mg/mL.

Palabras clave: hongos fitopatógenos, poscosecha, micotoxinas, extractos.

ABSTRACT

Mexico is important as a producer and consumer of grains, of which maize is paramount owing to its extensive use as human food. The problematic phytosanitary issue with this crop is the high susceptibility of the grains to contamination by dangerous mycotoxins produced principally by the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. In this experiment the antifungal activity of gobernadora (*Larrea tridentata* L.) extracts was evaluated on the *in vitro* growth of *Aspergillus flavus* and *Penicillium* sp. To evaluate the antifungal activity we used two techniques: the agar-well diffusion method with addition of 50 µL of the extract at four concentrations (100, 200, 400 and 600 mg/mL) and the agar-dilution method. This

consisted of making a homogeneous mixture of the extracts at a concentration of 100 mg/mL and potato dextrose agar (PDA). The extract activity was reflected in the formation of an inhibition halo in the first technique and radial mycelial growth in the second. The results obtained from both techniques suggest clear antifungal effects, especially with ethanol and methanol extracts. These were highly efficient, showing minimal inhibitory concentrations that ranged from 3 to 7 mg/mL and achieving up to 100% inhibition of both fungi.

Key words: extracts, fungi, mycotoxins, plant pathogens, postharvest.

INTRODUCCIÓN

El maíz es un grano que tiene numerosos y diversos usos nutricionales e industriales a nivel mundial. México es un país importante como productor y consumidor de granos, de los cuales el maíz destaca por su gran utilización principalmente como alimento para los humanos. Los factores de importancia que influyen en la contaminación y deterioro de la calidad de los granos son de dos clases: en primer lugar, los de origen biótico, fundamentalmente insectos, microorganismos, roedores y aves. En segundo lugar están los factores abióticos, que comprenden la humedad relativa, la temperatura y el tiempo de almacenamiento. La problemática fitosanitaria se expresa por la alta susceptibilidad de los granos a ser contaminados por micotoxinas cuando son colonizados principalmente por hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Las aflatoxinas producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus*, las fumonisinas, por varias especies de *Fusarium* y las ocratoxinas por especies de *Penicillium* son ejemplos

de toxinas producidas por dichos hongos en maíz. Estos hongos requieren humedad relativa ambiente entre 70-90%, contenido de agua en las semillas entre 15-20% y un rango de temperatura amplio (0-45°C) y pueden crecer a menor concentración de oxígeno (Christensen, 1987). La presencia de estas especies y sus toxinas en los granos, representa un problema de primer orden para la industria del maíz en el mundo por las enormes implicaciones que tienen tanto en la calidad del grano como en la salud pública y animal (Bacon y Nelson, 1994; Bean, 1989).

Una opción que ha sido considerada para prevenir enfermedades fúngicas en el grano de maíz, es utilizar compuestos de origen natural, que tengan la habilidad de inhibir el crecimiento del hongo y/o la producción de micotoxinas. La actividad antifúngica de las plantas ha sido muy estudiada por la resistencia a los distintos fungicidas comerciales utilizados normalmente en el control de enfermedades de cultivos agrícolas lo que ha estimulado en los últimos años la búsqueda de nuevas sustancias antifúngicas entre los productos naturales, algunos de los cuales se han mostrado efectivos contra fitopatógenos tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* (Prego *et al.*, 1999).

Existen recursos forestales como *Larrea tridentata* L. (gobernadora), que es un arbusto perteneciente a la familia Zygophyllaceae, de porte erecto, ramificado desde la base, perennifolio, de 0.6 a 3 m de altura. Se distribuye abundantemente en el norte del país, de la Península de Baja California a Tamaulipas e Hidalgo en altitudes que van en el rango de 400 a 1800 m.s.n.m. Crece en los sitios más secos

de México, en terrenos planos, laderas, lomeríos bajos (originados de materiales geológicos del cretácico superior e inferior) y en planicies aluviales (Rivera, 1986), cuya importancia crece al descubrir diferentes propiedades y aplicaciones en la industria de agroquímicos y farmacéutica. Numerosos estudios han demostrado que los extractos de gobernadora tienen acción antifúngica bajo condiciones *in vitro* en al menos 17 hongos fitopatógenos de importancia económica. De igual manera, extractos y material vegetativo molido en polvo e incorporado al suelo han confirmado inhibir o controlar *in vivo* seis hongos en cultivos agrícolas (Lira-Saldivar *et al.*, 2003; Vargas Arispuro *et al.*, 2006; Jasso *et al.*, 2007). El efecto antifúngico de extractos de *L. tridentata*, arbusto localmente conocido como “gobernadora” o “arbusto de creosota” del norte de México fue investigado mediante bioensayos inhibitorios para *Pythium* sp, a dosis de 0, 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 µL. Los resultados mostraron que el valor promedio de resina de las muestras colectadas está entre 22.60% y 25.49%. El efecto fungicida de los extractos de gobernadora se mostró consistente, independientemente del solvente usado para la extracción (Lira-Saldivar *et al.*, 2003).

Se ha reportado que la resina extraída de *L. tridentata* muestra actividad fungicida contra *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium* spp y otros hongos fitopatógenos (Brinker, 1993). Tequida-Meneses *et al.*, 2002 reportan que extractos alcohólicos de *L. tridentata* inhibieron el crecimiento de *A. flavus*, *A. niger*, *Penicillium chrysogenum*, *P. expansum*, *Fusarium poae* y *F. moniliforme* en un rango de 41.5% hasta 100% tomando en cuenta tanto los extractos metanólicos como etanólicos.

La actividad antifúngica del extracto de resina hidrosoluble de gobernadora (*L. tridentata*) fue investigada *in vitro* contra *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum coccodes* y *F. oxysporum* f. sp *licopersici*, aislados de rosas de invernadero y de lotes comerciales de papa y tomate, respectivamente. El extracto manifestó su efecto fungicida a 1000 y 2000 ppm (Lira-Saldivar *et al.*, 2003). Por otra parte, Araujo (1997) observó que el extracto de *L. tridentata* en diclorometano inhibió el 92% del crecimiento radial de *A. flavus*. Mientras que Jasso *et al.*, (2007) reportaron que el extracto de esta especie a 4 000 ppm presentó inhibición para *Colletotricum gleosporides* de 100%, en *Alternaria alternata* 66.4% y 78.9% para *Rhizopus* sp.

La actividad antifúngica de los lignanos fue evaluada por la inhibición del crecimiento radial de *A. flavus* y *A. parasiticus*. El ácido nordihidroguayarático (NDGA) extraído de *L. tridentata* fue muy efectivo inhibiendo ambos hongos a 300 y 500 ppm. Este compuesto quizá tiene potencial para el control de hongos productores de aflatoxinas (Vargas-Arispuro *et al.*, 2006).

Con base en esta información queda claro el potencial que tiene este arbusto de las zonas áridas para elaborar productos orgánicos vegetales derivados de su resina, que ayuden a promover una agricultura sostenible y de menor impacto ambiental (Lira-Saldivar *et al.*, 2003).

El presente estudio se planteó para evaluar la actividad fungicida de extractos de gobernadora para inhibir el crecimiento de algunos hongos productores de toxinas presentes en maíz y de esta manera contribuir a evitar el deterioro de la calidad del

maíz, creando así una alternativa para contrarrestar el uso de fungicidas químicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras vegetales. Se realizó una colecta de plantas de gobernadora (*L. tridentata*), obteniéndose material en el ejido el Potosí del municipio de Galeana N.L., la corroboración de la especie se realizó en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas UANL. Este material se secó a temperatura ambiente bajo sombra durante aproximadamente una semana hasta peso constante. Posteriormente cada muestra se limpió cuidadosamente, para separar las hojas, a partir de las cuales se realizaron los extractos.

Obtención y aislamiento de hongos. Veinte semillas de maíz comercial y sin desinfectar se distribuyeron en cuatro placas Petri conteniendo papa-dextrosa-agar (PDA) y se incubaron a 28°C durante 96 horas en una cámara de incubación. Una vez obtenidas las colonias fungosas fueron resembradas para su aislamiento y posterior purificación e identificación taxonómica (López, 1978).

Preparación de extractos botánicos. Los extractos botánicos fueron obtenidos a partir de hojas secas, las cuales se molieron mecánicamente hasta obtener un tamaño de partícula de 0.5-1 mm. El polvo obtenido se utilizó para la preparación de extractos utilizando cuatro diferentes solventes (etanol, metanol y acetona concentrados e hidroalcohólico agua:etanol 70:30).

A 150 g de material molido se le agregaron 500 mL de hexano y se dejó reposar por cinco días a temperatura ambiente (27°C), los frascos fueron cubiertos con papel

aluminio para evitar la incidencia de la luz. Posteriormente se filtró con papel Whatman número 4. Luego, el material vegetal se dejó secar a temperatura ambiente hasta la completa evaporación del hexano y una vez seco se dividió en tres porciones de 50g que se depositaron en matraces distintos con 150 mL de cada uno de los solventes, se agitaron durante 12 horas y posteriormente se dejaron en reposo durante cinco días. Se filtraron y se obtuvieron los extractos crudos, los cuales se colocaron en placas de vidrio y se cubrieron con papel aluminio para evitar la posible pérdida de actividad de algunos de sus compuestos y se introdujeron en una cámara de secado durante 72 horas, finalmente se recuperaron en forma sólida para prepararse en concentraciones de: 100, 200, 400 y 600 mg/mL para cada solvente.

La concentración de los extractos se determinó utilizando la técnica de diferencia en peso seco. Para esto se pesó un vial previamente tarado (P1), al cual se le agregó un mL de extracto, se pasa a una estufa a 50°C hasta que se obtenga el peso seco constante del vial (P2). Una vez obtenidos estos pesos, se utilizó la fórmula P2-P1 para obtener la diferencia en el peso, la cual corresponde a la cantidad en mg/mL que se obtuvo del extracto de interés.

Preparación del inóculo. Cada una de las especies de hongo previamente obtenidas a partir de semillas de maíz correspondientes a *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp, fueron cultivadas sobre placas con agar papa dextrosa (PDA) a 25±2°C por siete días en cajas Petri. Una vez crecidas las colonias fueron cubiertas con 10 mL de solución salina estéril al 0.85% y con 0.1% de Tween 80 (Polisorbato 80, Sigma, EU) y se agitaron durante tres minutos y mediante

una asa bacteriológica estéril, se frotó la superficie del hongo, de manera firme y suave. La suspensión así obtenida se vació directamente a un tubo de ensayo estéril y se utilizó para la realización de las diferentes pruebas homogeneizando antes de su uso. La turbidez de la suspensión celular fue medida por espectrofotometría de acuerdo a la técnica de Julman *et al.* (1998).

Evaluación de la actividad antifúngica.

Se realizó mediante dos técnicas: *a)* Técnica del pozo en agar, la cual consistió en preparar placas de Petri con medio de cultivo PDA y sembrar por extensión cada una de las cepas mediante el uso de un asa Driblasky. Posteriormente en cada placa Petri se realizaron seis perforaciones de 5 mm de diámetro (Ríos *et al.*, 1988) distribuidas en las orillas de cada placa, en las cuales se colocó respectivamente cada uno de los tratamientos (extracto etanólico, metanólico o acetónico en concentraciones de 100, 200, 400 y 600 mg/mL y los controles Captán como control positivo y los solventes como control negativo) cuidando de no rebasar la orilla del pocillo, para evitar que se derrame. Los ensayos se realizaron por triplicado, teniéndose de esta manera 18 tratamientos y 54 placas en total para cada uno de los hongos. Las placas se incubaron a 25±2°C por siete días, tomando como resultado positivo la aparición de un halo de inhibición de crecimiento, alrededor de las perforaciones. *b)* Técnica de dilución de extracto en agar, esta técnica consistió en preparar una mezcla homogénea entre el PDA y cada uno de los tratamientos que consistieron en extractos acetónicos, metanólicos, etanólicos e hidroalcohólico a una concentración de 100 mg/mL respectivamente, así como cada

uno de los controles solo PDA y solventes (metanol, etanol, acetona e hidroalcohólico). La mezcla se realizó cuando el PDA estaba a una temperatura de 50°C, posteriormente cada mezcla se vertió en placas Petri que se colocaron en refrigeración para su solidificación y posterior uso. Por otra parte en placas Petri se realizaron cultivos de cada una de las cepas, a partir de los cuales se tomaron discos de 5 mm que sirvieron como inóculo y se colocaron en el centro de las placas previamente preparadas con los diferentes tratamientos. Este ensayo se realizó por triplicado, teniendo así 36 placas por hongo. Las placas se incubaron a 25±2°C por siete días. Posteriormente se calculó el diámetro de crecimiento radial. El porcentaje de inhibición de crecimiento fue calculado tomando en cuenta que la inhibición es el inverso del crecimiento y los resultados fueron calculados mediante la siguiente fórmula (Tequida *et al.*, 2002):

$$\% \text{ de crecimiento} = \frac{\text{Diámetro del crecimiento del hongo en el extracto}}{\text{Diámetro del control negativo}} \times 100$$

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \% \text{ de crecimiento}$$

Concentración mínima inhibitoria (CMI).

Se utilizó caldo Papa Dextrosa para determinar la CMI, en el cual se inocularon 12 tubos con 1.8 mL del caldo con 200 µL de una suspensión de esporas ajustada a 530 nm 90% de transmitancia (Julman *et al.*, 1998). A cada uno de estos tubos se les agregó una concentración conocida de extracto, utilizando primeramente rangos amplios (100, 50, 10 mg/mL) y después se acortaron hasta obtener la concentración mínima para la inhibición del crecimiento de los hongos analizados (8, 6, 4, 2, 1 mg/mL).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de los extractos en función del solvente utilizado.

El rendimiento promedio de las resinas en cada uno de los extractos utilizados, mostró variabilidad en relación a los diferentes solventes. El mayor rendimiento se presenta con los solventes hidroalcohólico y metanólico con 59.2 y 53.3 mg/mL; mientras que el menor rendimiento se presentó con el solvente acetona, con 31.2 mg/mL. Estos resultados están relacionados al grado de polaridad de los diferentes solventes utilizados. Por otra parte en los extractos obtenidos se deben encontrar principalmente lignanos fenólicos, saponinas, flavonoides, aminoácidos y minerales, componentes que de acuerdo con Lira-Saldivar (2003) son los principales constituyentes en base al peso seco del follaje. Dentro de los principios activos encontrados en la resina de *Larrea* diversos autores (Brinker, 1993; Gnabre *et al.*, 1995; Clark, 1999) señalan a los lignanos fenólicos y en especial al ácido nordihidroguaiarético (NDA) como el metabolito secundario que confiere las propiedades biocidas de la gobernadora.

Evaluación de la actividad antifúngica

a) Técnica del pozo en agar. Respecto a los resultados obtenidos con la técnica del pozo en agar para *A. flavus* se observó que los halos de inhibición varían de 5 a 23 mm de diámetro, siendo esta inhibición muy similar en las cuatro concentraciones evaluadas, cuyos valores oscilan entre 12 a 21 mm para etanol, 5 a 20 mm para acetona y entre 7 y 20 mm para metanol. Respecto a *Penicillium* sp los halos de inhibición varían de 6 a 12 mm para la acetona, entre 8 y 18 mm para etanol y entre 4 y 15 mm para metanol.

El análisis de varianza demostró que tanto para *A. flavus*, como para *Penicillium* sp se presenta diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) entre los solventes utilizados; así como entre las concentraciones, mientras que en la interacción de ambos factores no hay diferencia significativa en ambas cepas.

Con respecto a la comparación múltiple de medias se puede observar (tabla 1) que en relación al crecimiento de *A. flavus*, con los extractos acetónicos se presenta la formación de tres grupos estadísticamente diferentes, obteniéndose el mayor halo de inhibición con el fungicida comercial captán (14.0 mm), siendo estos resultados estadísticamente iguales a los obtenidos con las concentraciones de 100, 200 y 600 mg/mL, mientras que con los extractos etanólicos y metanólicos, no existe diferencia estadísticamente significativa entre el captán y el resto de los tratamientos, excepto en el control negativo donde no hay inhibición. Por otra parte, en *Penicillium* sp el mayor halo de inhibición se presentó con el fungicida captán (31.50 mm) el cual es estadísticamente diferente a los halos registrados con los extractos acetónicos, etanólicos y metanólicos. Los resultados obtenidos al aplicar los extractos etanólicos superan a los obtenidos con la aplicación del fungicida comercial (captán) en cada una de las concentraciones, destacando la de 600 mg/mL al registrarse en promedio 14.5 mm y 19.0 mm, de diámetro en el halo de inhibición, respectivamente. Se resalta también el hecho que para los tres tipos de extractos la mayor inhibición se observa a 600 mg/mL, en el caso de los extractos acetónicos y etanólicos la menor inhibición se presentó en las concentraciones de 400 mg/mL; mientras que en los extractos

metanólicos se observó a 100 mg/mL. Esta tabla de comparación hace evidente la superioridad de la actividad fungicida del captán comparada con la obtenida por los tres tipos de extractos en sus diferentes concentraciones, la actividad fungicida más alta en cuanto a los extractos se obtuvo con el solvente metanol a 200 mg/mL al registrarse un halo de inhibición de 19 mm.

Al respecto Tequida-Meneses *et al.* (2002) quienes observaron que los extractos alcohólicos de *Larrea tridentata* L. mostraron una inhibición del crecimiento de *A. flavus* de 71.2 y 76%, con los solventes metanol y etanol respectivamente. Por otra parte reportan que el crecimiento de *P. expansum* se vio afectado con extractos etanólicos y metanólicos de *L. tridentata*, ya que el hongo presentó un desarrollo de 0.5 cm de diámetro; mientras que el testigo tuvo un crecimiento de 1.2 cm, esto representó una inhibición de 58.3 y 50% respectivamente, la prueba se llevó a cabo mediante la técnica de dilución de extracto en agar. Probablemente estas diferencias se deban a las concentraciones de los solventes, al método utilizado y/o a las concentraciones de los extractos, entre otros factores.

Los porcentajes de inhibición del crecimiento de *Penicillium* sp por efecto de los diferentes extractos de *L. tridentata* con respecto al efecto del fungicida comercial captán (asumiendo que la inhibición de este es del 100%), están muy por debajo y además muestran una alta variabilidad al registrarse un 31.74% con los extractos acetónicos en concentración de 400 mg/mL hasta en 67.85% con los extractos metanólicos en la concentración de 200 mg/mL.

b) Técnica de dilución del extracto en agar. Las observaciones generales sobre el crecimiento de *A. flavus* y *Penicillium* sp al aplicar los diferentes extractos pueden ser apreciadas en la figura 1 donde se refleja un comportamiento muy similar en cuanto al desarrollo del micelio, que se interpreta como inhibición de hasta el 100% con el extracto etanólico para *A. flavus* y con los extractos acetónico, etanólico y metanólico para *Penicillium* sp.

El análisis de varianza evidencia diferencia significativa ($P < 0.01$) entre las dos especies de hongos y entre los diferentes tratamientos aplicados, así como en la interacción de ambas fuentes de variación.

Con base en esto, la comparación múltiple de medias para los diámetros de crecimiento se presenta en la tabla 2, donde para *A. flavus*, en relación a los solventes utilizados demostró la formación de cuatro grupos estadísticamente diferentes, agrupándose en el primero los diámetros obtenidos con los controles PDA (63.33 mm) y metanol (61.66 mm), en el segundo se presentan los diámetros de los controles etanol y acetona, en el tercero los controles acetona e hidroalcohólico y finalmente en el tercer grupo se presentan los resultados de los extractos en concentración de 100 mg/mL con valores que van de 0.0 a 5.0 mm de diámetro de crecimiento. Por otra parte, para *Penicillium* sp se presentan cinco grupos estadísticamente diferentes, el primero de ellos corresponde al crecimiento bajo el control de PDA con 38.33 mm de diámetro, el segundo con 20.33 mm corresponde al control de etanol, en el tercer grupo están los resultados de control acetona y control hidroalcohólico, en el cuarto con 11.0 mm el control metanol, en el quinto grupo los

Tabla 1. Comparación de medias del diámetro de inhibición del crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp por acción de extractos de *Larrea tridentata* L. en diferentes concentraciones.

mg/mL	Extractos					
	<i>Aspergillus flavus</i>			<i>Penicillium</i> sp.		
	Acetónico	Etanólico	Metanólico	Acetónico	Etanólico	Metanólico
100	12.67±3.5A	16.00±1.7A	8.33±7.2A	13.00±1.7B	9.33±4.0B	14.67±2.3B
200	9.67±1.5AB	17.00±5.6A	12.00±4.0A	11.83±0.6B	11.00±1.7B	19.00±3.6B
400	4.67±4.5BC	15.00±1.0A	14.33±3.2A	10.00±0.0B	12.67±2.5B	14.33±3.8B
600	15.33±2.5A	19.00±2.7A	16.00±3.0A	12.00±0.0B	11.67±2.9B	14.33±4.0B
Captán	14.00±1.7A	14.50±5.8A	15.00±3.6A	31.50±0.6A	29.00±4.0A	28.00±3.6A
Control (-)	0.00±0.0C	0.00±0.0B	0.00±0.0B	0.00±0.0C	0.00±0.0C	0.00±0.0C

Nivel de significancia = 0.05, Tukey = 7.9449 Valores de tablas: $q < 0.05 > = 4.26$ $q < 0.01 > = 5.16$.

Nota: control negativo corresponde al solvente utilizado en cada extracto; letras diferentes en una sola columna indican diferencias significativas. Cada valor corresponde al promedio de tres repeticiones más desviación estándar.

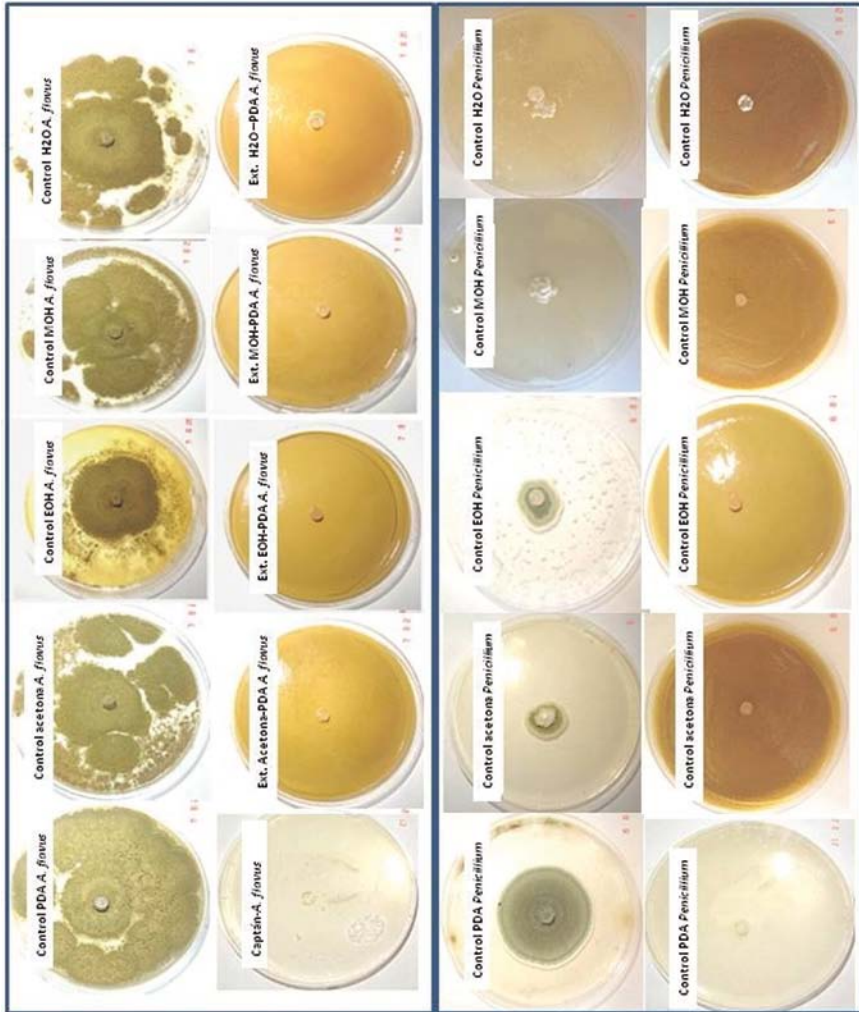


Fig. 1. Efecto inhibitorio de los extractos de *Larrea tridentata* L. sobre *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp utilizando la técnica de dilución de extracto en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa.

Tabla 2. Comparación de medias del diámetro de crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp por acción de los diferentes tratamientos mezclados con el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa.

<i>Aspergillus flavus</i>		<i>Penicillium</i> sp	
Tratamientos		Tratamientos	
Control (PDA)	63.33±5.8A	Control (PDA)	38.33±2.9A
Control- (metanol)	61.66±2.9A	Control- (etanol)	20.33±0.6B
Control- (etanol)	48.33±2.9B	Control- (acetona)	15.66±0.6C
Control- (acetona)	45.00±0.0BC	Control- (H ₂ O)	15.00±0.0C
Control- (H ₂ O)	41.66±1.5C	Control- (metanol)	11.00±0.0D
Ext. hidroalcohólico 100 mg/mL	5.00±0.0D	Ext. hidroalcohólico 100 mg/mL	1.66±0.0E
Ext. acetonico 100 mg/mL	5.00±0.0D	Ext. acetonico 100 mg/mL	0.00±0.0E
Ext. metanólico 100 mg/mL	5.00±0.0D	Ext. etanólico 100 mg/mL	0.00±0.0E
Ext. etanólico 100 mg/mL	0.00±0.0D	Ext. metanólico 100 mg/mL	0.00±0.0E

Nivel de significancia = 0.05, Tukey = 3.4115 Valores de tablas: $q < 0.05 > = 3.83$ $q < 0.01 > = 4.78$.

Nota: Letras diferentes en una sola columna indican diferencias significativas; PDA agar papa dextrosa. Control negativo corresponde al solvente utilizado en cada extracto. Cada valor corresponde al promedio de tres repeticiones más desviación estándar.

resultados de los extractos con 0.0 y 1.66 mm. Como es evidente, en comparación con el crecimiento que se observa en las placas que sólo contienen PDA, los extractos en 100 mg/mL, independientemente del solvente inhiben significativamente el crecimiento de ambas especies.

Con esta técnica se pudieron determinar los porcentajes de crecimiento e inhibición del crecimiento de *A. flavus* y *Penicillium* sp con respecto a cada uno de los controles establecidos en el estudio. Con respecto a los ensayos preliminares efectuados para observar la inhibición del crecimiento fúngico, las técnicas presentaron algunas diferencias, en cuanto a la demostración de la actividad inhibitoria de los extractos, ya que en la técnica del pocillo en agar, se probaron cuatro concentraciones distintas; y en algunos casos como en los extractos acetónicos, la concentración del extracto y el efecto inhibitorio no fueron directamente proporcionales; probablemente se deba a que los componentes de la planta responsables de tal efecto varían en cuanto a la concentración para tener una difusión óptima, esto se observa al realizar la prueba de dilución de extracto en agar donde se mezclan de manera homogénea ambos componentes logrando una total difusión de los metabolitos, donde los porcentajes de inhibición del crecimiento son mayores al 99.0 por ciento.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada uno de los extractos varió de 3 a 7 mg/ml. El extracto hidroalcohólico requiere mayor cantidad de extracto que el resto en ambas cepas ya que para *A. flavus* el requerimiento es de 7 mg/mL y en *Penicillium* sp. 5 mg/mL,

mientras que para el resto de los extractos la CMI se encuentra en 3 mg/mL para ambas cepas. Jasso *et al.*, 2007 reportan que el extracto de *L. tridentata* a 4 mg/mL presentó inhibición para *C. gleosporides* de 100 %, para *A. alternata* 66.4 % y para *Rhizopus* sp 78.9%. Lira-Saldivar *et al.*, 2003 realizaron ensayos inhibitorios para *Pythium* sp, a dosis de 0.5, 1, 2, 4, y 8 mg/mL. Los valores obtenidos están dentro del margen establecido por otros estudios y otras cepas, lo que manifiesta el amplio espectro de acción de la planta independientemente de la técnica aplicada.

Cabe señalar que de acuerdo con Ríos, *et al.*; (1988) es sumamente difícil estandarizar un procedimiento para el estudio de las plantas como antimicrobianos, ya que existen diversos factores que están involucrados y que pueden influir de manera importante en los resultados obtenidos; se puede mencionar, la composición del medio de cultivo, método de extracción, pH, solubilidad de la muestra en el medio de cultivo, y el microorganismo en cuestión.

Con base en los efectos que presentaron los extractos, especialmente etanólicos y metanólicos, se propone que se efectúen estudios más profundos para determinar su potencialidad para el control de microorganismos fitopatógenos que atacan cultivos de alto valor, ya sea en campo cuando se encuentran en pleno desarrollo o producción, o bien durante la cosecha y posterior almacenamiento. Incluso se pueden hacer las extracciones con otros solventes diferentes o con mezclas de éstos, ya que la cantidad y tipos de compuestos extraídos pueden variar dependiendo del solvente utilizado.

CONCLUSIONES

L. tridentata inhibe el crecimiento de *A. flavus* y *Penicillium* sp. *in vitro*. El tipo de solvente no fue un factor determinante en el efecto inhibitorio, para el caso de *Penicillium* sp, no así, en el caso de *A. flavus* donde los extractos etanólicos demostraron un mayor efecto. La técnica de dilución del extracto en agar permite una mayor difusión de los componentes en el medio. La Concentración Mínima Inhibitoria para *A. flavus* fue de 3 mg/mL en acetona y de 7 mg/mL en hidroalcohólico, mientras que para *Penicillium* sp fue de 3 mg/mL en acetona y de 5 mg/mL en hidroalcohólico.

LITERATURA CITADA

- Araujo, B.S.R., 1997. "Evaluación de la actividad fungicida y aflatoxigénica de extractos de plantas del estado de Sonora para el control de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*". Tesis profesional. Universidad Autónoma de Sonora, México.
- Bacon, C.W., Nelson, P.E., 1994. "Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*". *J. of Food Protection*, **57**(6): 514-521.
- Bean, G.A., 1989. "Maize mycotoxins in Latin America". *Plant Dis.*, **73**: 597-600.
- Brinker, F., 1993. "*Larrea tridentata* (D.C) (Chaparral or cresote bush)". *British Journal of Phytoterapy*, **3**: 10-30.
- Christensen, C.M., 1987. *Field and Storage Fungi*. Beuchat LR, ed. Food and Beverage Mycology. New York, Van Nostrand Reinhold. pp. 211-232.
- Clark, D., 1999. *Treating Herpes Naturally with Larrea tridentate*. Published by U.S. Botanicals. Tempe, Arizona, USA. 42 p.
- Craig, J., Callahan, M., Huang, R.C.C., DeLucia, A.L., 2000. "Inhibition of Human Papillomavirus Type 16 Gene Expression by Nordihydroguaiaretic Acid Plant Lignan Derivatives". *Antiviral Research*, **47**: 19-28.
- Gnabre, J.N., Brady, J.L., Clanton, D.J., 1995. "Inhibition of human immunodeficiency virus type I transcription and replication by NDA sequence-selective plant lignin". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **92**: 11239-11246.
- Jasso de Rodríguez, D., Rodríguez-García R., Hernández-Castillo, F.D., Villarreal Quintanilla, J.A., Galván-Cendejas, A., 2007. "Antifungal effects *in vitro* of semiarid plant extracts against post-harvest fungi". *AAIC Annual Meeting: Bringing Industrial Crops into the Future*. October 7-10. Portland, Maine.
- Julman, R., Cermeño, V., Torres Josep, R., 1998. "Método espectrofotométrico en la preparación del inóculo de hongos dematiáceos". *Rev Iberoam Micol.*, **15**: 155-157.
- Lira-Saldivar, R.H., 2003. "Estado Actual del Conocimiento Sobre las Propiedades Biocidas de la Gobernadora [*Larrea tridentata* (D.C.) Coville]". *Revista*

- Mexicana de Fitopatología*, **21**: 214-222.
- Lira-Saldívar, R.H; Sanchez, M.R; Gamboa, R; Jasso. D; Rodríguez, R., 2003. "Fungitoxic effect of *Larrea tridentata* resin extracts from the Chihuahua and Sonora deserts on *Alternaria solani*". *Agrochimica*, **47**: 50-60.
- López, A.G.F., 1978. "Técnicas de uso común en el manejo de hongos fitopatógenos. [Technics of common use in phytopatogen fungus management]". Chapingo (México), Bib. pp. 131-134. Biblioteca Central, ENA, Chapingo.
- Prego, M., Díaz, J., Merino, F., 1999. "Actividad antifúngica de la capsicina frente a varios hongos fitopatógenos". *Memorias, XIII Reunión Nacional de Sociedad Española de Fisiología Vegetal*.
- Ríos, J., Recio, M., Villar, A., 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **23**(2-3): 127-149.
- Stege, P.W., Davicino, R.C., Vega, A.E., Casali, Y.A., Correa, S., Micalizzi, B., 2006. "Antimicrobial activity of aqueous extracts of *Larrea divaricata* Cav (jarilla) against *Helicobacter pylori*". *Phytomedicine*, Nov:**13**(9-10): 724-727.
- Tequida-Meneses, M., Cortez-Rocha, M., Rosas-Burgos, E.C., López-Sandoval, S., Corrales-Maldonado, C., 2002. "Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*". *Rev Iberoam Micol.*, **19**: 84-88.
- Vargas-Arispuro, I., Contreras-Valenzuela, A., Hernández-Martínez, J., Martínez-Téllez, A., 2006. "Arielselenofosfatos con acción antifúngica selectiva contra *Phytophthora omnivora*", *Revista de fitotecnia Mexicana*. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. Chapingo, México. **28**(002):171-174. ISSN 0187-7380.