



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Horticultura Ambiental

Efecto de extractos de *Larrea tridentata* (DC.) Coville en la inhibición de *Fusarium oxysporum* y en la germinación de semillas de *Solanum lycopersicum* L.

TESIS INDIVIDUAL

Como parte de los requisitos para obtener el título de

Licenciada en Horticultura Ambiental

Presenta

Sandra Oropeza Lara

Dirigido por

Santiago Vergara Pineda

Campus Juriquilla

Santiago de Querétaro, Querétaro, 2024

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.

RESUMEN

La gobernadora, *Larrea tridentata* (DC.) Coville, es un arbusto perenne con una amplia distribución desde el suroeste de Estados Unidos hasta la zona centro de México. Sus hojas están envueltas en una capa de resina, la cual contiene diversos componentes, el principal es Ácido nordihidroguaiarético (NDGA), con una amplia actividad antimicrobiana. Se han realizado diferentes estudios para conocer sus efectos inhibitorios, sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos, por medio de extractos obtenidos con diferentes solventes, sin embargo, existe poca información sobre sus efectos en material vegetal y desarrollo de plántulas. En este trabajo se observó la eficiencia de extractos de *L. tridentata* en cultivo *in vitro* sobre *Fusarium oxysporum* con 96.75% de inhibición con extractos etanólicos y 4.72% en acuosos, además de sus efectos sobre la germinación de semillas con una disminución de 36% y 48% en extractos etanólicos y un aumento de 8% en extractos acuosos comparado al control. Se requiere más investigación para conocer las vías de uso de los extractos esta planta como fungicida de origen botánico.

Palabras clave: *L. tridentata*, extractos, inhibición, semillas.

SUMMARY

The creosote bush *Larrea tridentata* (DC.) Coville is a perennial shrub with a wide distribution from the southwest United States to central Mexico. Its leaves are wrapped in a layer of resin, which contains several components, the main one being nordihydroguaiaretic acid (NDGA), one of the best antioxidants. Different studies have been carried out to understand its inhibitory effects of *Larrea tridentata* extracts on the growth of phytopathogenic fungi; these extracts have been obtained with different solvents, but the information about its effect on seedling development is scarce. In this study, the efficiency of *Larrea tridentata* extracts *in vitro* culture against *Fusarium oxysporum* was observed with 96.75% inhibition with ethanolic extracts and 4.72% in aqueous extracts, in addition to its effects on seed germination with a decrease of 36% and 48% in extracts ethanolic and an increase of 8% in aqueous extracts compared to the control. More research is needed to understand the ways in which extracts of this plant can be used as a fungicide of botanical origin.

Keywords: *L. tridentata*, extracts, inhibition, seeds.

DEDICATORIAS

Para mi esposo, madre, hermanos y Liz y Pao.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro y directivos por la disposición de las instalaciones e insumos necesarios para la realización de este trabajo, así como a los profesores de la licenciatura en Horticultura Ambiental, el esfuerzo dedicado a la enseñanza es transmisible a los que formamos parte de la carrera.

A los diferentes departamentos como la Unidad Viverística y Hortofrutícola Amazcala (UVHA), de la Universidad Autónoma de Querétaro campus Amazcala por proporcionar los frutos necesarios para a obtención de semillas. Al área de Sanidad Forestal de la Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencia Naturales, Campus Juriquilla y a Nahúm Uribe Arteaga por el apoyo en el aislamiento del hongo fitopatógeno. Y al departamento de la Licenciatura en Horticultura ambiental por brindar el apoyo con los equipos necesarios.

A los profesores que formaron parte del proceso de este trabajo, al Doctor Santiago Vergara Pineda como director y a los asesores, las Doctoras Mónica Queijeiro Bolaños y Fabiola Magallán Hernández, así como al Doctor Fidel Landeros Jaime; por la paciencia y tiempo dedicado a que concluyera esta parte del proceso académico.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	10
2. ANTECEDENTES	11
2.1. <i>Larrea tridentata</i> (DC.) Coville	11
2.2. <i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht	14
2.3. Potencial de uso de extractos de <i>Larrea tridentata</i> contra <i>F. oxysporum</i>	18
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVOS	20
4.1. General	20
4.2. Específicos	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1. Material vegetal	21
5.2. Obtención de <i>Fusarium oxysporum</i>	21
5.3. Preparación de extractos	22
5.4. Pruebas <i>in vitro</i> en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA)	23
5.5. Prueba <i>in vitro</i> sobre semillas	25
5.6. Análisis estadístico	26
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
6.1. Determinación del efecto inhibitorio de los extractos etanólicos de <i>L. tridentata</i> sobre <i>F. oxysporum</i> .	27

6.2. Determinación del efecto inhibitorio de los extractos acuosos de <i>L. tridentata</i> sobre <i>F. oxysporum</i> .	31
6.3. Determinación del efecto en la germinación de semillas con los extractos de <i>L. tridentata</i> .	35
7. CONCLUSIONES	40
8. REFERENCIAS	41

ÍNDICE CUADROS

Tabla 1. Porcentaje de inhibición y tasa relativa de crecimiento (TRC) con el desglose de las abreviaciones para cada tratamiento en extractos etanólicos.	28
Tabla 2. Porcentaje de inhibición y tasa relativa de crecimiento (TRC) con el desglose de las abreviaciones para cada tratamiento en extractos acuosos.	32
Tabla 3. Concentrado del promedio de las diferentes pruebas para los extractos de etanol y agua	35
Tabla 4. Desglose de los tratamientos para la prueba de germinación in vitro	38

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. <i>Larrea tridentata</i> en hábitat natural	12
Figura 2. Planta de <i>L. tridentata</i> en floración y fructificación	12
Figura 3. Distribución aproximada de <i>Larrea tridentata</i> en el estado de Querétaro	13
Figura 4. Corte transversal de la hoja de <i>L. tridentata</i> , se aprecia la resina contenida en células epidermales (160 X)	14
Figura 5. Morfología de los diferentes tipos de esporas de <i>F. oxysporum</i>	16
Figura 6. Dendograma obtenido de la secuenciación de los resultados de PCR del hongo fitopatógeno, <i>Fusarium oxysporum</i>	24
Figura 7. Resultados del porcentaje de inhibición en extractos etanólicos	29
Figura 8. Resultados de la Tasa Relativa de Crecimiento en extractos etanólicos	29
Figura 9. Efecto de inhibición, extractos etanólicos, en el crecimiento de <i>F. oxysporum</i> con la técnica de medio envenenado; tratamientos con 2000 mg/L de PDA	30
Figura 10. Efecto de inhibición, extractos etanólicos, en el crecimiento de <i>F. oxysporum</i> con la técnica de medio envenenado; tratamientos con 1000 mg/L de PDA	30
Figura 11. Efecto de inhibición, extractos etanólicos, en el crecimiento de <i>F. oxysporum</i> con la técnica de medio envenenado; tratamientos con 500 mg/L de PDA	30
Figura 12. Resultados porcentaje de inhibición en extractos acuosos	32
Figura 13. Resultados de la Tasa Relativa de Crecimiento en extractos acuosos	33
Figura 14. Efecto de inhibición, extractos acuosos, en el crecimiento de <i>F. oxysporum</i> con la técnica de medio envenenado; tratamientos con 20 ml/L de PDA	33
Figura 15. Efecto de inhibición, extractos acuosos, en el crecimiento de <i>F. oxysporum</i> con la técnica de medio envenenado; tratamientos con 10 ml/L de PDA	34
Figura 16. Efecto de inhibición, extractos acuosos, en el crecimiento de <i>F. oxysporum</i> con la técnica de medio envenenado; tratamientos con 5 ml/L de PDA	34

Figura 17. Resultados porcentaje de germinación para los diferentes tratamientos en pruebas con semillas 37

Figura 18. Pruebas sobre semillas en condiciones *in vitro* 38

1. INTRODUCCIÓN

Larrea tridentata es un arbusto fuertemente aromático con ramificación abundante y flexible; es abundante y en ocasiones dominante en regiones áridas desde el suroeste de Estados Unidos hasta algunos estados de la República Mexicana como Baja California, Baja California Sur, Sonora, Coahuila, Durango, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro e Hidalgo. En estas zonas se registran nombres comunes como gobernadora, Hediondilla, Huamis y Falsa alcaparra; en Estados Unidos es conocida como, “Creosote bush” (Rzedowski y Rzedowski, 1994). Algunos de sus usos son como colorante; tiene reputación como planta medicinal, pero su venta para té se encuentra prohibida ya que puede causar daño al hígado. Se ha utilizado como forraje, sin embargo, muchos animales no la comen; es útil para recuperar áreas degradadas en zonas áridas (Heike *et al.*, 2009). Se ha documentado la presencia de una resina rica en flavonoides, fenoles y proteínas en las hojas de esta planta (Martins *et al.*, 2011), lo cual ha despertado el interés por conocer sus propiedades, desde el ámbito médico hasta en la agricultura. Para su uso se ha recurrido a la extracción de dichos fitoquímicos por medio de técnicas como ultrasonido, microondas, reflujo de calor (Martins *et al.* 2010) y maceración sólido-líquido, siendo esta la técnica más utilizada, para esto es importante definir las variables de solvente y cantidad del mismo para maximizar la extracción (Martins *et al.*, 2011).

Los extractos vegetales se han vuelto una forma de obtener diferentes productos de origen botánico como fungicidas e insecticidas y con ello disminuir el uso de productos de síntesis química contra plagas y enfermedades, que con el paso del tiempo han generado preocupación por toxicidad, contaminación al ambiente y suelos, afectación a la biodiversidad y la aparición de resistencia microbiana (Mesa *et al.*, 2019). Al realizar una extracción de material vegetal se espera obtener los metabolitos secundarios que la planta puede poseer, los cuales funcionan como estrategias defensivas de la misma (Celis *et al.*, 2008). El interés sobre la actividad biocida de los metabolitos secundarios se debe a que afectan el desarrollo y metabolismo energético de otros organismos (Céspedes y Alarcon, 2011), además estos fitoquímicos son biodegradables en un período más corto de tiempo (Berenbaum, 1989).

Una de las características que se busca en la elección de plantas para la obtención de controladores botánicos es que, en condiciones naturales y por conocimiento empírico, éstas no se vean siendo depredadas o afectadas por alguna enfermedad, es decir que de forma natural cuenta con fitoquímicos capaces de ayudar a su sobrevivencia en el medio ambiente; este es el caso de la gobernadora, de la cual se ha demostrado su riqueza en componentes fitoquímicos desarrollados para su adaptación a las condiciones climáticas y de supervivencia, también se le atribuye ser una planta que desplaza a otras especies inhibiendo el crecimiento de vegetación que se desarrolla cerca, pero a su vez Heike *et al.*, (2009) la describen como planta nodriza y de sombra para muchos animales y plantas en el desierto.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Larrea tridentata* (DC.) Coville

De acuerdo con Trópicos 2023, *Larrea tridentata* se ubica, taxonómicamente dentro de la clase Equisetopsida, mencionado como el grupo de plantas terrestres (Chase y Reveal, 2009); subclase: Magnoliidae, que su característica más significativa son granos de polen tricolpados (Thorne, 2000); orden: Zygothylales, árboles, arbustos y hierbas encontradas, generalmente en zonas áridas, con dos familias, 22 géneros y aproximadamente 300 especies (Singh, 2023); Superorden: Rosanae, el cual según APG III (2009), consta de 17 ordenes (Chase y Reveal, 2009); familia Zygothylaceae, esta familia cuenta con cerca de 30 géneros y 250 especies, con una distribución preferente a regiones de clima seco, algunas especies son de amplia importancia en matorrales xerófilos, son plantas arbustivas, aromáticas y con tejido glandular que produce abundante resina; frutos globosos en forma de cápsula, densamente pubescentes, se separa en 5 mericarpios al madurar con semilla solitaria; se reconocen cinco especies, dentro de este género como las fanerógamas mejor adaptadas a condiciones de sequía (Rzedowski y Rzedowski, 1994).

Larrea tridentata (Figura 1) es descrita como un arbusto perenne que puede llegar a los dos metros de altura; con ramificación abundante; flores de aproximadamente 2.5 cm de diámetro; pétalos de color amarillo de un centímetro de largo; fruto subgloboso a ovoide, de alrededor de 7 mm de alto, con pelos blancos, sedosos que se vuelven café-rojizo con el tiempo, cada fruto contiene una semilla fértil; las semillas son color café a negras, de unos 2

a 4 mm de largo (Figura 2); tiene una amplia distribución desde el suroeste de Estados Unidos hasta la zona centro de México (Rzedowski y Rzedowski 1994), se estima que se distribuye en un 25% (500,000 km²) del país (García, 2012).



Figura 1. *Larrea tridentata* en hábitat natural en Querétaro. Fotografía por Santiago Vergara Pineda.



Figura 2. Planta de *L. tridentata* en floración y fructificación. Fotografía por Santiago Vergara Pineda.

Es reportada como abundante y dominante en matorrales xerófilos en el estado de Querétaro, su distribución aproximada es principalmente en los municipios de Cadereyta de Montes, Tolimán y Peñamiller (Figura 3), sin problemas de sobrevivencia; crece en suelos ricos en carbonatos de calcio en la cuenca del Río Estoráx con altitudes entre 1450-2100 m, en la zona de Peña Blanca, carretera Jalpan-Querétaro y entre Bernal e Higuierillas; con una floración y/o fructificación en los meses de mayo a septiembre (Rzedowski y Rzedowski, 1994).



Figura 3. Distribución aproximada de *Larrea tridentata* en el estado de Querétaro. Fuente: Imagen original: INEGI, 2018. Edición: propia.

Se ha documentado que las hojas de *L. tridentata* están envueltas en una capa de resina producida por tricomas durante el desarrollo de la lámina foliar (Figura 4) y que puede llegar a ser el 20% o más del peso seco de la hoja, la cual hace menos digestivo el follaje (Rhoades, 1977; Lira-Saldívar, 2003). También se comporta como antitranspirante debido a que forma una barrera en la hoja (Meinzaer *et al.*, 1990; González-Coloma *et al.*, 1994; Lira-Saldívar, 2003). Se considera que la resina funciona como filtro contra la radiación solar UV y protege a la planta contra insectos y animales (Barbour *et al.*, 1977; Downum *et al.*, 1988; Lira-Saldívar, 2003). Estas características son dadas por los componentes de la resina, el principal es Ácido nordihidroguaiarético (NDGA) un lignano fenólico de gran interés en el área de la salud por sus actividades biológicas como antiviral, antifúngico y antibacteriano (Hwu *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2011) y uno de los antioxidantes mejor conocido (Singler *et al.*, 1974; Lira-Saldívar, 2003). La concentración de NDGA es cerca del 50% de la resina (Sakakibara *et al.*, 1976; Lira-Saldívar, 2003), mientras que la otra mitad contiene más de 20 flavonoides diferentes con distintos posibles efectos (Lira-Saldívar, 2003). Estos componentes han llevado a realizar diferentes estudios sobre las características biocidas de la gobernadora, entre ellos como fungicida de origen botánico para el control de hongos de interés económico.

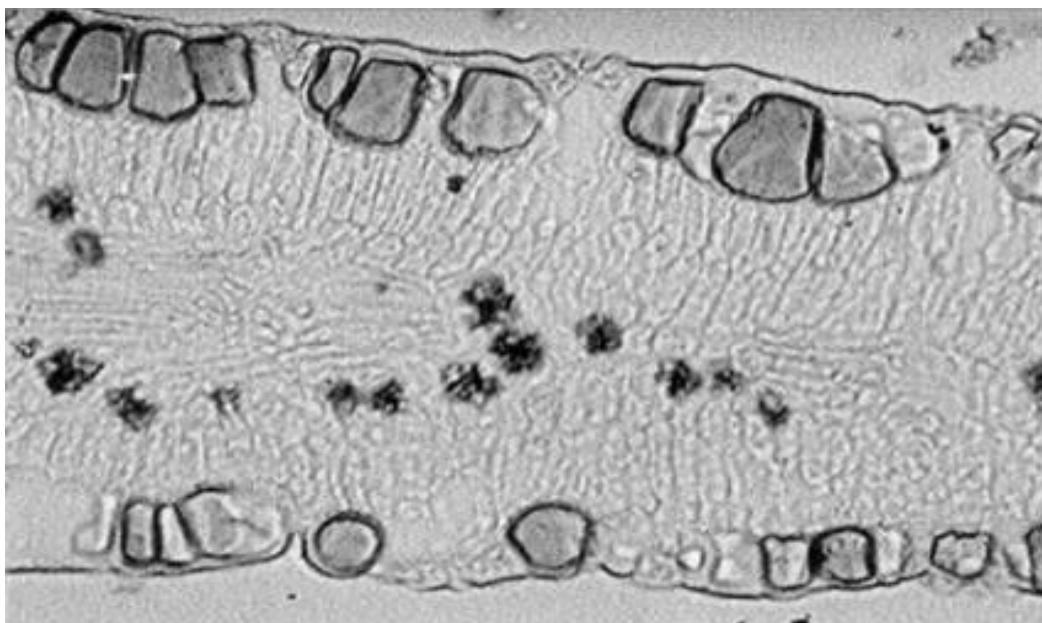


Figura 4. Corte transversal de la hoja de *L. tridentata*, se aprecia la resina contenida en células epidermales (160 X) (Lira-Saldívar, 2003).

2.2. *Fusarium oxysporum* Schlecht.

Fusarium es un género de hongos que se encuentran en diversos ambientes alrededor del mundo, se han reconocido hasta 78 especies de este género, los cuales se pueden encontrar como saprófitos o patógenos de plantas o animales; algunas de las enfermedades que causa en plantas son pudrición en raíces y frutos, tizones, manchas en hojas, canchales, marchitez vascular, hasta muerte regresiva; su sistema taxonómico se basa en las características de la colonia y tipo de esporas, principalmente (Nelson, 1981). Basándose en EPPO (2022) *Fusarium oxysporum*, se ubica taxonómicamente dentro del filo Ascomycota, los cuales se caracterizan por presentar sus esporas en una especie de saco o bolsa llamada “asca”, a estas esporas se les puede llamar ascosporas; es el grupo con mayor número de especies (Chacón, S y Utreta E., 2022); clase: Sordariomycetes, es la clase más grande del grupo Ascomycota, con aproximadamente 600 géneros y más de 3,000 especies (Zhang, *et al.*, 2006); orden: Hypocreales, se caracterizan por presentar peritecios solitarios (Raymundo, *et al.*, 2017); familia: Nectriaceae, este es un grupo que presenta hongos holomorfos y ha contribuido a comprender la relación entre especies; sus conidios tienden a ser fragmentados (Rossman, 2000).

Fusarium oxysporum, se caracteriza por un micelio color blanco o durazno con tonos púrpuras, esta especie tiene variaciones, obteniendo así, varias cepas, las cuales pueden tener capacidades específicas para cada huésped en particular. Las características del micelio en cultivo varía más por cuestiones ecológicas y geográficas que por la cepa (Booth, 1917). Presenta tres tipos de esporas (Figura 5): macroconidias, microconidias y clamidosporas; las macroconidias tienen paredes delgadas, largas, en forma de canoa, septadas, con una célula basal en forma de pie y la célula apical puntiaguda, se producen principalmente en conidióforos ramificados en la superficie de la colonia. Las microconidias son cortas, en forma de riñón, compuestas por una a dos células, son predominantes en tejido vegetal infectado. Las clamidosporas, esporas asexuales que se producen en las hifas, tienen paredes gruesas lo que las hace más resistentes y ayuda a su sobrevivencia (Nelson, 1981). Es considerada la especie de mayor importancia económica ya que, causa la enfermedad marchitez vascular a un diverso grupo de plantas como: tomate, lino, lentejas, melón, plantas ornamentales y palmeras, entre otros; algunos de los síntomas de esta enfermedad son el

marchitamiento en brotes u hojas inferiores acompañado de una clorosis, los síntomas se mueven de forma ascendente, hasta que toda la planta se marchita y muere (Nelson 1981). También se caracteriza por pertenecer a una de las enfermedades más conocidas y serias, llamada “Damping off”, que es causada por tres hongos atacando a las semillas en el suelo (IFOAM, 2003), entre estos hongos encontramos a *Fusarium*, el cual ataca a la semilla cubriéndola con un micelio blanquecino y pudriendo las raíces desarrolladas, mientras que los otros dos hongos (*Phyium* y *Rhizoctonia*) atacan directamente a la semilla volviéndola blanda; de esta manera la semilla no logra germinar. En el caso de semillas geminadas, atacan en la base del tallo, pudriendo raíces (Fundación Valles, 2011).

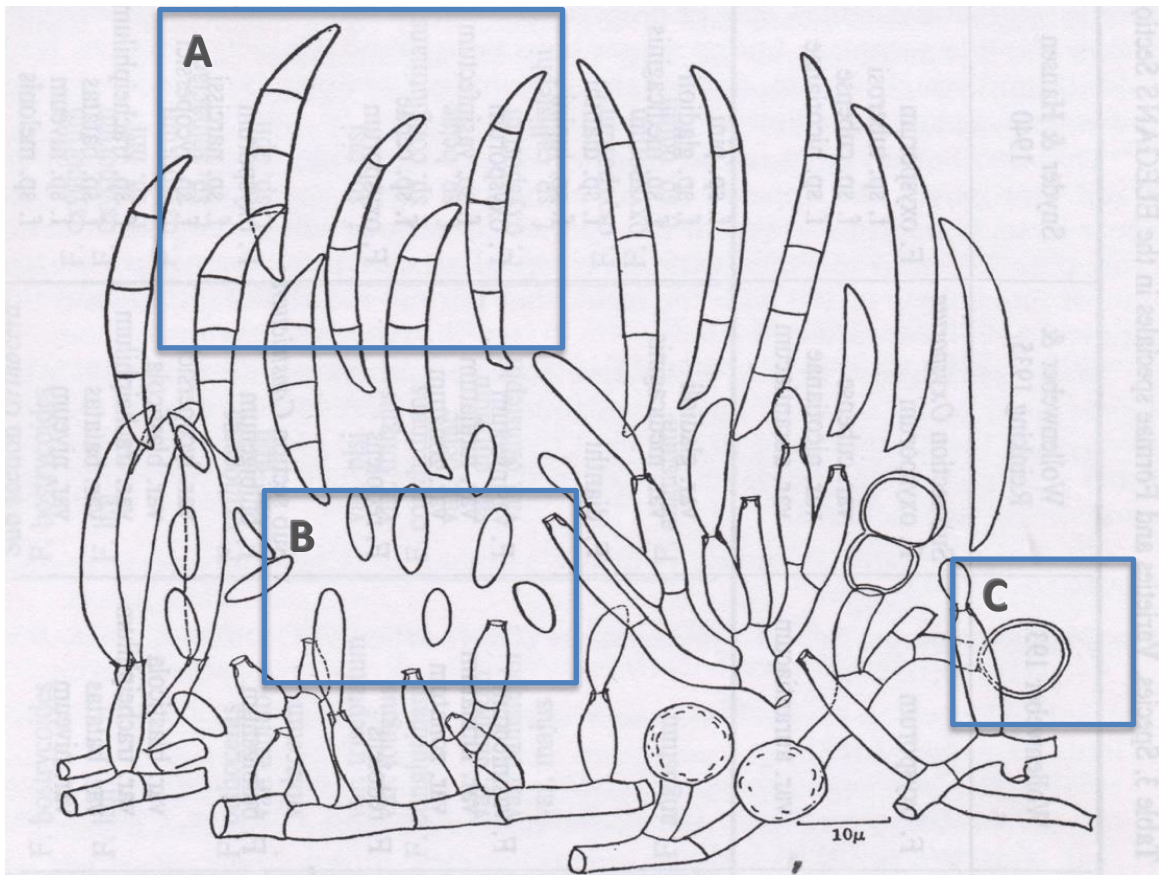


Figura 5. Morfología de los diferentes tipos de esporas de *F. oxysporum* A: Macroconidias. B: Microconidias. C: Clamidosporas. Fuente: imagen original: Booth, 1917. Edición: propia.

Su diseminación se da por viento, agua de riego, suelo, semillas o esquejes vegetativos, con esto último, se ha llevado a realizar indexación para descartar la presencia del patógeno y que se pueda seguir con su comercialización. En la semilla, el patógeno puede sobrevivir hasta 7 meses (Elliot y Crawford, 1922; Nelson, 1981), algunos ejemplos donde se puede encontrar semillas contaminadas son: guisantes, tomate, lino y garbanzo, entre otros. Su ciclo biológico consta de su forma latente como clamidosporas, hasta que entra en contacto con material vegetal susceptible, germina y con esto aparecen conidios; en la mayoría de los casos la infección se da en las raíces o alguna herida en la planta hospedante y se mueve al tejido vascular, comienza a invadir las células del xilema, para después llegar a los tejidos adyacentes. En algunas ocasiones los canchales en el tallo son el resultado de una extensa colonización; y así la enfermedad lleva a la planta hasta la muerte, cuando el hospedante muere, el hongo regresa al suelo; también puede invadir individuos sin causarle ningún síntoma y esto ayuda a su supervivencia (Nelson, 1981).

El control de organismos tan resistentes como *F. oxysporum* requiere de prácticas de control biológico, cultural y químico, siendo este último el más utilizado (Rubio et al., 2008; Villa, et al., 2015), pues se utilizan fungicidas sistémicos los cuales pueden presentar agentes mutagénicos en plantas, así como aumentar la resistencia del patógeno (Agrios, 2005; Villa, 2014). También se recurre a un manejo sobre el suelo con solarizaciones, inundaciones y fumigación con bromuro de metilo, pero este último ha sido clasificado como degradador del ozono (Vásquez y Castaño, 2017). Se ha llegado a una búsqueda creciente de alternativas a los agroquímicos por la creciente resistencia a los plaguicidas, uso inadecuado de estos productos, desgaste ambiental y peligro a la salud humana. El desarrollo de nuevas alternativas ayuda a reducir la dependencia a plaguicidas sintéticos (Villa, 2014) y puede ser efectivo si se comprende la agroecología y sus limitaciones (Antoun, 2013; Vázquez, 2017). Uno de los métodos que se ha estudiado son los compuestos obtenidos de fuentes vegetales, a principios del siglo XX, en la agricultura se utilizaban polvos y extractos de plantas, como el tabaco, contra insectos plaga (Rodríguez y Lagunes, 1992; Jacobson y Crosby, 1971; Montes, 2009). También se ha trabajado con extractos vegetales de diversas plantas como: *Flourensia* sp., *Allium sativum*, *Azadirachta indica*, *Cymbopogon proximus* y *Datura metel*, entre otras, que han sido probados contra *F. oxysporum* teniendo altos porcentajes de

inhibición. Sin embargo, es difícil obtener productos naturales eficientes y estables para proteger a las plantas, pero se siguen estudiando sus interacciones (Villa, 2014).

2.3. Potencial uso de extractos de *L. tridentata* contra *F. oxysporum*

Existen diversos trabajos para conocer los efectos inhibitorios de *L. tridentata* contra el crecimiento de hongos fitopatógenos, la forma más común en la que es utilizada es por medio de extractos, los cuales se obtienen con solventes como etanol, metanol, cloroformo, diclorometano, acetona y agua. Con esto se han observado diferentes resultados sobre el porcentaje de inhibición en el crecimiento del hongo y en la obtención de los fitoestrógenos de la planta.

Martins *et al.* (2011) estudiaron el efecto de diferentes solventes orgánicos los cuales fueron, metanol, etanol, acetona y agua en diferentes concentraciones, para la extracción de los fenoles y flavonoides de *L. tridentata*. Realizaron un conteo de dichos compuestos, con esto se observó, en cuanto a fenoles, que se presentan en mayor cantidad con solvente acetona, seguido por metanol y etanol, en cuanto al solvente agua, la cantidad fue significativamente más baja comparada con los demás. En flavonoides el solvente con mejores resultados fue metanol, seguido por etanol y acetona, para la disolución en agua los resultados fueron igual que en el caso de fenoles y esto mismo pudo observarse en el conteo de proteínas. Uno de los fitoestrógenos del conteo y que mayor interés genera es el NDGA que se presentó en mayor cantidad utilizando el solvente metanol, seguido por acetona y etanol; en cuanto al agua como solvente se obtuvo en cantidades muy bajas. Los autores explican que los fitoestrógenos se presentan en poca cantidad en extractos acuosos debido a su baja solubilidad en agua.

De los primeros trabajos con pruebas de extractos de *L. tridentata* para la inhibición de *F. oxysporum* se encuentra el de Fernández *et al.* (1979), en el cual se utilizaron extractos de cloroformo y etanol; estos controlaron el crecimiento en un 76% con extracto etanol y 93% con extracto clorofórmico (Lira-Saldívar, 2003). Peñuelas-Rubio *et al.* (2017) evaluaron la capacidad antifúngica de extractos de *L. tridentata* tanto *in vitro* como *in vivo*; con los disolventes etanol, metanol, diclorometano y agua; esto se llevó a cabo en plantas de jitomate en condiciones bajo invernadero y al mismo tiempo *in vitro* sobre medio de cultivo PDA para

la inhibición de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Los extractos fueron obtenidos por sistema Soxhlet y evaporación rotatoria. La prueba *in vitro* se realizó por la técnica medio envenenado y realizaron medidas diarias del diámetro de crecimiento micelial. Para el ensayo *in vivo*, prepararon una solución inoculante en la cual se sumergieron por 30 minutos las raíces de plántulas de jitomate, previamente heridas con bisturí en raíces secundarias, se pasaron a maceta, una vez aquí se les aplicó cada 7 días los extractos obtenidos con ayuda de un adherente agrícola, se hicieron mediciones de clorofila, altura y número de hojas, con esto se calculó el índice de severidad con la fórmula de Townsend y Heuberguer (1943); obtuvieron resultados donde las plántulas tratadas con los extractos de *L. tridentata* presentaron menor severidad comparada al testigo. En general, observaron que los extractos con mayor porcentaje de inhibición y desarrollo vegetativo fueron los obtenidos con diclorometano y metanol. Con esto se tiene una apertura hacia los efectos de extractos de la gobernadora sobre material vegetal y de los diferentes solventes para la extracción de los mismos.

Gámez *et al.* (2007) plantean una investigación en la cual utilizan extractos acuosos de diferentes plantas, entre ellas *L. tridentata*, para conocer su efecto en la germinación de los siguientes cultivos de importancia económica: sandía, melón, calabaza y tomate de cáscara; el objetivo de este trabajo fue conocer los efectos de extractos vegetales en la emergencia de la plántula. Los resultados demuestran que con extractos de la gobernadora, se obtiene una disminución de germinación para melón y sandía, comparado al control que sólo se le agregó agua destilada; para calabaza el porcentaje de germinación es similar al control, mientras que para tomate de cáscara hay un aumento, teniendo hasta un 80% de germinación con la adición de extracto de gobernadora y un 56.6% de germinación para el control.

Estos trabajos dan lugar a ampliar las investigaciones sobre los efectos de extractos de la gobernadora utilizados *in vitro* para la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos y en material vegetal ya que, como se puede observar, el uso de los diferentes solventes para la extracción de los componentes de la resina de *L. tridentata*, dan cierto grado de efectividad para la inhibición en el crecimiento *in vitro* de agentes fitopatógenos, dejando en primer lugar extractos obtenidos con metanol, etanol y cloroformo, pero para las extracciones con agua la inhibición es baja o similar al control. Además de esto, en algunas de las pruebas llevadas

sobre material vegetal se contempló que los extractos de *L. tridentata* no afectan al desarrollo de este o se ve beneficiado, en el caso de semillas, no se conoce el efecto de extractos de gobernadora obtenidos con diferentes solventes como etanol para pruebas de germinación, lo cuál se aborda en este ensayo, además de una prueba de inhibición con la técnica de medio envenenado y una prueba donde, se realizó la inoculación de un hongo sobre semilla para demostrar si existe inhibición del agente fitopatógeno cuando está presente en la semilla. En este trabajo se obtuvieron extractos acuosos, por la técnica de infusión y extractos etanólicos por maceración en frío, se evaluó su efecto en el crecimiento de *F. oxysporum* en condiciones *in vitro* y su efecto en la germinación de semillas jitomate para obtener una visión más amplia de su potencial.

3. HIPÓTESIS

Los extractos de *Larrea tridentata* tienen actividad antifúngica *in vitro* contra *Fusarium oxysporum*, pero inhiben la germinación de semillas de *Solanum lycopersicum* en condiciones *in vitro*.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Evaluar los efectos antifúngicos de extractos etanólicos y acuosos de *Larrea tridentata* contra *Fusarium oxysporum*, así como en la germinación de semillas de *Solanum lycopersicum*.

4.2. Específicos

- 4.2.1. Determinar el potencial antifúngico de los extractos etanólico y acuoso de *L. tridentata* para el control de *F. oxysporum* sobre medio de cultivo PDA.
- 4.2.2. Establecer los porcentajes de germinación de las semillas de *Solanum lycopersicum* para los extractos acuoso y etanólicos y así examinar si existen diferencias significativas con el control.
- 4.2.3. Observar los efectos de los extractos etanólico y acuoso en la inhibición de *F. oxysporum* inoculado en semillas de *S. lycopersicum*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material vegetal

La planta de *L. tridentata* se consiguió en el mercado “General Mariano Escobedo” ubicado en Santiago de Querétaro, Querétaro, la cual ya viene seca y empaquetada en bolsa de celofán, se seleccionaron solo las hojas eliminando las ramas, para así realizar el molido de solo hojas para los extractos.

Las semillas utilizadas se obtuvieron de frutos de jitomate *S. lycopersicum* var. *aquila* proporcionados por la Unidad Viverística y Hortofrutícola Amazcala (UVHA), de la Universidad Autónoma de Querétaro campus Amazcala. Se extrajeron las semillas para ser lavadas y quitar la mayor parte de mucílago posible; se dejaron secar sobre papel absorbente durante 10 días, después se les aplicó por aspersión cloro comercial diluido en agua (50 ml/L); esto se dejó secar por otros 10 días, para almacenarlas en un lugar oscuro y seco, hasta su posterior uso.

5.2. Obtención del hongo fitopatógeno

El hongo *Fusarium oxysporum* con el que se trabajó fue obtenido en el laboratorio de Sanidad Vegetal de la Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencia Naturales, Campus Juriquilla. El hongo se identificó mediante claves taxonómicas (Figura 6) y Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR); para lo cual se realizó aislamiento de ADN por el método fenol-cloroformo congelando micelio con nitrógeno líquido, se pulverizó en mortero con pistilo, se agregó solución de urea y se dejó reposar por 30 minutos, después paso por la centrifugadora y en un tubo se aplicó la solución de extracción de fenol-cloroformo-álcool isoamílico, posteriormente se centrifugó, se le agregó isopropanol y se agitó hasta obtener una pastilla de ácidos nucleicos, ésta se lavó con etanol frío al 70%, se secó y se almacenó. A otra muestra, para obtener ADN genómico a gran escala, se dio tratamiento con buffer de extracción, después se le aplicó una solución de fenol-cloroformo, se incubó, pasó por centrifugadora y se recuperó el sobrenadante para formar una pastilla de ácidos nucleicos la cual se trató con RNAsa y se almacenó. Éstas muestras se procesaron por electroforesis y se determinó la concentración de ácidos nucleicos en nanodrop; las muestras de ADN se diluyeron y utilizaron reacciones de PCR, siguiendo indicaciones del proveedor Thermo

Scientific® con cebadores ITS1. La técnica de electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio y las ampliaciones se purificaron por kit QIAquick (QIAGEN); se procedió con la secuenciación de las reacciones de PCR en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad. Las secuencias obtenidas se exportaron a formato Fasta; éstas se compararon y alinearon con referencias de diferentes especies de *Fusarium* obtenida de GenBank; fueron procesadas con los softwares RaxML y PAUP, los árboles generados se analizaron con el software Dendroscope 3.5.9.

5.3. Preparación de extractos

Los extractos etanólicos se obtuvieron por maceración en frío. Las hojas ya secas se molieron manualmente utilizando mortero y pistilo de porcelana dejando partículas de aproximadamente 0.5 milímetro, esto se colocó en un frasco color ámbar y se le agregó el solvente en una proporción 1: 3 (hoja: solvente). Se agitó de forma manual durante unos minutos para asegurar que las hojas molidas de *L. tridentata* entraran en contacto con el etanol. Se manejaron tres tiempos de maceración: 3, 5 y 10 días; los frascos se colocaron en un ambiente oscuro y no se movieron hasta que transcurrieron los días establecidos. Pasado el tiempo, el extracto se filtró hacia otro frasco color ámbar, con papel Whatman® #1 y embudo, para eliminar todo el material molido. Ya filtrado, se buscó eliminar el etanol, dejando el frasco abierto a temperatura ambiente durante 20 días hasta que se obtuvo una pasta espesa que fue llevada a refrigeración hasta su uso.

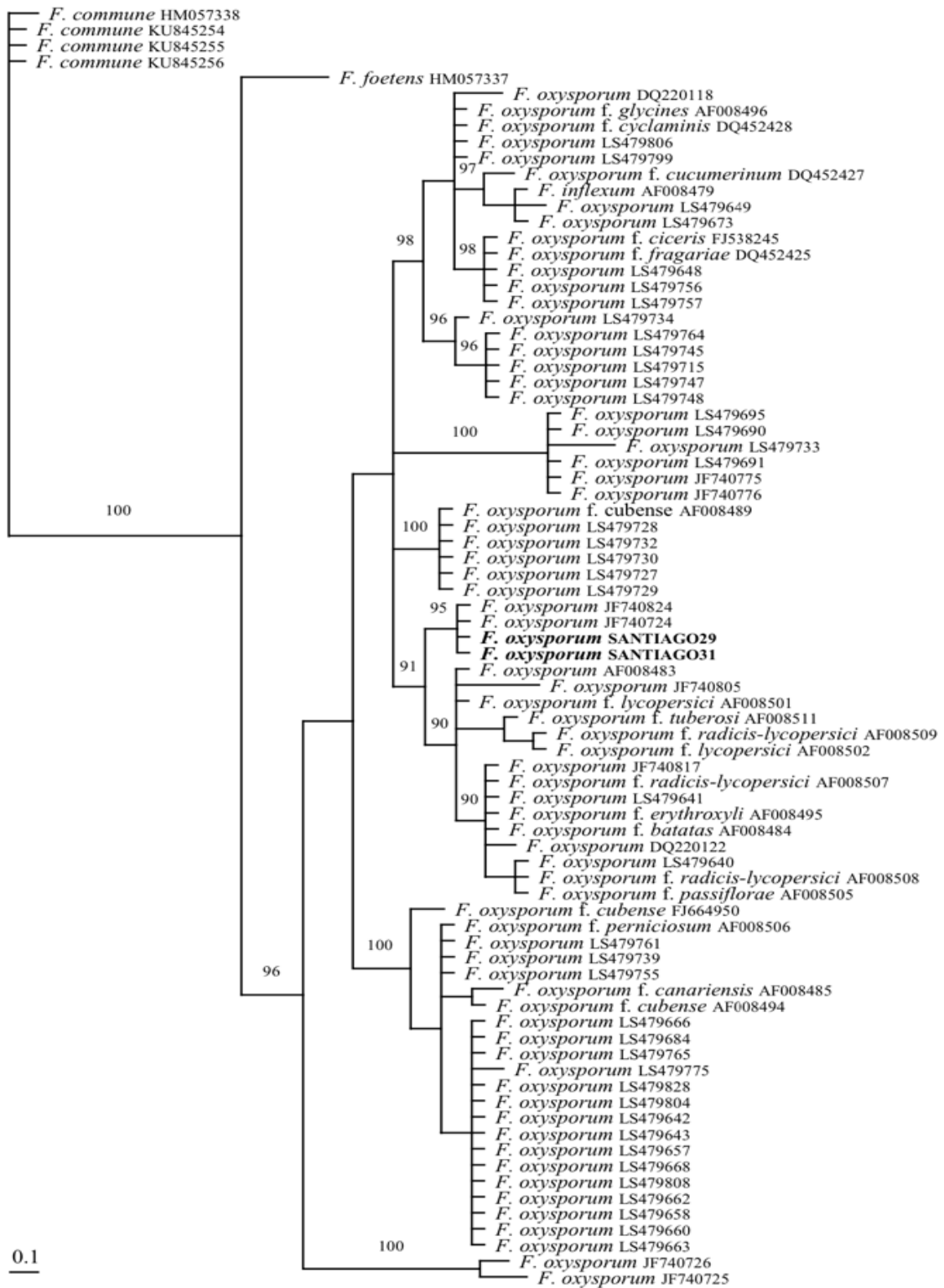
Los extractos acuosos, por otro lado, se realizaron con la técnica de infusión, donde según la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos consiste en verter agua hirviendo sobre la droga vegetal, dejándolo de 5 a 15 minutos y tapándolo bien para evitar cualquier pérdida. Se realizaron 3 concentraciones para la infusión: 50 g/L, 100 g/L y 200 g/L; se utilizó agua destilada, la cual se hirvió en plancha térmica. En un vaso de precipitado se colocaron las hojas de *L. tridentata* molida, para después hacer el vaciado del agua hirviendo, se tapó con papel aluminio y se dejó reposar durante 20 minutos, con lo cual se pretendió una extracción más completa de los componentes de la gobernadora. Transcurrido este período, se filtró con papel Whatman® #1 y embudo para eliminar las hojas molidas, estos extractos se utilizaron inmediatamente.

5.4. Pruebas *in vitro* en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA)

Las pruebas para demostrar la eficiencia de inhibición de los extractos de *L. tridentata* obtenidos sobre *F. oxysporum* fueron en medio de cultivo PDA con la técnica de medio envenenado, que se basa en agregar los extractos obtenidos en el medio de cultivo antes de que solidifique.

Una vez que se hidrató y mezcló el medio de cultivo en agua destilada, éste se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos y se dejó enfriar de 15 a 20 minutos dentro de la misma; después se procedió a mezclar los extractos con el PDA y se vació a las cajas de Petri. Una vez que solidificó, se realizó la siembra del hongo el cual se obtuvo por crecimiento *in vitro*.

Se utilizaron diferentes concentraciones para las pruebas de medio envenenado, para los extractos de etanol: 500 mg, 1000 mg y 2000 mg por litro de PDA (Moreno-Limón, 2011), es decir, para cada uno de los tiempos de maceración (3, 5 y 10 días), se manejaron 3 concentraciones, obteniendo en total 9 tratamientos, con 12 repeticiones cada uno. De igual manera para los extractos acuosos, se utilizaron tres concentraciones, 5 ml, 10 ml y 20 ml por litro de PDA para cada una de las variables de las infusiones (50 g/L, 100 g/L y 200 g/L), con esto, también se obtienen 9 tratamientos diferentes con 12 repeticiones cada uno. También se trabajó con un tratamiento control donde no se adicionó ningún extracto y que funcionó como referencia. Al momento de ser utilizados los extractos acuosos, se pasaron por un filtro millipore 0.22 µm, con jeringa estéril para disminuir la presencia de microorganismos que pudieran contaminar el experimento. Los extractos etanólicos se diluyeron en 1 ml de acetona para obtener una consistencia líquida y una mejor manipulación. Después de ocho días transcurridos de la siembra de *F. oxysporum* sobre los medios de cultivo con extractos de *L. tridentata*, se midió el crecimiento del hongo, tomando dos medidas cruzadas del diámetro; de esta manera se conoce la inhibición de los tratamientos sobre el hongo fitopatógeno y se seleccionó los que demostraron mayor eficiencia.



Clado 3 (Maryani et al. 2019)

Figura 6. Dendrograma obtenido de la secuenciación de los resultados de PCR del hongo fitopatógeno, *Fusarium oxysporum*.

5.5. Prueba *in vitro* sobre semillas

Una vez seleccionados los tratamientos que mostraron mejores resultados de inhibición del hongo *F. oxysporum* sobre PDA y con diferencias significativas, se llevaron a pruebas sobre semillas, con esto se observó los efectos de los extractos de *L. tridentata* sobre la emergencia de la plántula y si existe inhibición en el crecimiento de un hongo fitopatógeno inoculado sobre semillas.

Se realizaron un total de ocho tratamientos: un control positivo dónde solo se agregó agua corriente estéril, lo cual ayudó a conocer el porcentaje de germinación; un control negativo con solo el patógeno, con esto se observó los efectos que tiene el patógeno sobre la germinación de semillas de *S. lycopersicum*; tres tratamientos donde se adicionaron a las semillas los diferentes extractos seleccionados en la prueba de inhibición y aquí apreciar si existe efecto de alelopatía por parte de los extractos de *L. tridentata*. Por último, tres tratamientos donde las semillas se inocularon con el hongo fitopatógeno y se les adicionó los extractos de gobernadora seleccionados, de tal forma que se simuló una prueba similar a lo que se observa en campo y sobre la función que se espera que cumpla el extracto de la gobernadora; se llevaron a cabo 10 repeticiones de cada tratamiento, con 10 semillas en cada caja de Petri y así tener una visión más amplia de los posibles resultados. Las cajas de Petri fueron selladas con Parafilm® y se colocaron en cámara bioclimática modelo CBRF-20 para su germinación, a una temperatura de 25° C y una humedad relativa entre 40-45%. Se trabajaron con un algodón estéril en la base de la caja y se le agregó agua corriente estéril para humedecerlo, para después colocar las semillas.

Las semillas tratadas con los extractos de *L. tridentata* seleccionados, fueron sumergidas en el extracto hasta notar que estaban totalmente cubiertas, después se colocaron sobre el algodón húmedo en la caja de Petri. En los tratamientos de semillas con inoculación del hongo y adición de extractos de la gobernadora, las semillas primero se sumergieron en el extracto y después se colocaron 20 µl de solución inoculante, para esto primero se realizó un conteo de conidios, con ayuda de cámara de Neubauer 0,100 mm, a cada semilla se le colocaron 20 µl de solución inoculante, con esto se estima que se aplicaron 103,250 conidios por semilla.

5.6. Análisis estadístico

Se obtuvo el porcentaje de inhibición de *F. oxysporum* sobre el medio envenenado; para esto, las medidas obtenidas del diámetro de crecimiento se promediaron y se les restó el tamaño de siembra para tener el crecimiento absoluto del hongo. Después se calculó el porcentaje de inhibición mediante las siguientes fórmulas (Moreno-Limón, 2011):

$$P_c = \frac{D}{D_c} \times 100$$

$$P_i = 100 - P_c$$

Donde:

P_c: Porcentaje de crecimiento

D: Diámetro de crecimiento sobre medio envenenado

D_c: Diámetro de crecimiento del control

P_i: Porcentaje de inhibición

Al obtener los resultados en inhibición de los diferentes tratamientos, se realizó una prueba ANOVA y con ello una prueba de Tukey, de esta manera, identificar si existe alguna diferencia significativa entre los tratamientos. También se efectuaron pruebas de Dunette, para comparar con el tratamiento control y realizar un análisis más amplio. Otro análisis que se realizó en la prueba de inhibición sobre PDA fue la Tasa Relativa de Crecimiento (TRC) que consiste en comparar los promedios de crecimiento con el crecimiento del tratamiento control, para este análisis también se utilizaron los promedios de diámetro, tomados a los ocho días después de la siembra, de esta manera se conoce cuanto creció el patógeno sobre sí mismo. En los ensayos sobre semillas los resultados se manejaron en porcentaje de germinación, considerando como germinada aquella semilla donde se apreciaron ambos cotiledones desarrollados, se realizaron estas observaciones a los ocho días después de la siembra, se obtuvo el promedio de los porcentajes de germinación de los diferentes tratamientos para efectuar las pruebas de Tukey y Dunnett.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Determinación del efecto inhibitorio de los extractos etanólicos de *L. tridentata* sobre *F. oxysporum*.

En las pruebas realizadas con extractos etanólicos de gobernadora, se obtuvo un promedio general del $95.79\% \pm 0.67$ de inhibición; los tratamientos con una concentración de 2000 mg/L de PDA obtuvieron los mejores resultados sin importar los días de maceración, con un promedio de 99.19%; los tratamientos con 1000 mg/L de PDA con 3 y 5 días de maceración se observan dentro del mismo grupo que los tratamientos de 2000 mg/L de PDA, según la prueba de Tukey, pero el tratamiento con 10 días de maceración lo encontramos en un porcentaje de inhibición más bajo agrupado con los tratamientos de 500 mg/L de PDA, dentro de estos últimos tenemos el tratamiento con el porcentaje más bajo de inhibición, con 10 días de maceración, obteniendo un 86.65%. En cuanto a la TRC observamos que todos los tratamientos fueron significativamente diferentes respecto al control; esto indica que estos extractos ofrecen una alta inhibición de crecimiento del hongo. El tratamiento con TRC más alta fue de 10 días de maceración y 500 mg/L de PDA, lo que significa que este tratamiento fue donde más crecimiento hubo sobre si mismo; la TRC más baja fue de 5 días de maceración con 2000 mg/L de PDA que indica un menor crecimiento de hongo, esto coincide con los resultados de porcentaje de inhibición (Tabla 1).

En la Figura 7 observamos los promedios de inhibición de *F. oxysporum* sobre medio de cultivo, para cada tratamiento; cinco de estos tratamientos se mantienen cerca del 100% de inhibición, destacando los de concentración 2000 ml/L de PDA y dos de concentración 1000 ml/L. Los tratamientos de concentración 500 ml/L con 3 y 5 días de maceración se posicionan cerca del 95%, mientras que el tratamiento de 10 días de maceración está por de bajo del 90%. En el gráfico para la TRC (Figura 8), que como se explicó antes, se refiere al número de veces que el hongo creció sobre sí mismo, observamos que los tratamientos de extracción con etanol se mantienen entre 0 y 3, con lo que se interpreta que estos extractos permiten un crecimiento casi nulo; para confirmar esta idea, el control, representado por un 0, se mantiene cerca de 15 con lo que se puede apreciar más claro que la inhibición en el crecimiento de *F. oxysporum* con estos extractos. En general, el promedio de TRC para tratamientos etanólicos

fue de 0.773, mientras que para el control fue 14.833, con lo que se puede observar la diferencia en el crecimiento que extractos etanólicos ofrecen.

Tabla 1. Porcentaje de inhibición y tasa relativa de crecimiento (TRC) con el desglose de las abreviaciones para cada tratamiento en extractos etanólicos.

Abreviación	Tratamiento	% inhibición	TRC
3-500	3 días maceración – 500 mg/litro de PDA	93.755 b	1.050 cd
3-1000	3 días maceración – 1000 mg/litro de PDA	98.440 a	0.250 de
3-2000	3 días maceración – 2000 mg/litro de PDA	98.909 a	0.236 de
5-500	5 días maceración – 500 mg/litro de PDA	93.913 b	0.938 cd
5-1000	5 días maceración – 1000 mg/litro de PDA	98.594 a	0.317 de
5-2000	5 días maceración – 2000 mg/litro de PDA	99.688 a	0.064 e
10-500	10 días maceración – 500 mg/litro de PDA	86.645 c	2.512 b
10-1000	10 días maceración – 1000 mg/litro de PDA	93.207 b	1.380 c
10-2000	10 días maceración – 2000 mg/litro de PDA	98.986 a	0.210 de
	CONTROL	0.0	14.833 a

También se pueden apreciar unas representaciones de la inhibición de *F. oxysporum* sobre el medio envenenado con extractos etanólicos. De forma visual se observa el comportamiento del hongo y crecimiento de micelio en los diferentes tratamientos (Figuras 9, 10 y 11), manteniéndose solo en el centro donde se realizó la siembra del mismo para los tratamientos con una concentración de 2000 mg/L, comenzando a verse un poco de crecimiento en el tratamiento de 3 y 10 días de maceración con concentración 100 mg/L y aún más para los tratamientos con la menor concentración, 500 mg/L de PDA.

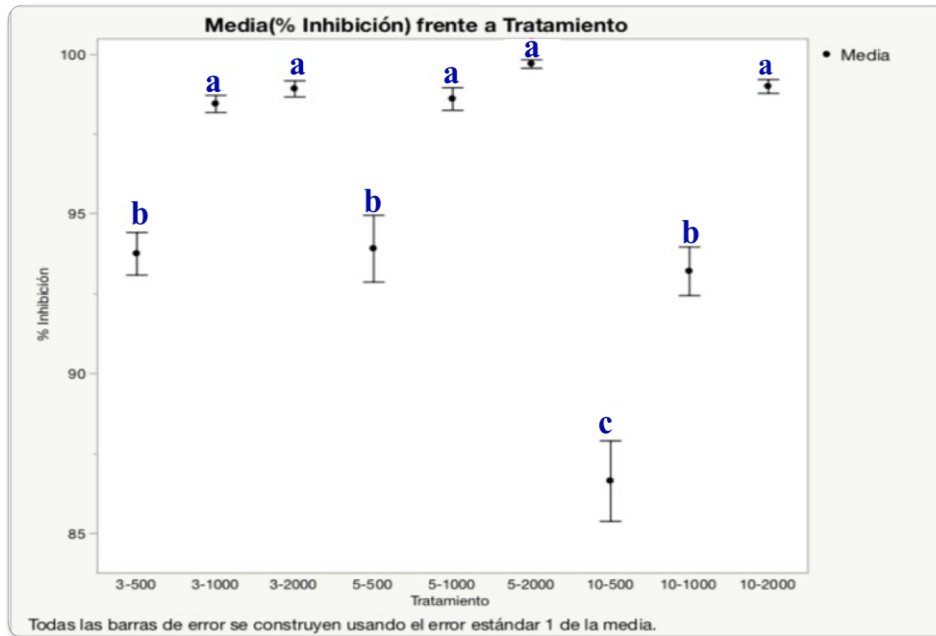


Figura 7. Resultados del porcentaje de inhibición en extractos etanólicos. Utilizando la media de los tratamientos y agregando error estándar. *Las letras indican los tratamientos significativamente diferentes de acuerdo con la prueba post-hoc de Tukey.

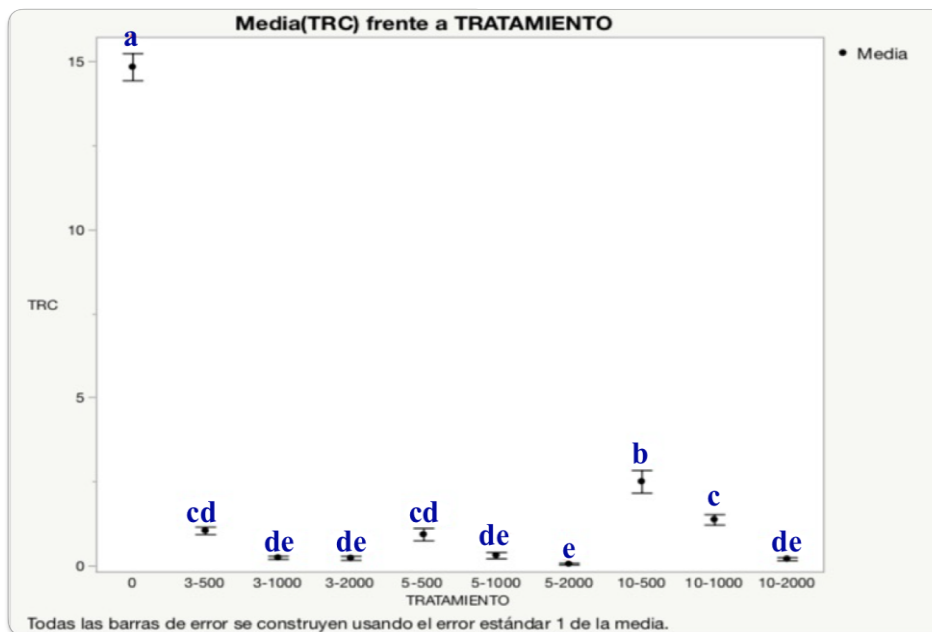


Figura 8. Resultados de la Tasa Relativa de Crecimiento en extractos etanólicos. Utilizando la media de los tratamientos y agregando error estándar. *Las letras indican los tratamientos significativamente diferentes de acuerdo con la prueba post-hoc de Tukey.

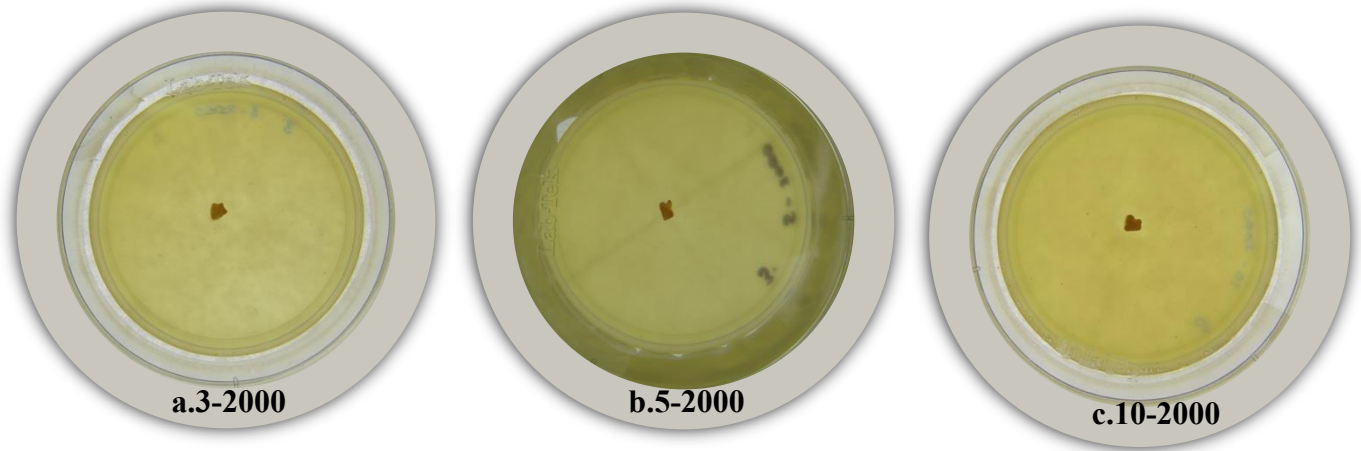


Figura 9. Efecto de inhibición de extractos etanólicos en el crecimiento de *F. oxysporum* con la técnica de medio envenenado; tratamientos con 2000 mg/L de PDA. a.3 días de maceración. b.5 días de maceración. c.10 días de maceración.

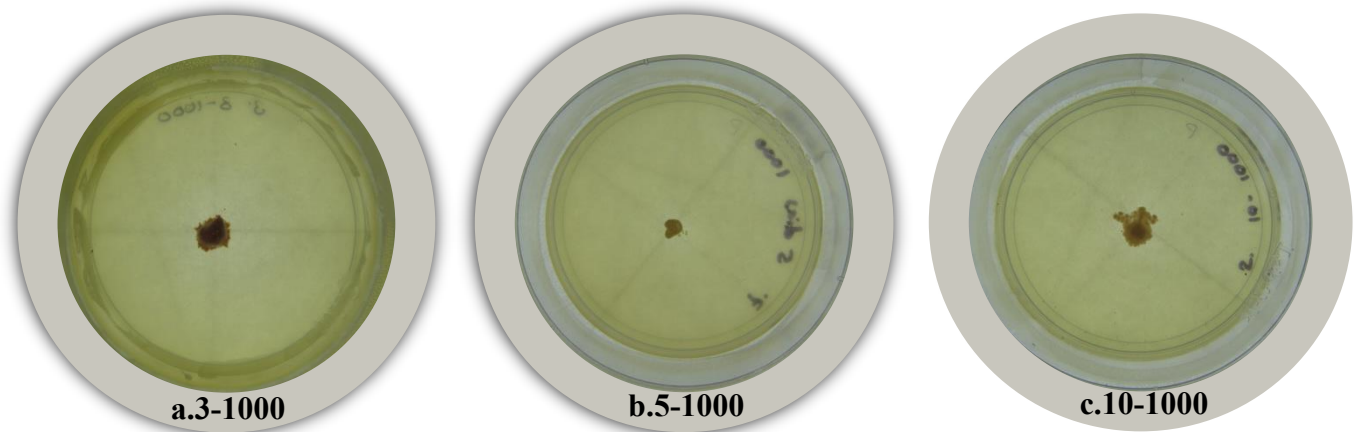


Figura 10. Efecto de inhibición de extractos etanólicos en el crecimiento de *F. oxysporum* con la técnica de medio envenenado; tratamientos con 1000 mg/L de PDA. a.3 días de maceración. b.5 días de maceración. c.10 días de maceración.

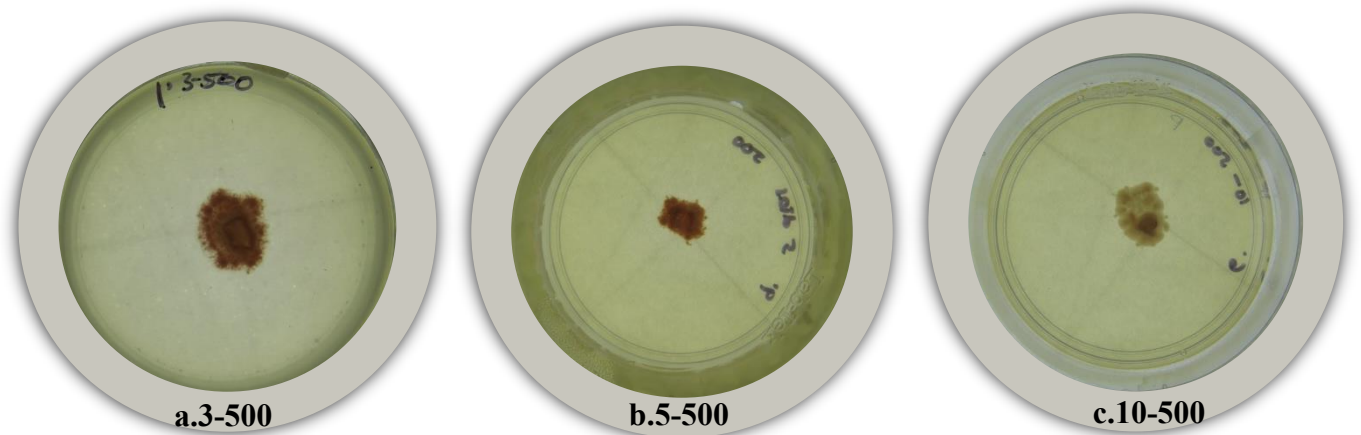


Figura 11. Efecto de inhibición de extractos etanólicos, en el crecimiento de *F. oxysporum* con la técnica de medio envenenado; tratamientos con 500 mg/L de PDA. a.3 días de maceración. b.5 días de maceración. c.10 días de maceración.

6.2. Determinación del efecto inhibitorio de los extractos acuosos de *L. tridentata* sobre *F. oxysporum*.

Para los tratamientos acuosos se obtuvieron inhibiciones más bajas, con un promedio de $4.72\% \pm 0.44$, donde tratamientos de 50 g/L para la infusión obtuvieron números negativos, esto quiere decir que hubo un mayor crecimiento que en el mismo control que no recibió ningún extracto de la gobernadora. Para las infusiones con 100 g/L la inhibición se mantiene cerca del 0%, a excepción del tratamiento con 20 ml/L de PDA el cual se mantuvo cerca del 12%; por último, los tratamientos de 200 g/L para la infusión, no hay diferencia con otros tratamientos a excepción del tratamiento con 20 ml/L PDA el cual es significativamente diferentes a los demás con un 29.42% de inhibición. El TRC correspondiente a cada tratamiento con una prueba de Tukey muestra resultados cercanos al control o por encima del control respecto al crecimiento, con un promedio de 14.17, mientras que el control tiene un 14.83; el tratamiento que se mantiene más bajo es el de 200-20 con un TRC de 9.69 (Tabla 2). Los extractos acuosos se mantienen cerca del 0% sin importar la concentración de infusión o al vaciado en PDA (Figura 12), al igual que en TRC, los tratamientos están relacionados con el control, a diferencia del tratamiento 200-20, que coincide con los resultados de porcentaje de inhibición (Figura 13).

Se puede concluir que los extractos acuosos no son una fuente eficaz para la inhibición de *F. oxysporum* con la técnica utilizada en este trabajo, de manera más específica los extractos acuosos se mantienen dentro de un mismo nivel, en este rango tenemos inhibiciones hasta por debajo de cero. En las Figuras 14, 15 y 16 se puede apreciar un ejemplo de los diferentes tratamientos con extractos acuosos, y de forma visual, su crecimiento sobre el medio envenenado; comenzando con los tratamientos de 20 ml/L de PDA, la concentración de infusión, 200 mg/L se muestra con la mayor inhibición, comparado con todos los demás tratamientos, después tratamientos con 10 ml/L de PDA donde solo la concentración de infusión más alta muestra menor crecimiento comparado a los demás y terminando con tratamientos de 5 ml/L de PDA en los diferentes concentraciones para la infusión, en los cuales el desarrollo del micelio es más notorio. Con esto se aprecia la diferencia de inhibición entre los diferentes tratamientos y visualmente hay mayor crecimiento del micelio comparado a los tratamientos con extractos etanólicos.

Tabla 2. Porcentaje de inhibición y tasa relativa de crecimiento (TRC) con el desglose de las abreviaciones para cada tratamiento en extractos acuosos.

Abreviación	Tratamiento	% inhibición	TRC
50-5	50 g/L infusión – 5 ml/L de PDA	-0.161 c	15.342 abc
50-10	50 g/L infusión – 10 ml/L de PDA	-0.552 c	16.394 ab
50-20	50 g/L infusión – 20 ml/L de PDA	-0.782 c	16.926 a
100-5	100 g/L infusión – 5 ml/L de PDA	0.464 c	13.797 c
100-10	100 g/L infusión – 10 ml/L de PDA	0.464 c	13.929 c
100-20	100 g/L infusión – 20 ml/L de PDA	12.327 b	14.558 bc
200-5	200 g/L infusión – 5 ml/L de PDA	0.855 c	13.062 c
200-10	200 g/L infusión – 10 ml/L de PDA	0.467 c	13.853 c
200-20	200 g/L infusión – 20 ml/L de PDA	29.429 a	9.691 d
	CONTROL	0.0	14.833 abc

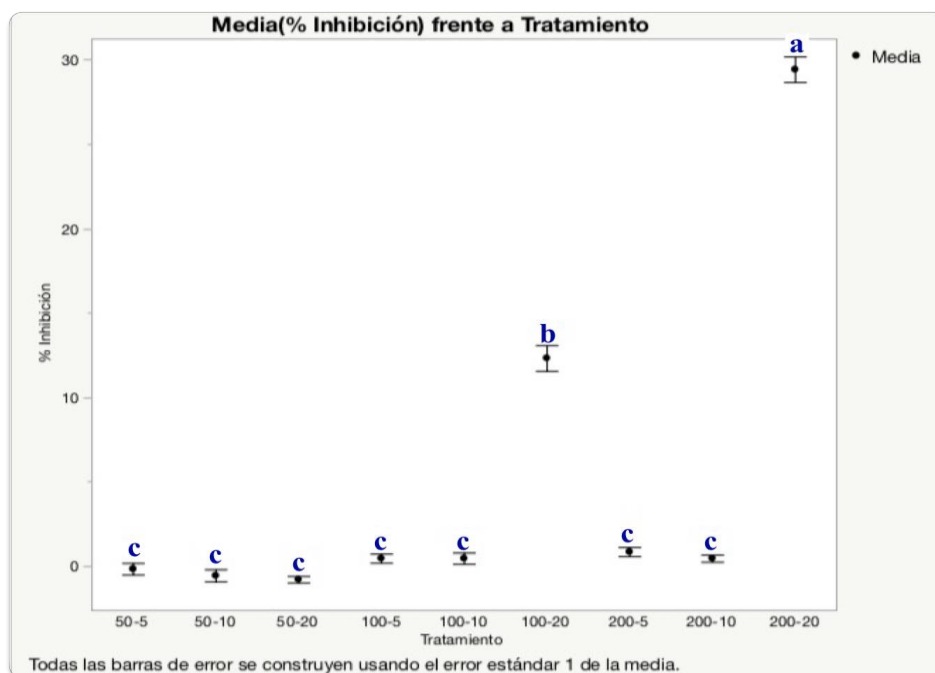


Figura 12. Resultados del porcentaje de inhibición en extractos acuosos. Utilizando la media de los tratamientos y agregando error estándar. *Las letras indican los tratamientos significativamente diferentes de acuerdo con la prueba post-hoc de Tukey.

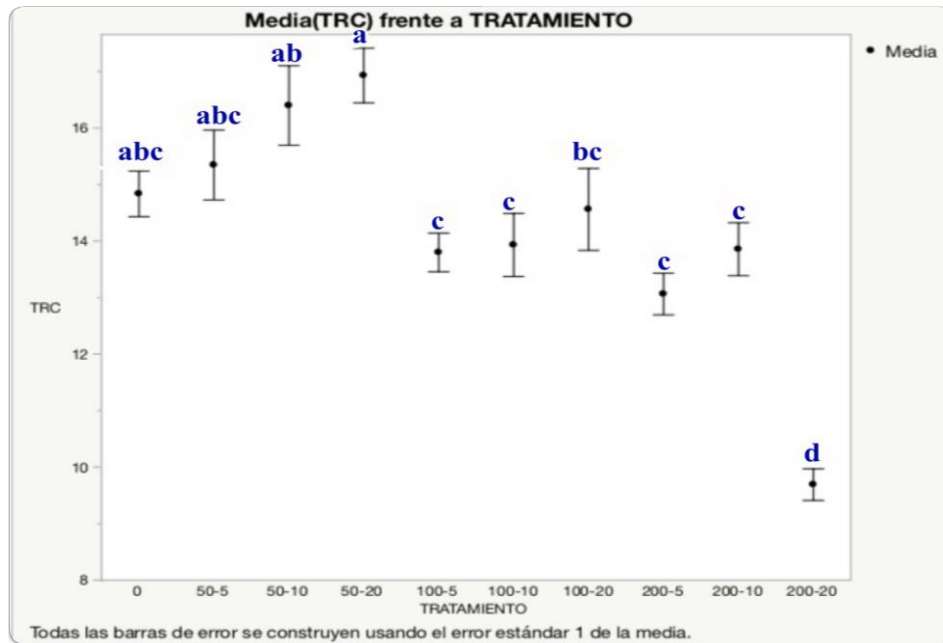


Figura 13. Resultados de la Tasa Relativa de Crecimiento en extractos acuosos. Utilizando la media de los tratamientos y agregando error estándar. *Las letras indican los tratamientos significativamente diferentes de acuerdo con la prueba post-hoc de Tukey.

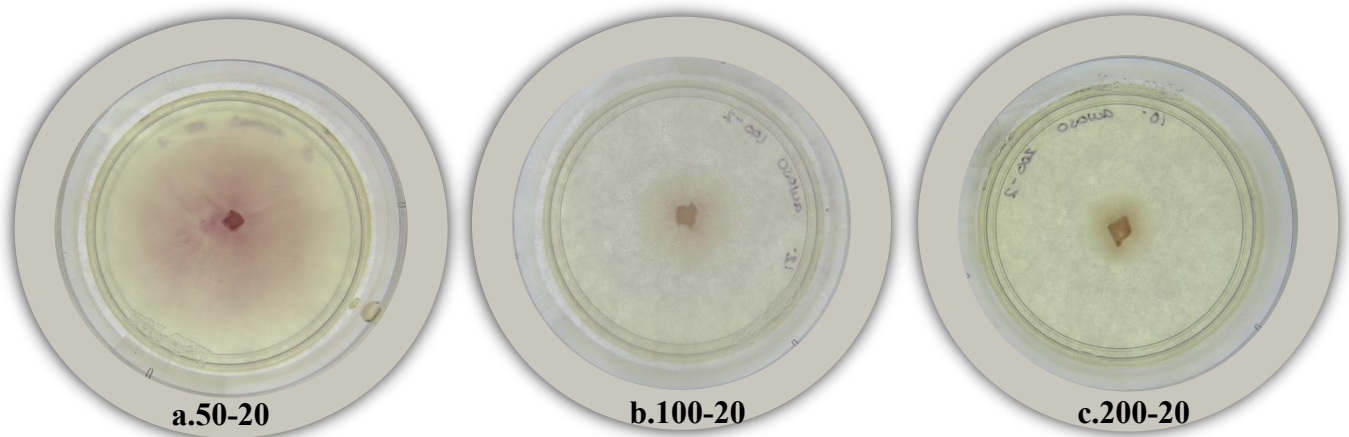


Figura 14. Efecto de inhibición, extractos acuosos, en el crecimiento de *F. oxysporum* con la técnica de medio envenenado; tratamientos con 20 ml/L de PDA: a. infusión 50 g/L. b. infusión 100 g/L. c. infusión 200 g/L.

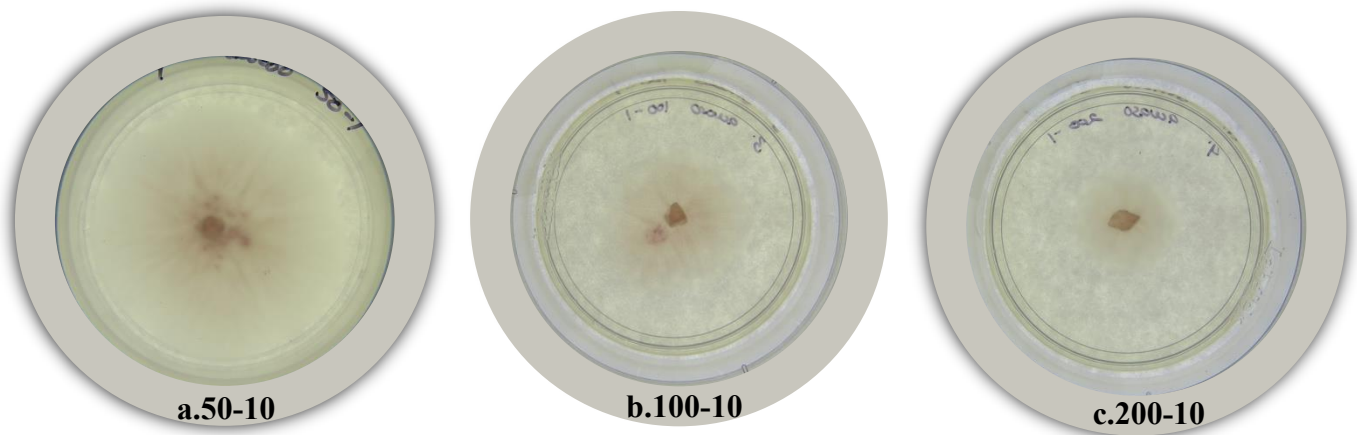


Figura 15. Efecto de inhibición, extractos acuosos, en el crecimiento de *F. oxysporum* con la técnica de medio envenenado; tratamientos con 10 ml/L de PDA: **a.** infusión 50 g/L. **b.** infusión 100 g/L. **c.** infusión 200 g/L.

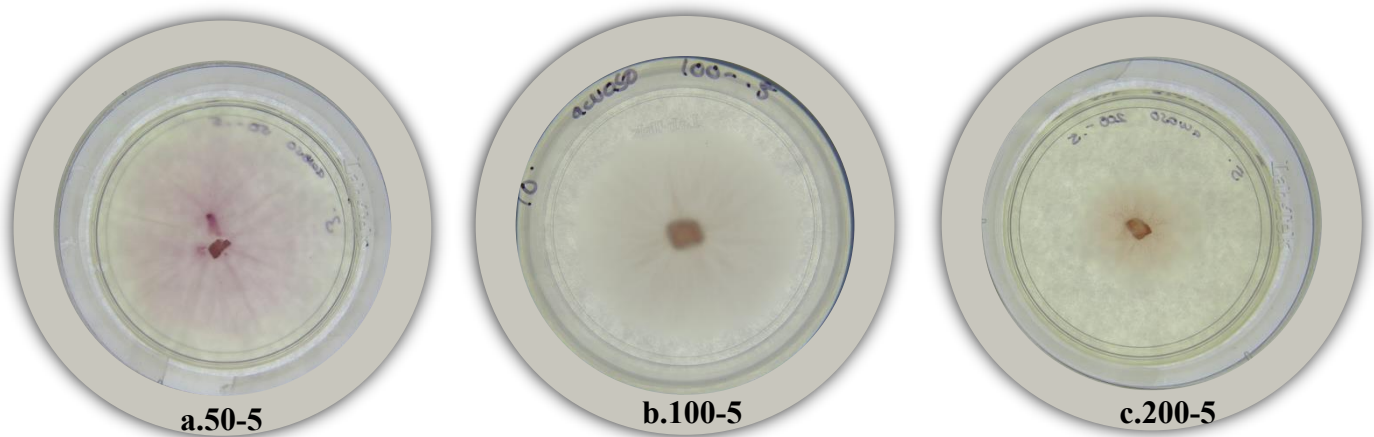


Figura 16. Efecto de inhibición, extractos acuosos, en el crecimiento de *F. oxysporum* con la técnica de medio envenenado; tratamientos con 5 ml/L de PDA: **a.** infusión 50 g/L. **b.** infusión 100 g/L. **c.** infusión 200 g/L.

Con estos resultados podemos examinar las diferencias que existen entre los extractos etanólicos y acuosos (Tabla 3) al momento de hacer pruebas de inhibición de crecimiento de un hongo fitopatógeno sobre medio de cultivo, también se observa como los resultados en porcentaje de inhibición y TRC coinciden y confirmar los resultados obtenidos entre ellos.

Apoyándonos en las Tablas 1 y 2, donde se precian los resultados para cada tratamiento de extractos etanólicos y acuosos se seleccionaron los tratamientos para la prueba en semillas; de esta manera, para extractos etanólicos se eligieron dos tratamientos que demuestren una diferencia en la prueba Tukey y tengan 3 y 5 días de maceración, esto debido a que son los

mejores resultados presentados; se tomaron los tratamientos 3-1000 y 5-2000 con la intención de que al tener diferentes concentraciones, se pueda observar su influencia en la prueba de germinación. En el caso de extractos acuosos, debido a los resultados que se presentan, solo se eligió el tratamiento 200-20 ya que es el único que presenta una diferencia significativa tanto en porcentaje de inhibición como en TRC, es claro que no se aprecia una inhibición como con los extractos etanólicos pero, ya que se va a llevar a prueba de germinación, es importante conocer su efecto en este escenario. Gámez *et al.*, (2007) toman solo extractos acuosos para prueba de germinación y presentan porcentajes cercanos al control en germinación.

En forma general los resultados de extractos acuosos y etanólicos muestran una amplia diferencia entre sí, con esto se puede observar lo mencionado por Martins *et al.* (2012), donde explica que los fitoestrógenos como el NDGA, tienen baja solubilidad en agua y que estos son los que aportan las propiedades biocidas a la gobernadora.

Tabla 3. Concentrado del promedio de las diferentes pruebas para los extractos de etanol y agua.

	Extractos etanólicos	Extractos acuosos
% inhibición	95.79	4.72
TRC	0.773	14.172

6.3. Determinación del efecto en la germinación de semillas con los extractos de *L. tridentata*.

Las pruebas del efecto de extractos de gobernadora sobre la germinación se llevaron sobre semillas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) y se analizó cual es la acción que tiene sobre ellas, ya que, al tener potencial para evitar el crecimiento de otros organismos, se tiene que conocer más de sus efectos y determinar si se puede usar sobre material vegetal sin afectar a su crecimiento o en este caso, su germinación. También cumple la función de una prueba más puntual, sobre la inhibición de patógenos que se encuentran sobre plantas o semillas. Es importante llevar a cabo estas pruebas para tomar decisiones sobre el uso de fungicidas de

origen botánico y que sean eficaces en su función, coadyuvando en el mejor manejo de los recursos. Los resultados se manejaron en porcentaje de germinación y se obtuvo el promedio para ejecutar prueba de ANOVA y posteriormente de Tukey y Dunnett.

Tabla 4. Desglose de los tratamientos para la prueba de germinación in vitro.

Tratamiento	Descripción tratamiento	% germinación
0	Semillas control	67 a
1	Semillas + <i>F. oxysporum</i>	7 c
2	Semillas + Extracto etanol 3-1000	31 b
3	Semillas + Extracto etanol 5-2000	19 bc
4	Semillas + Extracto acuoso 200-20	75 a
5	Semillas+ Extracto etanol 3-1000 + <i>F. oxysporum</i>	22 bc
6	Semillas + Extracto etanol 5-2000+ <i>F. oxysporum</i>	6 c
7	Semillas+ Extracto acuoso 200-20 + <i>F. oxysporum</i>	24 bc

Apreciando la Tabla 4, se observa al control (0) con un 67 % de germinación, el cual no muestra diferencia significativa con el tratamiento 4, donde solo se le agregó extracto acuoso, el cual refleja un 75% de germinación, un poco mayor que el control, esto se relaciona con lo reportado en el trabajo de Gamez *et al.* (2007) donde, extractos acuosos de la gobernadora benefician la germinación; en esta misma Tabla se aprecia que el tratamiento 1, al que se inoculó el patógeno y se esperaba afectación en la germinación, no tiene diferencias con los tratamientos donde se trabajo con extractos de *L. tridentata* como tratamiento a la inoculación de *F. oxysporum*, ni al tratamiento 3, donde se trabajó con extracto etanólico a mayor concentración; en este ultimo caso, se pude atribuir a la alelopatía generada por *L. tridentata* a otros organismos, ya que comparada con el control se obtuvo un 58% menos de germinación. Con esto se contempla que la germinación de las semillas se esta viendo afectada tanto por la inoculación del patógeno como por altas concentraciones en extractos etanólicos, a diferencia del extracto acuoso, con el cual se ve beneficiada un 8% más. Este aumentó en la germinación por extractos acuosos puede estar relacionado con lo reportado

por Martins *et al.* (2012) donde los fitoestrógenos de la gobernadora tienen baja solubilidad en agua.

En los tratamientos 5, 6 y 7 se buscó generar un ambiente similar al esperado en campo y que un fungicida de origen botánico diera un tratamiento repelente a patógenos, pero la germinación de la semilla tratada no obtuvo diferencias significativas con el control negativo (Figura 17), donde solo se inoculó el patógeno, pero se observa que en el caso de las semillas tratadas hubo un 17% de aumento en la germinación comparado con este control. En el tratamiento 0, se observó cotiledones desarrollados en la mayoría de las semillas colocadas en las cajas de petri. Para los extractos etanólicos, tratamiento con extracto etanol 3-1000, encontramos semillas geminadas y con los cotiledones desarrollados, pero en menor cantidad que el control, para el tratamiento 3 (extracto etanol 5-2000) el desarrollo de los cotiledones es aun más escaso quedando solo en la emergencia de raíz. En la prueba de semillas inoculadas con el hongo fitopatógeno, se observa que la germinación disminuyó confirmando el 7% de germinación que se obtuvo; para el tratamiento 4 se observa que el agua como solvente no extrae fitoestrógenos que interfieran con el crecimiento de otros organismos, por esto se observa una germinación similar al control (Figura 18)

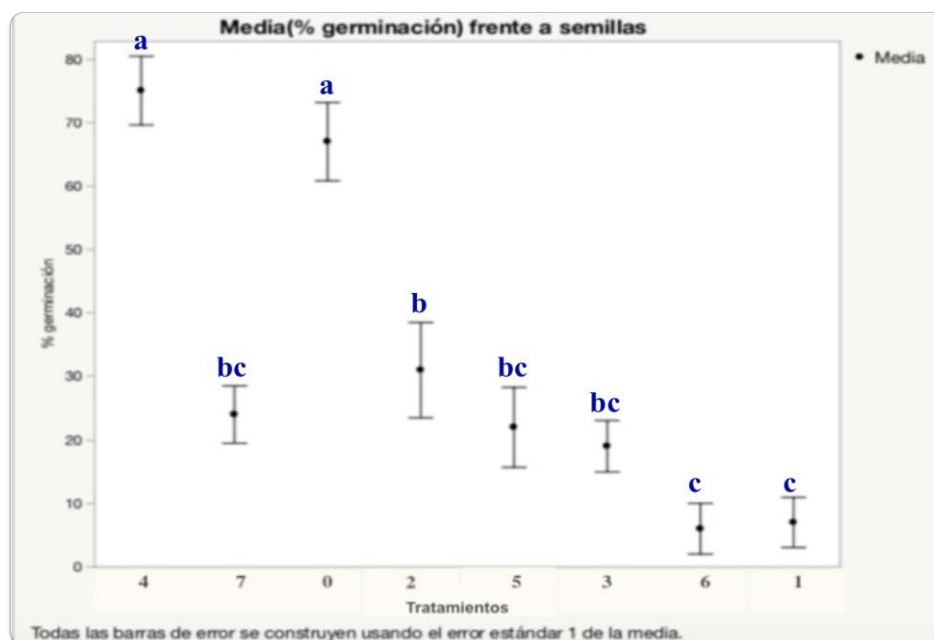


Figura 17. Resultados porcentaje de germinación para los diferentes tratamientos en pruebas con semillas. Se utilizó la media de los tratamientos y se agregó error estándar. *Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

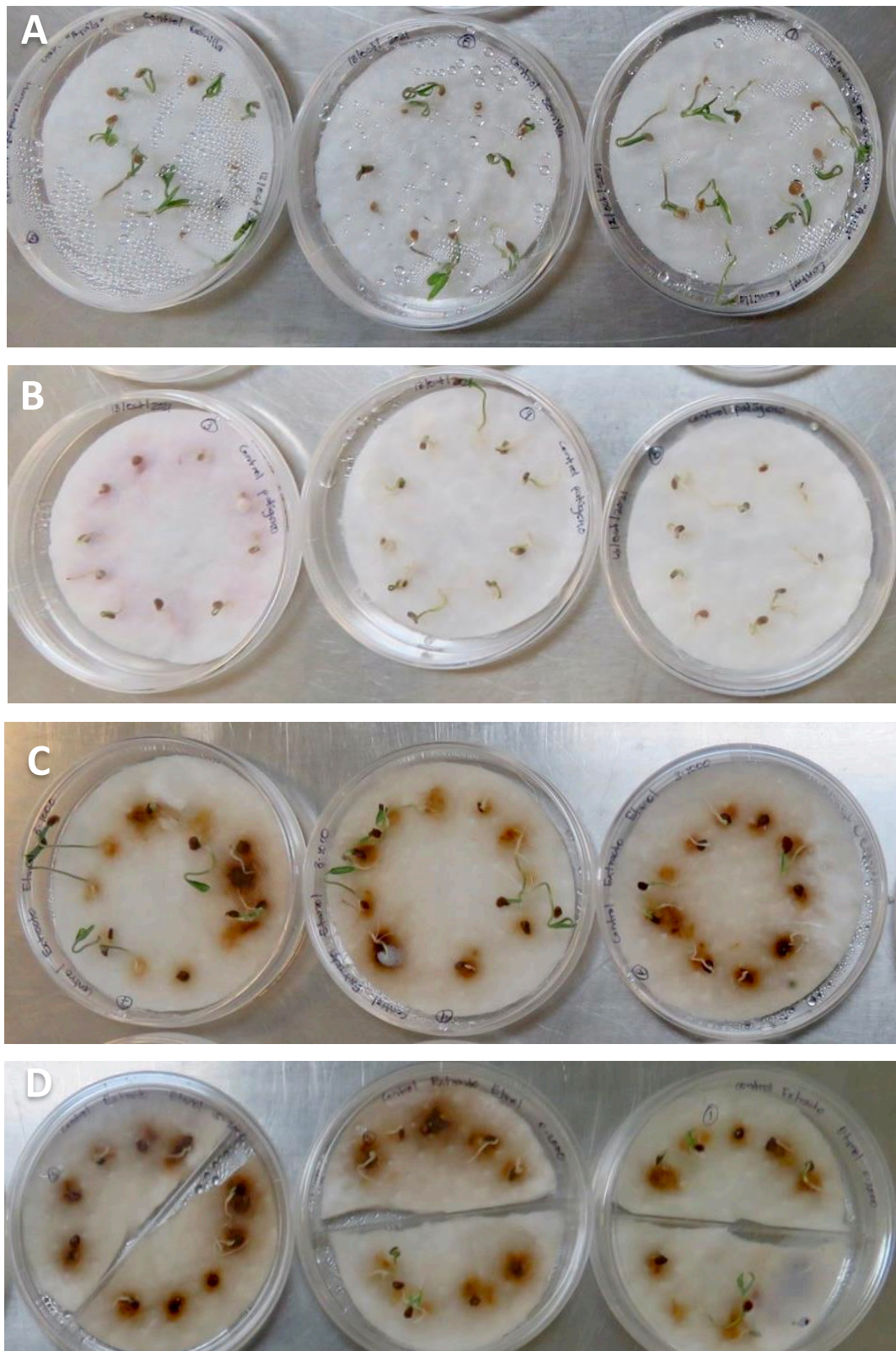


Figura 18. Pruebas sobre semillas en condiciones *in vitro*. **A.** Tratamiento 0: control semilla. **B.** Tratamiento 1: control patógeno. **C.** Tratamiento 2: semillas+extracto etanol 3-1000. **D.** Tratamiento 3: semillas+extracto etanol 5-2000.

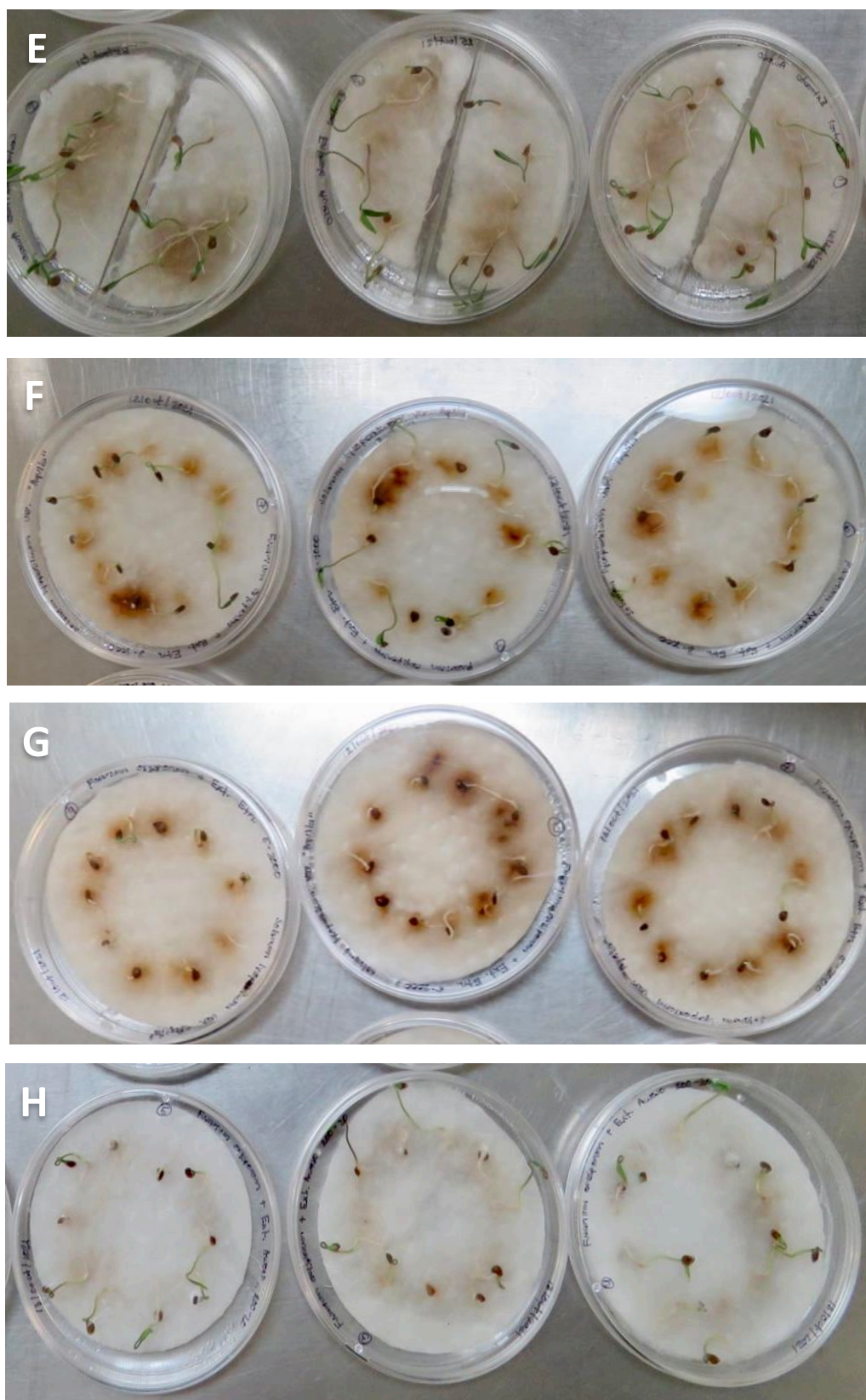


Figura 18. Continuación. **E.** Tratamiento 4: semillas+extracto acuoso 200-20. **F.** Tratamiento 5: semillas+extracto etanol 3-1000+patógeno. **G.** Tratamiento 6: semillas+extracto etanol 5-2000+patógeno. **H.** Tratamiento 7: semillas+extracto acuoso 200-20+patógeno.

7. CONCLUSIONES

En este estudio sobre la utilidad de un fungicida de origen botánico de gobernadora contra un hongo fitopatógeno, se muestra que los extractos etanólicos para la inhibición en el crecimiento de *F. oxysporum* en condiciones *in vitro* sobre PDA es alta, con porcentajes de hasta 99.68% de inhibición y una Tasa Relativa de Crecimiento de 0.064, es decir, casi nulo el crecimiento sobre sí mismo, con estos mismos extractos, se puede apreciar una disminución en el porcentaje de germinación en los tratamientos donde la semilla fue tratada solo con los extractos, comparado al control, por lo que se puede tratar de un efecto alelopático por parte de los fitoestrógenos de la gobernadora, obtenidos por los métodos de extracción aquí utilizados; en semillas tratadas con extractos etanólicos de *L. tridentata* e inoculadas con *F. oxysporum*, no existe diferencia significativa entre el control inoculado solo con patógeno y las semillas tratadas con los extractos etanólicos de mayor concentración, se puede concluir que no hay una mayor disminución en la germinación por la posible alelopatía de los extractos comparada al daño por el patógeno, además de esto visualmente se observa que la semilla no se muere, pero el proceso de germinación es más lento y da una brecha a seguir buscando la mejor forma de utilizar dichos extractos como tratamientos a agentes patógenos.

En caso de los extractos acuosos tampoco demostró una diferencia entre el tratamiento solo con la inoculación en semillas, ni en el caso *in vitro* se observó una disminución en el crecimiento del patógeno, por lo que no se puede recomendar su uso como fungicida botánico para esta forma de extracción, pero muestra un potencial de estimulación en el crecimiento de los diferentes individuos aquí trabajados, lo cual puede ser un indicador de que las sustancias que afectan del desarrollo de las plántulas, no son extraídas por este método.

En este trabajo se buscó obtener técnicas de extracción accesibles para personas sin equipo de laboratorio especializado; debido a los resultados obtenidos, se recomienda llevar los extractos etanólicos a más pruebas sobre semillas y que éstas tengan una cantidad de inóculo más cercano a lo observado en campo, para descartar efecto cruzado en el desarrollo de la plántula. Debido al potencial de los extractos de *Larrea tridentata* se recomienda aumentar los estudios fitoquímicos y demás pruebas más cercanas a las encontradas en campo y

aplicables en este sentido, ya que lo que se busca es dar alternativas a productores interesados en un manejo menos agresivo.

8. REFERENCIAS

Berenbaum, M. 1989. North American ethnobotanicals as sources of novel plant-based insecticides. *Insecticides of Plant Origin. ACS Symposium Series*, vol. 387. American Chemical Society, Washington DC, pp. 11–24.

Booth, C. 1971. *The Genus Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Surrey, England: The Eastern Press Limited

Cepero, M., Restrepo, S., Franco-Molano, A., Cárdenas, M. y Vargas, N. 2012. *Biología de Hongos*. Bogotá, Colombia: Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Ciencias Biológicas.

Céspedes, C. y Alarcon, J. 2011. Biopesticidas de origen botánico, fitoquímicos y extractos de Celastraceae, Rhamnaceae y Scrophulariaceae. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10, núm. 3, pp.175-181.

Chacón, S. y Utrera, E. 2022. Hongos Ascomycetos: pequeños gigantes de las áreas verdes urbanas y periurbanas de Xalapa. Fecha de acceso: 2022, de INECOL Sitio web: <http://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/component/content/article/17-ciencia-hoy/709-hongos-ascomycetos-pequenos-gigantes-de-las-areas-verdes-urbanas-y-periurbanas-de-xalapa>

Chase M. y Reveal J., 2009. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, pp.122–127

CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad) 2012. http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/70-zygop2m.pdf

Celis, A., Mendoza, C. y Pachón M. 2009. Revisión: uso de extractos vegetales en el manejo integrado de plagas, enfermedades y arvenses. *Temas Agrarios*, 14, núm. 1, pp.5-16.

Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. 2014 México: Publicaciones e Impresiones de Calidad S.A de C.V.

Fundación Valles (Fundación para el Desarrollo Tecnológico y Agropecuario de los Valles). 2011. Manual de Cultivo: Cebolla. Artes gráficas Sagitario.

Gámez H., Moreno S. y Ruiz A. 2007. Efectos Alelopáticos de *Larrea tridentata*, *Karwinskia humboldtiana* y *Helietta parvifolia* sobre la Germinación de Cultivos de Importancia Económica. Memorias del IX congreso de ciencia de los alimentos y V foro de ciencia y tecnología de alimentos.

García, B. 2012. *Monografía Larrea tridentata (Sessé & Mo. ex DC.) Coville*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 73 p.

Guzmán, J. 2002. *Efecto Antifúngico de Extractos Etanólicos y Clorofórmicos de Resina de Gobernadora (Larrea tridentata) de los Desiertos Chihuahuense y Sonorense sobre Rhizoctoniasolani y Fusarium oxysporum*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 51 p.

Heike, V. (ed.). 2009. Malezas de México, fecha de acceso, 2022. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/zygophyllaceae/larreatridentata/fichas/ficha.htm#5.%20Biolog%C3%ADa%20y%20ecolog%C3%ADa>

Hernández-Castillo F., Lira-Saldivar, R., Cruz-Chávez, G., Gallegos-Morales, M., Galindo-Cepeda, E., Padrón-Corral, M. y Hernández-Suárez. 2008. Potencial antifúngico de cepas de *Bacillus* spp. y extracto de *Larrea tridentata* contra *Rhizoctonia solani* en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 77, pp. 241-252.

IFOAM (International Federation of Organic Agriculture Movements. 2003. *Plagas y enfermedades en manejo orgánico: una mirada latinoamericana*. IFOAM.

Lira-Saldívar, R. 2003. Estado Actual del Conocimiento sobre las Propiedades Biocidas de la Gobernadora (*Larrea tridentata* (D.C.) Coville). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21, núm. 2, pp. 214-222.

Martins, S., Aguilar, C., de la Garza-Rodríguez, I., Mussatto, S. y Teixeira J. 2010. Kinetic study of nordihydroguaiaretic acid recovery from *Larrea tridentata* by microwave-assisted extraction. *J ChemTechnolBiotechnol*, 85, pp.1142–1147.

Martins, S., Aguilar, C., Teixeria, J. y Mussatto, S. 2011. Bioactive compounds (phytoestrogens) recovery from *Larrea tridentata* leaves by solvents extraction. *ELSEVIER*, 88, pp. 163-167.

Mesa, A., Marín, P., Calle, J. y Monsalve, Z. 2019. Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 45, núm. 1, pp.23-30.

Montes, R. 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Micología*, 29, pp.73-82.

Moreno-Limón, S., González-Solís, S., Salcedo-Martínez. M., Cárdenas-Ávila, M. y Perales-Ramírez, A. 2011. Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición in vitro de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica*, 32, pp. 193-205.

Nelson, P. 1981. Chapter 3: Life Cycle and Epidemiology of *Fusarium oxysporum*. En *Fungal Wilt Diseases of Plants*. pp.51-80. Department of Plant Pathology, The Pennsylvania Agricultural Experiment Station.

Peñuelas-Rubio, O., Arellano-Gil, M., Vargas-Arispuro, I., Lares-Villa, F., Cantú-Soto, E., Hernández-Rodríguez, S., Gutiérrez-Coronado, M. & Mungarro-Ibarra, C. (2015, julio). Bioactividad in vitro de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata*) sobre la inhibición de

hongos poscosecha: *Alternaria tenuissima*, *Aspergillus niger*, *Penicillium polonicum* y *Rhizopusoryzae*. *Polibotanica*, 40, pp. 183-198.

Peñuelas-Rubio O., Arellano-Gil M., Verdugo-Fuentes, A., Chaparro-Encinas L., Hernández-Rodríguez S., Martínez-Carrillo L. y Vargas-Arispuro I. 2017. Extractos de *Larrea tridentata* como una estrategia ecológica contra *Fusarium oxysporum radicylicopersici* en plantas de tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 35, pp. 360-376.

Raymundo, T., Escudero-Leyva, E., Soto-Agudelo, R., García-Jiménez, J., Romero-Bautista, L. y Valenzuela, R. 2017. Nuevos registros de Hypocreales (Sordariomycetes, Ascomycota) del bosque mesófilo de montaña de la Sierra Alta Hidalguense en México. *ActaBotánica Mexicana*, 120, pp.39-57.

Rossmann, A. 2000. Towards monophyletic genera in the holomorphic Hypocreales. *Studies in Mycology*, 45, pp.27-34.

Rzedowski, J. y Rzedowski, G. (1994). Zygothylaceae. Flora del Bajío y regiones adyacentes, fascículo 30, pp. 11-15.

Singh, R. 2023. Updated checklist of aphids (Homoptera: Aphididae) on the plants of the orders Celastrales, Malpighiales, Oxalidales and Zygothylales (Angiosperms: Eudicots: Fabids) of flowering plants in India. *Munis Entomology & Zoology*, 18, núm. 2, pp.1186–1204.

Thorne, R. 2000. The Classification and Geography of the Flowering Plants: Dicotyledons of the Class Angiospermae I. II. (Subclasses Magnoliidae, Ranunculidae, Caryophyllidae, Dilleniidae, Rosidae, Asteridae, and Lamiidae). *The botanical review*, 66, núm 4, pp.441–647.

Vásquez, L. y Castaño, J. 2017. Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder y H.N. Hansen): una revisión. *U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*, 20, núm. 2, pp. 363-374.

Villa, A., Pérez, R., Morales, H., Basurto, M., Soto, J. y Martínez, E. 2015. Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64, núm. 2, pp.194-205.

Zhang, N., Castlebury, L., Miller, A., Huhndorf, S., Shoch, C., Seifert, K., Rossman, A., Rogers, J., Kohlmeyer, J. y Sung, G. 2006. An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. *Mycologia*, 98 (6), pp. 076–1087.