

**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A. C.**

**EVALUACIÓN DE EXTRACTOS DE SEMILLAS DE NEEM
(Azadirachta indica A. Juss) CONTRA HONGOS PATÓGENOS DEL
FRUTO DE TOMATE**

POR:

ROCHÍN LEYVA MARIA ELENA

TESIS APROBADA POR LA

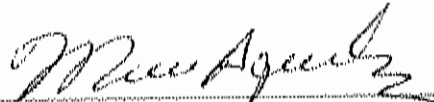
**UNIDAD CULIACÁN DEL CIAD
EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA PRODUCTOS
AGRÍCOLAS DE ZONAS TROPICALES Y
SUBTROPICALES**

**COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

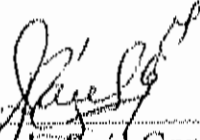
MAESTRÍA EN CIENCIAS,

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de María Elena Rochín Leyva, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



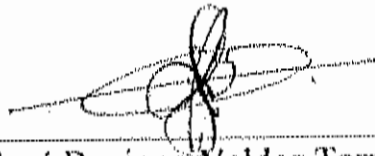
Dr. Miguel Angel Angulo Escalante
Director de Tesis



Dr. Raymundo Saúl García Estrada
Asesor



Dr. Cristóbal Chandez Quiroz
Asesor



Dr. José Benigno Valdez Torres
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen citas breves del material contenido en la presente tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunidades científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita, del director o directora del trabajo de tesis.

Dr. Alfonso A. Gardea Béjar
Director General

DEDICATORIAS

A mí querido esposo: Abraham

Por todo el apoyo incondicional, cariño, paciencia, desvelos compartidos, y por enseñarme que con perseverancia se logra todo lo que deseamos.

A mis padres:

Con todo el cariño y amor, por ser un gran apoyo, por sus consejos, ayuda, pero sobre todo su comprensión, sin ustedes hubiera sido muy difícil lograr esta meta tan importante en mi vida.

A mis hermanos:

Por el cariño y apoyo que me han brindado, y por los grandes momentos que hemos compartido.

Y muy especialmente a mis queridos hijos:

Carolina, Daniela y Jesús Abraham, que en su tierna edad, hicieron lo que estuvo en sus manos para apoyar a su mami, los amo, mis pequeños.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Culiacán, por haberme aceptado dentro del programa de posgrado, y por todo el apoyo otorgado para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico proporcionado, que me permitió realizar satisfactoriamente mis estudios de posgrado.

Al Dr. Miguel Angel Angulo Escalante por todo el apoyo brindado, por sus consejos, por su valiosa ayuda, paciencia y disposición para la realización de mi tesis.

A quienes fungieron como mis asesores: Dr. Raymundo Saúl García Estrada, Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz y Dr. Benigno Valdez Torres, por su valiosa colaboración, experiencia, dedicación y entrega, muchas gracias.

A los maestros de las asignaturas, tanto titulares como auxiliares, por su contribución invaluable, agradezco todo el apoyo brindado, Dr. Jorge H. Siller Cepeda, Dr. Tomás Osuna Enciso, Dra. Ma. Dolores Muy Rangel, Dr. Raymundo García Estrada, M.C. Armando Carrillo Fasio, M.C. Manuel Báez.

A los técnicos del laboratorio de Fitopatología: IBQ Beatriz Elena e Ing. Isidro Márquez Z., les agradezco infinitamente, todo el apoyo, consejos, por su paciencia y tolerancia.

A los técnicos del Laboratorio de Microbiología: IQ Werner Rubio Carrasco, QFB. Paola Meza A., QFB. Celida Martínez R. por su entusiasmo, apoyo y por su invaluable amistad.

A Víctor Arana, que con su actitud, optimismo y disposición, representa una importante labor de apoyo.

A la MC. Rosabel Vélez, por todo su apoyo, disposición y paciencia.

Al MC. Eduardo Sánchez muchas gracias por sus consejos, y por su valiosa amistad.

A la MC. Verónica Pérez Rubio por su valiosa ayuda y colaboración.

A todos mis amigos y compañeros, les agradezco su apoyo, especialmente a: Gloria Velazquez, Marcela Soto, Guadalupe Valero, Raquel, Raymundo Perez, Gabriel Cázarez, Javier López, Lucio Hernandez, Carlos Palazuelos, Evangelina, Yadira, Armenia, Mireya, Emilia, Laura, Adriana Sañudo, Rosalba Contreras, Olga Díaz.

A todo el personal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, muchas gracias por los momentos compartidos.

CONTENIDO

	Página
INDICE DE FIGURAS.....	xv
INDICE DE CUADROS.....	xix
RESUMEN.....	xxiii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVO GENERAL.....	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
HIPOTESIS.....	7
META.....	8
JUSTIFICACIÓN.....	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
REVISIÓN DE LITERATURA.....	12
Factores Que Afectan a Productos Hortofrutícolas en	
Poscosecha.....	12
Características de los Hongos.....	13
Hongos Fitopatógenos.....	15
Morfología.....	15
Mecanismo de Infección.....	16
Mecanismo de Propagación.....	16
Diversas Pudriciones de los Frutos	18

SUBCLASE ZYGOMYCETIDAE.....	19
<i>Rhizopus stolonifer</i>	20
Características Morfológicas.....	20
Descripción Taxonómica.....	21
Síntomatología.....	21
Hongos Imperfectos	23
<i>Geotrichum candidum</i>	23
Características Morfológicas.....	23
Descripción Taxonómica.....	23
Síntomatología.....	24
Enfermedades Causadas por Deuteromicetos.....	25
<i>Fusarium oxysporum</i>	25
Características Morfológicas.....	25
Descripción Taxonómica.....	26
Síntomatología.....	26
Alternativas para el Control de Hongos Fitopatógenos.....	27
Árbol del Neem (<i>Azadirachta indica</i> A. Juss).....	27
Taxonomía y Descripción Botánica.....	27
Origen y Distribución del Neem.....	30
Condiciones Climáticas de Propagación.....	30

Propiedades Físico-químicas del Aceite	
de Semillas del Neem.....	31
Usos Variados del Neem.....	31
Compuestos Presentes en el Neem.....	32
Triglicéridos.....	33
Terpenoides.....	34
Azadiractina.....	36
Salanina.....	37
Nimbina.....	38
Melantriol.....	39
Otros Triterpenoides Aislados del Árbol de Neem.....	39
Trabajos Realizados Sobre el Efecto Antifúngico del Neem.....	39
MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
Colecta y Preparación de las Semillas.....	42
Extracción del Material Graso de las Semillas de Neem.....	43
Obtención de los Extractos Acetónicos, Eetanólicos, Metanólicos y	
Hexánicos del Germen de la Semilla de Neem.....	43
Evaluación en Condiciones de Laboratorio.....	44
Pruebas de Identificación de Hongos.....	44
Preparación de la Mezcla de Agar Papa Dextrosa-Acidificado-	
Extracto.....	45
Preparación de la Suspensión de Esporas.....	46

Preparación de Cultivos Monospóricos.....	46
Evaluación del Crecimiento Micelial.....	47
Evaluación de la Esporulación.....	48
Evaluación de la Germinación de Esporas.....	48
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	50
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
Experimento 1. Efecto de los Extractos de Neem contra <i>Rhizopus</i> <i>stolonifer</i>	52
Crecimiento Micelial.....	52
Análisis de Varianza.....	52
Efectos de Interacción.....	53
Efectos Principales.....	62
Esporulación.....	66
Análisis de Varianza.....	66
Efectos de Interacción.....	67
Efectos Principales.....	69
Germinación de Esporas.....	70
Análisis de Varianza.....	70
Efectos de Interacción.....	71
Efectos Principales.....	76
Experimento 2. Efecto de los Extractos de Neem contra <i>Geotrichum</i> <i>candidum</i>	79

Crecimiento Micelial.....	79
Análisis de Varianza.....	79
Efectos de Interacción.....	80
Efectos Principales.....	90
Esporulación.....	93
Análisis de Varianza.....	93
Efectos de Interacción.....	93
Efectos Principales.....	97
Germinación de Esporas.....	100
Análisis de Varianza.....	100
Efectos de Interacción.....	100
Efectos Principales.....	104
Experimento 3. Efecto de los Extractos de Neem contra <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i>	107
Crecimiento Micelial.....	107
Análisis de Varianza.....	107
Efectos de Interacción.....	108
Efectos Principales.....	116
Esporulación.....	120
Análisis de Varianza.....	120
Efectos de Interacción.....	121
Efectos Principales.....	124

Germinación de Esporas.....	127
Análisis de Varianza.....	127
Efectos de Interacción.....	127
Efectos Principales.....	130
CONCLUSIONES.....	133
LITERATURA BIBLIOGRÁFICA CITADA.....	134

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fruto del neem.....	29
Figura 2. Estructura del isopreno.....	35
Figura 3. Fórmula estructural de Azadiractina.....	37
Figura 4. Fórmula estructural de Salanina.....	38
Figura 5. Fórmula estructural de Nimbina.....	38
Figura 6. Fórmula estructural de Melantriol.....	39
Figura 7. Efectos de interacción triple de los extractos etanólicos, acetónico, metanólico y hexánico en el crecimiento micelial de <i>Rhizopus stolonifer</i>	54
Figura 8. Efecto de interacción extracto-tiempo del crecimiento micelial de <i>Rhizopus stolonifer</i>	57
Figura 9. Efectos de interacción concentración-tiempo del crecimiento micelial de <i>Rhizopus stolonifer</i>	59
Figura 10. Efecto principal del factor extracto en el crecimiento micelial de <i>Rhizopus stolonifer</i>	62
Figura 11. Efecto principal del factor concentración en el crecimiento micelial de <i>Rhizopus stolonifer</i>	63
Figura 12. Efecto principal del factor tiempo en el crecimiento micelial de <i>Rhizopus stolonifer</i>	65
Figura 13. Efectos de interacción doble de la esporulación de <i>Rhizopus stolonifer</i>	67
Figura 14. Efecto principal del factor concentración en la esporulación de <i>Rhizopus stolonifer</i>	69

Figura 15. Efectos de interacción doble de esporas germinadas de <i>Rhizopus stolonifer</i>	72
Figura 16. Efecto principal del factor extracto de esporas germinadas para <i>Rhizopus stolonifer</i>	76
Figura 17. Efectos principales del factor concentración de esporas germinadas para <i>Rhizopus stolonifer</i>	77
Figura 18. Efectos de interacción triple de los extractos etanólico, acetónico, metanólico y hexánico en el crecimiento micelial de <i>Geotrichum candidum</i>	81
Figura 19. Efectos de interacción extracto-concentración del crecimiento micelial de <i>Geotrichum candidum</i>	84
Figura 20. Efectos de interacción concentración-tiempo en el crecimiento micelial de <i>Geotrichum candidum</i>	86
Figura 21. Efectos de interacción extracto-tiempo en el crecimiento micelial de <i>Geotrichum candidum</i>	87
Figura 22. Efecto principal del factor extracto en el crecimiento micelial de <i>Geotrichum candidum</i>	90
Figura 23. Efecto principal del factor concentración el crecimiento micelial de <i>Geotrichum candidum</i>	91
Figura 24. Efecto principal del factor tiempo en el crecimiento micelial de <i>Geotrichum candidum</i>	92
Figura 25. Efectos de interacción doble en la esporulación de <i>Geotrichum candidum</i>	94
Figura 26. Efecto principal del factor extracto en la esporulación de <i>Geotrichum candidum</i>	97
Figura 27. Efecto principal del factor concentración en la esporulación de <i>Geotrichum candidum</i>	98

Figura 28. Efecto de interacción doble en la germinación de esporas de <i>Geotrichum candidum</i>	101
Figura 29. Efecto principal del factor extracto para la germinación de esporas de <i>Geotrichum candidum</i>	104
Figura 30. Efecto principal del factor concentración para la germinación de esporas de <i>Geotrichum candidum</i>	105
Figura 31. Efectos de interacción triple de los extractos etanólico, acetónico, metanólico y hexánico en el crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i>	109
Figura 32. Efectos de interacción extracto-concentración en el crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i>	112
Figura 33. Efectos de interacción extracto-tiempo en el crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i>	113
Figura 34. Efectos de interacción concentración-tiempo en el crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i>	114
Figura 35. Efecto principal del factor extracto para el crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i>	116
Figura 36. Efecto principal del factor concentración para el crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i>	117
Figura 37. Efecto principal del factor tiempo del crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i>	118
Figura 38. Efectos de interacción extracto-concentración en la esporulación de <i>Fusarium oxysporum</i>	122
Figura 39. Efecto principal del factor extracto en la esporulación de <i>Fusarium oxysporum</i>	124
Figura 40. Efecto principal del factor concentración en la esporulación de <i>Fusarium oxysporum</i>	125
Figura 41. Efectos de interacción de los factores extracto y concentración para la germinación de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i>	128

Figura 42. Efecto principal extracto de la germinación de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i>	130
Figura 43. Efecto principal concentración de la germinación de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i>	131

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción taxonómica de <i>Rhizopus stolonifer</i>	21
Cuadro 2. Descripción taxonómica de <i>Geotrichum candidum</i>	24
Cuadro 3. Descripción taxonómica de <i>Fusarium oxysporum</i>	26
Cuadro 4. Descripción taxonómica del neem.....	28
Cuadro 5. Contenido de ácidos grasos presentes en el aceite de neem.....	34
Cuadro 6. ANOVA de extractos de neem contra crecimiento micelial de <i>Rhizopus stolonifer</i>	53
Cuadro 7. Diferencias entre las concentraciones de 5 y 10 %, a 48 horas de evaluación, para un mismo extracto.....	55
Cuadro 8. Diferencias entre extractos para las concentraciones de 5 y 10 % a 48 horas de evaluación.....	56
Cuadro 9. Diferencias entre tiempo para cada extracto de crecimiento micelial contra <i>Rhizopus stolonifer</i>	58
Cuadro 10. Diferencias entre tiempo para cada concentración del crecimiento micelial de <i>Rhizopus stolonifer</i>	60
Cuadro 11. Diferencias entre extractos en el crecimiento micelial contra <i>Rhizopus stolonifer</i>	63
Cuadro 12. Diferencias entre concentraciones del crecimiento micelial de <i>Rhizopus stolonifer</i>	64
Cuadro 13. Diferencias entre tiempos en el crecimiento micelial de <i>Rhizopus stolonifer</i>	65
Cuadro 14. ANOVA de extractos de neem contra esporulación de <i>Rhizopus stolonifer</i>	66
Cuadro 15. Diferencias entre concentraciones para un mismo extracto en la esporulación de <i>Rhizopus stolonifer</i>	68

Cuadro 16. Diferencias entre cada una de las concentraciones de la esporulación de <i>Rhizopus stolonifer</i>	69
Cuadro 17. ANOVA de extractos de neem contra germinación de esporas de <i>Rhizopus stolonifer</i>	70
Cuadro 18 Diferencias entre las concentraciones de 5 y 10 % para un mismo extracto de germinación de esporas para <i>Rhizopus stolonifer</i>	72
Cuadro 19. Diferencias entre extractos para las concentraciones de 5 y 10 % de germinación de esporas para <i>Rhizopus stolonifer</i>	73
Cuadro 20. Diferencias entre extractos para la germinación de esporas de <i>Rhizopus stolonifer</i>	76
Cuadro 21. Diferencias entre cada una de las concentraciones de la germinación de <i>Rhizopus stolonifer</i>	78
Cuadro 22. ANOVA de extractos de neem contra crecimiento micelial de <i>Geotrichum candidum</i>	79
Cuadro 23. Diferencias entre las concentraciones de 5 y 10 %, a 192 horas de evaluación, para un mismo extracto en el crecimiento micelial de <i>Geotrichum candidum</i>	82
Cuadro 24. Diferencias entre extractos para las concentraciones de 5 y 10 % a 192 horas de evaluación del crecimiento micelial de <i>Geotrichum candidum</i>	83
Cuadro 25. Diferencias entre concentraciones para un mismo extracto del crecimiento micelial de <i>Geotrichum candidum</i>	85
Cuadro 26. Diferencias entre tiempo para cada concentración del crecimiento micelial de <i>Geotrichum candidum</i>	86
Cuadro 27. Diferencias entre tiempo para cada extracto en el crecimiento micelial de <i>Geotrichum candidum</i>	88
Cuadro 28. Diferencias entre extractos en el crecimiento micelial de <i>Geotrichum candidum</i>	90
Cuadro 29. Diferencias entre concentraciones del crecimiento micelial de <i>Geotrichum candidum</i>	91

Cuadro 30. Diferencias entre tiempos en el crecimiento micelial de <i>Geotrichum candidum</i>	92
Cuadro 31. ANOVA de extractos de neem contra esporulación de <i>Geotrichum candidum</i>	93
Cuadro 32. Diferencias entre concentraciones para un mismo extracto en la esporulación de <i>Geotrichum candidum</i>	95
Cuadro 33. Diferencias entre extractos en la esporulación de <i>Geotrichum candidum</i>	97
Cuadro 34. Diferencias entre concentraciones para la esporulación de <i>Geotrichum candidum</i>	99
Cuadro 35. ANOVA de extractos de neem contra germinación de esporas de <i>Geotrichum candidum</i>	100
Cuadro 36. Diferencias entre concentraciones para un mismo extracto de la germinación de esporas de <i>Geotrichum candidum</i>	102
Cuadro 37. Diferencias entre extractos para la germinación de esporas de <i>Geotrichum candidum</i>	104
Cuadro 38. Diferencias entre concentraciones para la germinación de esporas de <i>Geotrichum candidum</i>	106
Cuadro 39. ANOVA de extractos de neem en el crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i>	107
Cuadro 40. Diferencias entre las concentraciones de 5 y 10 %, a 240 horas de evaluación, para un mismo extracto del crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i>	110
Cuadro 41. Diferencias entre extractos para las concentraciones de 5 y 10 % a 240 horas de evaluación del crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i>	110
Cuadro 42. Diferencias entre concentraciones de 5 y 10 % para los extractos en el crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i>	112
Cuadro 43. Diferencias entre tiempo para cada extracto del crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i>	113
Cuadro 44. Diferencias entre tiempo para cada concentración en el crecimiento	

micelial de <i>Fusarium oxysporum</i>	114
Cuadro 45. Diferencias entre extractos para el crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i>	116
Cuadro 46. Diferencias entre concentraciones para el crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i>	118
Cuadro 47. Diferencias entre tiempos del crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i>	119
Cuadro 48. ANOVA de extractos de neem contra esporulación de <i>Fusarium oxysporum</i>	120
Cuadro 49. Diferencias entre concentraciones para un mismo extracto de la esporulación de <i>Fusarium oxysporum</i>	122
Cuadro 50. Diferencias entre extractos en la esporulación de <i>Fusarium oxysporum</i>	124
Cuadro 51. Diferencias entre concentraciones en la esporulación de <i>Fusarium oxysporum</i>	126
Cuadro 52. ANOVA de extractos de neem contra germinación de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i>	127
Cuadro 53. Diferencias entre concentraciones para un mismo extracto en la germinación de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i>	129
Cuadro 54. Diferencias entre extractos de la germinación de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i>	131
Cuadro 55. Diferencias entre concentraciones de la germinación de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i>	132

RESUMEN

El tomate es la hortaliza de mayor producción y exportación en el estado de Sinaloa. Uno de los principales problemas en la cadena productiva de esta hortaliza son las pérdidas provocadas por hongos fitopatógenos que atacan al fruto de tomate; hongos como *Rhizopus stolonifer*, *Geotrichum candidum* y *Fusarium oxysporum*, causan daños considerables a este fruto, debido a su rápida proliferación y abundancia en el medio ambiente; además, se consideran los principales causantes de las pérdidas económicas del tomate en poscosecha. Existen una gran variedad de fungicidas, los cuales son utilizados para controlar estos fitopatógenos, pero hay una tendencia marcada hacia la búsqueda de alternativas naturales inocuas al medio ambiente. Diversos estudios muestran que los extractos obtenidos a partir de semillas del fruto de neem (*Azadirachta indica* A. de Juss) tienen efecto fungicida contra patógenos de frutos poscosecha (Govindachari et al., 1998; Olsen y Rasmusen, 2001; Saravanan et al., 2003).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antifúngico de los extractos etanólicos, acetónicos, metanólicos y hexánicos de *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) a concentraciones de 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 % contra los hongos fitopatógenos *Rhizopus stolonifer*, *Geotrichum candidum* y *Fusarium oxysporum*, considerados como los principales hongos patógenos poscosecha del fruto de tomate. Se utilizaron como control, muestras con 0.0 % de los extractos.

Se evaluó cada uno de los extractos en las mismas concentraciones pilas cada uno de los hongos litopatógenos, en donde los parámetros a evaluar fueron: crecimiento micelial, esporulación y germinación de esporas; para la evaluación del parámetro crecimiento micelial se procedió de la siguiente manera: Discos de agar de 7 mm diámetro conteniendo el patógeno respectivo fueron colocados en el centro de cada caja petri con el medio PDA adicionado extracto. Las cajas se incubaron a 25 °C y se procedió a realizar evaluaciones después de 24 horas, hasta que el hongo cubrió la superficie total de la caja, cuando la colonia del hongo cubrió toda la caja petri, se procedió a medir el radio de crecimiento, para determinar el efecto inhibitorio (Buttish et al., 2000). Debido a las diferencias de crecimiento Rhizoglyphus floccosus se disminuyó de evaluar en los 48 horas, (*Candida albicans* en las 192 horas y *Fusarium oxysporum* en las 240 horas).

Para evaluar la esporulación, se utilizaron las mismas cajas petri en donde se midió el crecimiento micelial de cada hongo en estudio, una vez que en alguno de los tratamientos la colonia del hongo cubrió toda la superficie de la caja. Las cajas petri conteniendo el hongo a evaluar, se lavaron con 10 mL de agua destilada estéril y la superficie se frotó con un vialito de vidrio, para posteriormente filtrar a través de papel de organela, con la finalidad de recolectar los conidios (esporas). El filtrado se recogió en vasos de precipitado de 100 mL. Para determinar la concentración de esporas obtenidas, muestras de 0,5 mL de cada suspensión de conidios se transfirieron a la cámara de Neubauer. Se procedió al conteo de esporas, en ambos lados de la cámara, en el cuadro del centro, obteniéndose un promedio de los dos conteos. La cantidad

resultante del promedio se multiplicó por 10,000. Los resultados se reportaron en Esporas/mL

Para la evaluación de la germinación de esporas, se procedió a preparar una suspensión de esporas del hongo evaluado. Para *Aspergillus* se preparó una suspensión de 1×10^8 , para *Geotrichum candidum* 1×10^7 y para *Fusarium oxysporum* 1×10^7 esporas/mL. La suspensión de esporas se agitó en un vortex (Minishaker MS 1) y se procedió a tomar muestras de 100 μ L para *Aspergillus* y *Geotrichum candidum*, para *Fusarium oxysporum* se tomaron 50 μ L. Después de esto, cada muestra se agregó en el centro de una caja petri, la cual contenía el medio de cultivo PDA acidificado mezclado con el extracto y la concentración en evaluación. Posteriormente se limpiaron los platos de vidrio en la caja petri y ésta se agitó, para dispersar los esporas. Se incubó a 26 °C, hasta observar la presencia de esporas germinadas. Los resultados se expresaron en No. de esporas germinadas (Lawdah et al., 2002).

Los datos obtenidos fueron evaluados mediante el Análisis de Varianza del paquete estadístico Minitab, Versión 14 y la comparación de medias se realizó por medio de la prueba de Tukey al 5 %, de significancia,

De los extractos evaluados, el extracto cianólico mostró mayor efecto antifúngico para *Aspergillus* ya que a la concentración de 10% se logró 94.4 % de inhibición del crecimiento micelial. El extracto acético a la misma concentración mostró 89.5 % de inhibición. Los extractos etanólico y acético a concentraciones de

0.5 % lograron inhibir más del 98 % de la esporulación de *Rhizopus oryzae*. De igual manera las concentraciones de 5 y 10 % del extracto clonológico inhibieron el 100 % la germinación de esporas de *Aspergillus niger*, los 3 hongos evaluados. El extracto clonológico al 10 % mostró un efecto fungicida en el crecimiento micelial y esporulación de *Fusarium solani*; las concentraciones de 5 y 10 % del extracto clonológico inhibieron el 100 % la germinación de esporas de este hongo. El efecto mostrado por los demás extractos evaluados en *Rhizopus oryzae* y *Geotrichum candidum* fue fungistático.

Geotrichum candidum, fue el hongo más resistente en los parámetros de crecimiento micelial y esporulación, ya que concentraciones del 10 % de extracto clonológico inhibieron solo 40 % del crecimiento micelial de este hongo. Las concentraciones del 5 y 10 % del extracto clonológico inhibieron el 100 % la germinación de esporas *Geotrichum candidum*,

INTRODUCCIÓN

Sinaloa es uno de los estados del país con mayor producción y exportación de hortalizas a nivel nacional. La superficie sembrada promedio de cultivos hortícolas en los últimos 9 años fue de 41,425 hectáreas, de las cuales el 45 % de la superficie corresponde al cultivo de tomate (SAGARPA, 2001). Durante la temporada hortícola 2002-2003 las exportaciones de tomate alcanzaron las 772,403 toneladas, representando el 20 % de los productos hortofrutícolas de un total de 3,655,738 toneladas exportadas. Esta hortaliza se exporta principalmente a Estados Unidos (CIDH, 2004).

Uno de los principales problemas de pérdidas poscosecha del fruto de tomate es debido a los daños causados por hongos fitopatógenos. No existen datos concretos acerca de niveles comparativos de producción y pérdidas causadas por estos microorganismos, pero Jones *et al.* (1997), estiman que en países desarrollados hay pérdidas de 10-25 % y en países en vías de desarrollo, se alcanzan pérdidas hasta de un 50 %. Los principales hongos fitopatógenos que atacan al fruto de tomate en el periodo de poscosecha son especies de los géneros: *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Alternaria* y *Aspergillus*. Los tres primeros, por su rápida proliferación, son los principales causantes de las pérdidas económicas en la cadena productiva del tomate (Mahovic *et al.*, 2002).

Actualmente se utilizan fungicidas químicos como una primera opción para el control de hongos fitopatógenos que causan daño en poscosecha. Entre éstos se encuentran los desinfectantes a base de compuestos clorados. Sin embargo, surgieron dudas sobre su uso debido a la formación de residuos químicos derivados del cloro como los trihalometanos, particularmente el cloroformo y otros compuestos químicos como las cloraminas, los cuales contaminan el medio ambiente y causan toxicidad en mamíferos (Xu, 1999; Smilanik *et al.*, 1999). Además de presentar desventajas debido a que su eficacia disminuye cuando el pH aumenta más de 7.5, de tal manera que, cuando se presenta un pH de 8, se requiere realizar ajustes para modificar este valor (Smilanik *et al.*, 1999).

El uso de fungicidas químicos en las labores agrícolas para el control de plagas y enfermedades en plantas, así como en frutos poscosecha, contribuyen sustancialmente en la calidad de los alimentos y en la salud humana, pero a pesar de estos beneficios, los fungicidas químicos son responsables del desarrollo de resistencia en los patógenos (Carpinella *et al.*, 2003); por otra parte; también pueden ser una amenaza a la salud pública ya que forman residuos en productos frescos (Xu, 1999). Todo esto induce a la búsqueda de nuevas alternativas menos tóxicas y residuales para minimizar los daños provocados por fungicidas sintéticos.

Los movimientos ecológicos a nivel mundial, desde la década pasada, están incentivando el uso de sustancias naturales para el control de plagas y enfermedades en vegetales, a tal punto que productos de exportación, como el fruto de tomate,

deben adecuarse a las condiciones de cultivo orgánico, es decir que no hayan recibido tratamiento químico (Stauffer *et al.*, 2000).

Desde la antigüedad, se tenían conocimientos de que ciertos productos obtenidos como extractos de algunas plantas podían ser utilizados como repelentes o barreras para impedir la proliferación de ciertos tipos de insectos. Como ejemplos de estos extractos están los de ajo (*Allium sativum*), rotenona (*Lonchocarpus nicou*) (Iannacone y Lamas, 2003) y los de más reciente uso, los extractos obtenidos del árbol del neem (*Azadirachta indica* A. Juss) (Sutherland *et al.*, 2002), el cual pertenece a la familia Meliaceae. El neem posee propiedades medicinales, y es utilizado en forma de macerados e infusiones como antiparasitario. También, los extractos de neem poseen un efecto bactericida y viricida contra *Escherichia coli*, *Estafilococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y el virus del Dengue tipo-2 (Williams *et al.*, 1998; Parida *et al.*, 2001; Okemo *et al.*, 2001; Coventry y Allan, 2001; López, 2003).

Entre otros plaguicidas naturales conocidos y utilizados a nivel mundial en el control de insectos se encuentran; los extractos de cebolla (*Allium cepa* L.), el tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), extractos de semillas del paraíso (*Melia azedarach* L.), ortiga (*Urtica dioica* L.), entre otros. En cambio la información referente a extractos vegetales para el control de enfermedades fúngicas y bacterianas en plantas, es escasa, debido principalmente a que los cambios son menos perceptibles, y por lo

tanto más difíciles de estudiar (Stauffer *et al.*, 2000).

El neem (*Azadirachta indica* A. Juss) es una planta originaria del sur sureste del continente asiático, entre Indonesia e Irán (Perez y Serra, 2001). En la última década, diversos estudios químicos realizados con esta planta, demostraron la presencia de ciertos compuestos a los cuales se les atribuye el efecto bactericida. Estos compuestos son llamados limonoides que poseen un amplio rango de actividades biológicas; por ejemplo efectos antialimentarios propiedades reguladoras del crecimiento de insectos (Kumar y Parmar, 1996), además de efectos microbicidas en bacterias (Williams *et al.*, 1998; López, 2003), virus (Parida *et al.*, 2001; López, 2003) y hongos (Okemo *et al.*, 2001; Coventry y Allan, 2001).

A pesar de que existe información acerca del efecto fungicida de los extractos de neem, los resultados obtenidos son contradictorios, lo que podría deberse a la metodología de extracción y esto afectaría en los resultados para que el neem sea utilizado en el control de hongos fitopatógenos. Coventry y Allan (2001), al evaluar diferentes concentraciones de un producto comercial de neem (NeemAzal) contra *Gaeumannomyces graminis tritici* (Ggt), encontró que la efectividad *in vitro* contra *Gaeumannomyces graminis tritici* (Ggt), dependía del solvente usado para la preparación del NeemAzal.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antifúngico de los extractos etanólico, metanólico, acetónico y hexánico de semillas de neem, contra los principales hongos patógenos que atacan a frutos de tomate.

Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto antifúngico, de los extractos etanólicos, acetónicos, metanólicos y hexánicos, obtenidos del germen de las semillas de neem contra los hongos fitopatógenos *Rhizopus stolonifer*, *Geotrichum candidum* y *Fusarium oxysporum*.
2. Determinar si existe efecto fungicida o fungistático.
3. Determinar qué extracto muestra mayor efecto antifúngico contra los fitopatógenos *Rhizopus stolonifer*, *Geotrichum candidum* y *Fusarium oxysporum*.
4. Determinar que concentración de los extractos etanólicos, acetónicos, metanólicos y hexánicos presenta mayor efecto contra los hongos fitopatógenos *Rhizopus stolonifer*, *Geotrichum candidum* y *Fusarium oxysporum*.
5. Evaluar si el género y la especie de los hongos fitopatógenos *Rhizopus stolonifer*, *Geotrichum candidum* y *Fusarium oxysporum* influyen en la

respuesta a los extractos etanólicos, acetónicos, metanólicos y hexánicos del neem,

6. Determinar qué hongo muestra mayor inhibición al efecto de los extractos etanólicos, acetónicos, metanólicos y hexánicos del neem en el crecimiento micelial, esporulación y germinación de esporas.

HIPÓTESIS

1. Los extractos etanólicos, acetónicos, metanólicos y hexánicos, obtenidos de las semillas de neem, poseen efecto antifúngico contra los principales hongos patógenos poscosecha *Rhizopus stolonifer*, *Geotrichum candidum* y *Fusarium oxysporum* que afectan al fruto de tomate.
2. El efecto de los extractos contra los principales hongos fitopatógenos poscosecha mencionados es fungistático.
3. Los extractos etanólicos y metanólicos presentan mayor efecto antifúngico contra los fitopatógenos *Rhizopus stolonifer*, *Geotrichum candidum* y *Fusarium oxysporum*.
4. La concentración del 10 % de todos los extractos a evaluar posee mayor efecto contra los hongos fitopatógenos *Rhizopus stolonifer*, *Geotrichum candidum* y *Fusarium oxysporum*.
5. El género y la especie de los hongos fitopatógenos *Rhizopus stolonifer*, *Geotrichum candidum* y *Fusarium oxysporum*, si influye en la respuesta a los extractos etanólicos, acetónicos, metanólicos y hexánicos del neem.

META

Generar información sobre el efecto antifúngico de los diferentes extractos de las semillas de neem contra hongos patógenos que atacan al fruto de tomate.

JUSTIFICACIÓN

El tomate es de los cultivos que más se explotan en el área del Noroeste del país, específicamente en el estado de Sinaloa, en donde las exportaciones de este cultivo generan una importante captación de divisas, para el país y el estado. Durante la temporada agrícola 2003-2004 el tomate generó divisas por 712.6 millones de dólares, de un total de 2,743 millones, representando el 26 % del total de las exportaciones hortofrutícolas (CIDH, 2004).

Una de las etapas más importantes del manejo del fruto de tomate es durante el manejo poscosecha, en donde existe una considerable pérdida del producto debido principalmente a daños causados por hongos fitopatógenos. Se estima que en los países en vías de desarrollo, en donde el uso de los avances tecnológicos para el manejo poscosecha es limitado, las pérdidas causados por estos microorganismos pueden aumentar a niveles del 50 % (Jones *et al.*, 1997), y solamente en la etapa de comercialización existen pérdidas de hasta el 20 %; pérdidas causadas principalmente por los hongos fitopatógenos *Rhizopus stolonifer*, *Geotrichum candidum* y *Fusarium oxysporum* (Silveira *et al.*, 2001).

Existe una gran variedad de fungicidas químicos utilizados para controlar el problema causado por éstos microorganismos, pero actualmente su uso se encuentra restringido y limitado por los organismos internacionales de salud pública (Cantoral, 2000).

Este trabajo se justifica ya que es necesario el estudio de la evaluación de productos naturales que tienen la posibilidad de controlar a hongos responsables de deteriorar la calidad poscosecha de los frutos de tomate, con el propósito de que en el futuro puedan convertirse en una alternativa natural para el control de hongos fitopatógenos poscosecha.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Este es un trabajo experimental que pretende evaluar el efecto antifúngico de los extractos etanólicos, acetónicos, metanólicos y hexánicos de neem contra los principales patógenos que afectan al fruto de tomate, debido a que:

- ❖ Existe poca información sobre el efecto fungicida de los extractos de neem contra fitopatógenos especialmente *Rhizopus stolonifer*, *Geotrichum candidum* y *Fusarium oxysporum*.
- ❖ Las pérdidas poscosecha provocadas por estos hongos son considerables.
- ❖ Se requieren nuevas alternativas naturales de fungicidas contra patógenos que afectan al fruto de tomate en poscosecha.

REVISIÓN DE LITERATURA

Factores que Afectan a Productos Hortofrutícolas en Poscosecha

Antes de la cosecha, el fruto de tomate forma parte de un organismo vivo que posee defensas naturales que le proporcionan resistencia contra microorganismos patógenos oportunistas, que generalmente los podemos encontrar en cualquier sitio (Mahovic *et al.*, 2002). En la etapa de poscosecha, los frutos y vegetales como el tomate, son productos altamente perecederos, y pueden ocurrir pérdidas considerables debido a una gran variedad de factores, que pueden ser de origen abiótico o biótico (Mari y Guizzardi, 1998).

Entre los daños causados por factores abióticos podemos mencionar los daños mecánicos causados por golpes, uñas, anillos, entre otros; daños ambientales provocados por temperatura extrema y estrés hídrico; además de los daños químicos, que son provocados por cualquier sustancia química, causando el daño ya sea por exceso o deficiencia. Los daños por factores bióticos son debidos principalmente a hongos y bacterias (Agrios, 2001).

Generalmente las pudriciones y lesiones de la superficie de los frutos son ocasionadas por hongos fitopatógenos como *Alternaria* (pudrición negra, *Botrytis* (pudrición por moho gris), *Geotrichum* (pudrición ácida) y *Rhizopus* (pudrición algodonosa). Otro hongo muy importante debido a los daños que ocasiona a la planta

y al fruto de tomate es el hongo del género *Fusarium* (Agris, 2001).

Características de los Hongos

Los hongos forman un grupo diverso de organismos que ocupan múltiples sistemas biológicos. Generalmente son de vida libre y abundan en la naturaleza; además, sólo unos pocos forman parte de la flora normal de los humanos. Son organismos eucarióticos, y a diferencia de las células vegetales y algunas bacterias, no contienen clorofila (Romero, 1993), por lo que la mayoría de las 100 000 especies de hongos conocidas son estrictamente saprófitas y viven sobre la materia orgánica muerta, a la que descomponen. Sin embargo, más de las 8 000 especies de hongos producen enfermedades en las plantas. Todas las plantas son atacadas por algún tipo de hongo, y cada uno de los hongos parásitos ataca a uno o más tipos de plantas (Agris, 2001).

Estos microorganismos tienen una existencia que puede ser heterotrófica en la naturaleza; como saprófitos (organismos que viven en materia orgánica muerta o degradada); simbiotes (organismos que viven asociados, lo cual les proporciona ventajas mutuas); comensales (dos organismos viven en íntima relación, lo que beneficia a uno de ellos y no beneficia ni perjudica al otro) o como parásitos (organismos que viven en/o dentro de un huésped del que obtienen beneficios sin aportar nada a cambio. En el caso de los patógenos, la relación es perjudicial para el huésped) (Murray *et al.*, 1997).

Los hongos son pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos y ramificados (Alexopoulos y Mims, 1985). De acuerdo a su morfología pueden clasificarse en unicelulares (hongos levaduriformes) y filamentosos (hongos plurinucleados). Sin embargo, una forma importante de diferenciarlos es por la composición de su pared celular, ya que por lo común, la de los hongos filamentosos contiene quitina y celulosa y en levaduras su componente principal son las mananas (Tortora *et al.*, 1995).

Hongos Fitopatógenos

Morfología

Los hongos se pueden dividir en dos tipos morfológicos básicos, levaduras e hifas. Las levaduras son unicelulares y se reproducen de forma asexual a través de procesos que se conocen como formación de blastoconidios o fisión. Las hifas son filamentos tubulares semejantes a hilos ramificados que se prolongan por extensión apical; éstas pueden ser cenocíticas, que se caracterizan por ser huecas y multinucleadas o tabicadas. El término colectivo para una masa de hifas es micelio o también llamado moho (Murray *et al.*, 1997).

Una hifa se compone de una pared tubular fina, transparente, completamente llena o sólo recubierta por protoplasma. Las hifas pueden crecer sumergidas o en la superficie del medio de cultivo, llamadas hifas vegetativas; las hifas aéreas son las que se proyectan por encima de la superficie del medio de cultivo (Murray *et al.*, 1997). La composición de la pared celular no es la misma en todos los hongos. En algunas formas, la celulosa es quizá el principal constituyente; pero en la mayoría de los hongos, sobre todo en los superiores, la pared contiene en mayor proporción quitina, calosa y otros materiales orgánicos (Romero, 1993).

Los hongos son organismos heterotróficos (incapaces de usar el bióxido de carbono como única fuente de carbono), e ingieren su alimento por absorción. Su talo es variable desde ameboide y unicelular, hasta tubular rodeado por una pared celular.

Puede ser único multicelular (septado) y hallarse sobre o dentro del sustrato. No son organismos móviles, pero en algunos casos sus esporas sí lo son.

Mecanismos de Infección

Los hongos asumen varias posiciones con respecto a las células y tejidos vegetales que parasitan; algunos se desarrollan sobre la superficie de la planta a la que infectan, pero envían sus órganos de alimentación, llamados haustorios hacia el interior de las células epidérmicas. Otros hongos, como *Venturia*, sólo se desarrollan entre la cutícula y las células epidérmicas. Algunos otros crecen en los espacios intercelulares y pueden o no enviar sus haustorios al interior de las células del hospedante. Además, algunos hongos parásitos no obligados producen una gran cantidad de enzimas que maceran y destruyen a las células vegetales sin necesidad de que el micelio tenga contacto con las células vivas de la planta (Agrios, 2001).

Mecanismos de Propagación

En medios naturales, las características de crecimiento de los hongos los convierten en los colonizadores más eficientes. A partir de un propágulo inicial forman una “colonia” por continuo crecimiento de las hifas. Este crecimiento es apical, es decir, ocurre radialmente, pero está restringido a la punta de las hifas, las cuales se ramifican e invaden toda la superficie. Al agotarse los nutrientes, la colonia envía “hifas exploradoras” hasta encontrar nuevas fuentes nutritivas. A ciertos

intervalos, y en respuesta a varios estímulos, las colonias de los hongos producen esporas, lo que permite su dispersión y preservación. Las esporas germinarán en condiciones adecuadas para formar nuevas colonias (Ruiz, 2001).

Los hongos son los destructores más implacables de materia orgánica que existen en la naturaleza. Esta actividad puede ser considerada indeseable si se desea preservar el material que es atacado por ellos. Pero en los ciclos de la naturaleza, en donde lo que muere debe ser degradado para que los ciclos de la vida continúen, su papel es vital (Agrios, 2001). Su capacidad patogénica hacia todos los vegetales, cultivados y silvestres, provoca graves pérdidas en el campo, al igual que su actividad degradativa durante el almacenamiento (Ruiz, 2001).

Las pérdidas económicas durante el manejo poscosecha de productos hortofrutícolas causados por varios microorganismos pueden ser considerables. Las pudriciones originadas por hongos se encuentran entre las principales causas de daños poscosecha. Hongos como *Alternaria spp.*, *Fusarium spp.*, *Pestalotiopsis spp.* y *Rhizopus spp.*, causan serios daños durante el manejo poscosecha a varios frutos y vegetales como tomates (*Lycopersicon esculentum Mill.*), chiles (*Capsicum annum L.*), mangos (*Mangifera indica L.*), sapote mamey (*Pouteria sapota Jacq.*) y ciruelas (*Spondis purpurea L.*) (Bautista *et al.*, 2000).

El uso de plaguicidas es la principal estrategia para reducir los daños poscosecha, sin embargo existe una tendencia mundial de reducir su uso. Los daños a la salud y la contaminación ambiental, así como también el desarrollo de resistencia

a los patógenos, son las principales razones para el desarrollo de nuevas alternativas para el control de patógenos poscosecha (Carpinella *et al.*, 2003).

Diversas Pudriciones de los Frutos

Los frutos de las solanáceas hortícolas pueden ser atacados de forma más o menos específica por un cierto número de hongos; por ejemplo, sobre los frutos verdes del tomate se pueden detectar, por contacto o proximidad del suelo, daños provocados por hongos del género *Phytophthora*, que causan pudrición total del fruto en tres o cuatro días. La mayoría de estos hongos saprófitos pueden penetrar a partir de heridas mecánicas o de las “grietas de crecimiento”. Los más frecuentes son *Alternaria* de tipo *alternata* o *tenuis* de esporas en cadena, hongos del género *Rhizopus* y un hongo de desarrollo blanco cremoso asociado a bacterias lácticas conocido como *Geotrichum candidum* (Messian *et al.*, 1995).

Subclase Zygomycetidae

Los hongos de la subclase Zygomycetidae producen un micelio filamentoso, abundante, profusamente ramificado, cenocítico cuando joven, frecuentemente con septas al envejecer, consistente de hifas alimentadoras hundidas en el sustrato e hifas aéreas fértiles; esporangióforos largos, simples o ramificados, individuales o en grupos (Alexopoulos y Mims, 1985), en la mayoría de las especies son prolongados hasta dentro de los esporangios para formar la columela; esporangios globosos, piriformes o cilíndricos, multiespóricos o pauciespóricos (esporangiolos); isogamentangios que al fusionarse producen "zigosporas" (esporas de resistencia). Tanto los esporangios asexuales como los provenientes de las zigosporas producen esporas inmóviles llamadas aplanosporas (Romero, 1993).

Un número muy reducido de zygomycetes causa daños a productos agrícolas, los que se encuentran agrupados principalmente en el orden de los mucorales. Estos hongos son mayormente saprofitos, algunos parásitos benignos de plantas, otros endoparásitos de vertebrados, incluyendo el hombre; poseen reproducción asexual por esporangios, que contienen una a muchas aplanosporas, algunas veces por conidios (Agrios, 2001).

Los mucorales (zigomicetos), forman parte de la microflora habitual del suelo. Dos especies afectan a las hortalizas: *Rhizopus nigricans* al igual que *Rhizopus stolonifer*, son capaces de invadir frutos maduros dañados o agrietados de frutos como tomates, melones, fresas y melocotones, entre otros (Jones *et al.*, 1997) y

Choanephora cucurbitacearum pueden provocar la putrefacción de frutos o de vainas a partir de la flor marchita, y en ocasiones incluso invadir los tallos (Messian *et al.*, 1995).

Rhizopus stolonifer

Características Morfológicas. El micelio aéreo forma estolones arqueados, los cuales, en el punto de contacto con el substrato, producen rizoides y, exactamente en el lado opuesto, esporangióforos delgados, erectos o algo encorvados y, por lo general, en fascículos (Agríos, 2001).

Los esporangióforos, al terminar su crecimiento, dan origen a esporangios globosos, de paredes delgadas, columela prominente y color blanco cuando jóvenes y negro al madurar debido al color negro de las esporangiosporas maduras (Jones *et al.*, 1997). Las esporangiosporas son globosas a ovales o angulares, lisas o con estrías longitudinales, raramente equinuladas. Las cigosporas, formadas heterotálicamente, tienen forma oval a elíptica poseen paredes gruesas y superficie notablemente equinulada (Romero, 1993).

Rhizopus stolonifer es un hongo de amplia distribución, usualmente saprófito y algunas veces es un parásito débil de frutos almacenados (Agríos, 1997). Este hongo afecta a los frutos en todos los estados de madurez, es de proliferación rápida, produce una pudrición blanda, acuosa con presencia de micelio blanco al inicio y producción de puntos negros. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra

entre 24-27 °C (Jones *et al.*, 1997).

Descripción Taxonómica. El **Cuadro 1** muestra la descripción taxonómica de *Rhizopus stolonifer*.

Cuadro 1. Descripción taxonómica de *Rhizopus stolonifer*.

Reino	Fungi
Subdivisión	Eumycotina
Clase	Zigomycetes
Subclase	Zygomycetidae
Orden	Mucolares
Familia	Mucoraceae
Género	<i>Rhizopus</i>
Especie	<i>stolonifer</i>

Fuente: Agrios, 2001

Sintomatología. Para que ocurra infección de estos hongos se requiere, de la presencia de heridas frescas y de que las esporas germinen antes de que se forme la lámina corchosa que restaura o sella las heridas. Una vez que las esporas germinan la pudrición del sustrato se presenta entre 4 a 6 días aproximadamente (Romero, 1993).

Una vez iniciado el proceso patológico, las zonas infectadas de los órganos carnosos aparecen como si estuvieran embebidas en agua y son muy blandas (Agrios, 2001). El órgano carnoso ablandado pierde humedad gradualmente hasta que se

arruga y momifica. En poco tiempo, las hifas del hongo crecen hacia fuera a través de las heridas del fruto y cubren las zonas afectadas al producir grupos de esporangiósforos filamentosos de color gris que producen esporangios negros en sus puntas (Jones *et al.*, 1997; Mahovic *et al.*, 2002). El hongo se extiende hasta la superficie de las porciones sanas de los frutos, los tejidos afectados, inicialmente desprenden un aroma ligeramente agradable, para después se transforma en un aroma rancio (Jones *et al.*, 1997).

Hongos Imperfectos

Podemos definir como hongo imperfecto a los tipos de hongos que no producen o que no se sabe que produzca esporas sexuales (Agrios, 2001).

Geotrichum candidum

Características Morfológicas. *Geotrichum candidum* causa la pudrición ácida de cítricos, tomates, zanahorias y otros frutos y vegetales. La pudrición ácida es una de las pudriciones más desagradables y de peor aspecto de los frutos y hortalizas susceptibles. Frutos maduros almacenados en cajas de plástico húmedas son particularmente susceptibles a la pudrición ácida. Este hongo se desarrolla en condiciones de humedad y temperatura que fluctúa entre 24 y 30 °C aproximadamente, pero es activo a temperatura tan baja como 2 °C (Agrios, 1997).

Descripción Taxonómica. El **Cuadro 2** muestra la descripción taxonómica de *Geotrichum candidum*.

Cuadro 2. Descripción taxonómica de *Geotrichum candidum*.

Reino	Fungi
División	Eumycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Hyphomycetes
Orden	Hyphales(Moniliales)
Familia	Moniliaceae
Género	<i>Geotrichum</i>
Especie	<i>candidum</i>

Fuente: Agrios, 2001

Sintomatología. *Geotrichum candidum* penetra en los frutos y otros órganos comúnmente después de la cosecha, por las cicatrices presentes en el tallo, grietas de la cáscara del fruto, incisiones y pinchamientos de varios tipos. Las áreas infectadas son blandas húmedas, la pudrición avanza rápido; la cáscara del fruto se agrieta a nivel de la zona infectada y se presentan numerosas hifas blancas, en forma de espuma (Jones *et al.*, 1997). Sobre la superficie del fruto se desarrolla una capa delgada aguanosa de micelio compacto y de color crema, mientras que todo el interior del fruto se transforma en una masa aguanosa, descompuesta y de olor agrio (Mahovic *et al.*, 2002).

Enfermedades Causadas por Deuteromicetos

Son considerados hongos imperfectos u hongos asexuales, ya que carecen de estructuras o reproducción sexual y hasta el momento no se ha visto que las presenten (Agrios, 1997).

Fusarium oxysporum

Características Morfológicas. Este hongo presenta conidióforos alargados en forma de botella, con ramas a intervalos regulares o verticiladas, septados, individuales o agrupados en esporodoquios; conidios de dos tipos: microconidios elípticos o piriformes y macroconidios falcados, en forma de media luna o elípticos (Romero, 1993).

Produce los mohos amarillos o rosados de plantas de ornato y hortalizas de poscosecha, especialmente de cultivos de raíces, tubérculos y bulbos, pero las plantas de poca altura, como las cucurbitáceas y los tomates, también son afectadas. La contaminación se produce en el campo antes o durante la cosecha (Agrios, 2001).

Descripción Taxonómica. El **Cuadro 3** muestra la descripción taxonómica de *Fusarium oxysporum*.

Cuadro 3. Descripción taxonómica de *Fusarium oxysporum*.

Reino	Fungi
División	Eumycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Hyphomycetes
Orden	Hyphales(Moniliales)
Familia	Tuberculariaceae
Género	<i>Fusarium</i>
Especie	<i>oxysporum</i>

Fuente: Agrios, 2001

Sintomatología. Los tejidos afectados aparecen ligeramente húmedos y muestran un color café claro al principio, posteriormente se oscurecen. Se producen hundimientos, la cáscara del fruto se arruga y aparece sobre ella un moho color blanquizo, rosa o amarillo. En los tomates esta pudrición se desarrolla con mayor rapidez y se caracteriza por la presencia de micelio y tejidos putrefactos de color rosa (Jones *et al.*, 1997).

Alternativas para el Control de Hongos Fitopatógenos

Existen alternativas químicas para el control de éstos hongos fitopatógenos pero la aparición cada vez mayor de cepas resistentes a los fungicidas químicos ha hecho que las dosis utilizadas sean cada vez más altas, logrando con esto una mayor persistencia en el ambiente, contaminándolo y es por esto que actualmente su uso está regulado por las agencias de protección al medio ambiente y de salud pública (Cantoral, 2000).

También se encuentran las alternativas naturales en donde se utilizan extractos de plantas, de los cuales se ha probado su efecto fungicida contra fitopatógenos (Stauffer *et al.*, 2000). Algunos extractos de plantas de los que se ha probado su efecto fungicida son: de ajo (*Allium sativum L.*), cebolla (*Allium cepa L.*), tabaco (*Nicotiana tabacum L.*), semilla del paraíso (*Melia azedarach L.*) y neem (*Azadirachta indica A. Juss*) (Stauffer *et al.*, 2000; Suresh *et al.*, 1997).

Árbol del Neem (*Azadirachta indica Juss*).

Taxonomía y Descripción Botánica. El neem (*Azadirachta indica A. Juss*) es uno de los árboles más estudiados, existiendo actualmente más de 800 publicaciones a nivel mundial; es un árbol de hoja perenne, robusto, siempre verde, excepto en las áreas susceptibles a las heladas y sequías, de rápido crecimiento, corteza gruesa y copa redonda. Logra su máxima producción de frutos a los 10 años y llegan a vivir más de 100 años (Parrota y Chatuverdi, 1994; Schmid y Jöcker, 2000).

En el **Cuadro 4** se muestra la descripción taxonómica del neem.

Cuadro 4. Descripción taxonómica del neem.

Reino	Vegetal
División	Embriofitas
Subdivisión	Angiospermas
Clase	Dicotiledóneas
Orden	Geraniales
Familia	Meliáceae
Género	<i>Azadirachta</i>
Especie	<i>indica</i>

Fuente (Bailey, 1997)

Es un árbol que llega a desarrollar entre 12-20 m de alto y 18-25 cm de diámetro. El tronco es fuerte y de corteza gruesa. Las hojas son alternadas, compuestas, de 23-38 cm de largo con 7-17 folíolos, alternados u opuestos, de tallos cortos oblicuas y dentadas. Las flores son blancas, pequeñas y medianamente fragantes (Lanting y Palaypayon, 2002).

El fruto es una drupa formada por un pericarpio carnosos y una cáscara delgada la cual encierra un grano rico en aceite (Koul *et al.*, 1990); este fruto es pequeño, elipsoide, liso de 1.25 a 1.8 cm de largo, de un color verdoso-amarillo o amarillo cuando madura (**Figura 1**). Las semillas son lineales, oblongo-ovoides y en ellas se concentra entre el 30-45 % de aceite de sabor amargo e incomedible (Lanting y Palaypayon, 2002; Kumar y Parmar, 1996). El grano, que se encuentra

dentro de la semilla, es de color café y ocupa aproximadamente el 10 % del volumen total del fruto (Ambrosino *et al.*, 1999).



Figura 1. Árbol y fruto del neem (*Azadirachta indica* A. Juss)

En la India, este árbol florece de Enero al mes de Abril, y los frutos maduran entre Mayo y Agosto, los frutos empiezan a aparecer cuando el árbol alcanza una edad de cinco años. La producción de fruto por árbol es entre 37 y 50 kg por año, y de cuarenta kg de fruto fresco se producen 24 kg de fruto seco (Koul *et al.*, 1990).

Origen y Distribución del Neem. Planta originaria del sur y sureste del continente asiático, entre Indonesia e Irán. Aunque no se conoce su origen exacto, se presume que proviene de Myanmar (antes Birmania) o del sur de la India. Por introducción se encuentra hoy en día distribuido sobre todo en zonas áridas a semiáridas tropicales y subtropicales de Asia, África, América, Australia y las islas del Pacífico Sur (Pérez y Serra, 2001).

Condiciones Climáticas de Propagación. A través de la distribución natural e introducida del neem, la temperatura anual promedio varía entre 21 y 32 °C. En la India crece en las regiones con una temperatura mínima a la sombra y máxima absoluta de 0 a 49 °C. La precipitación pluvial varía dentro del rango de 450 y 1150 mm por año, aunque crece en lugares con precipitaciones anuales de 250 mm. Es utilizado en programas de reforestación en las regiones áridas y semiáridas de Andhra Pradesh., Bihar, Gujarat, Maharashtra, Rajasthan y Uttar Pradesh. Es tolerante a la mayoría de tipos de suelos, pero crece mejor en los suelos profundos, porosos y bien drenados, con un pH de 6.0 a 6,5 (Parrota y Chaturvedi, 1994).

Propiedades Físico-químicas del Aceite de Semillas de Neem. El aceite extraído de las semillas de neem es una mezcla de aceites, el cual se puede obtener por extracción al vapor, extracción con solventes y por compresión en frío. El líquido obtenido es espeso, de color café oscuro, semisólido, de sabor amargo y olor fuerte. Está compuesto principalmente de triglicéridos y algunos compuestos triterpenoides, los cuales le confieren el sabor amargo (TGA, 2001).

Usos Variados del Neem. Las propiedades médicas e insecticidas del neem son ampliamente conocidas en su lugar de origen. Además, el aceite de neem es usado en la producción de jabones (a un nivel de baja escala industrial). A principios de este siglo el árbol del neem fue introducido a muchos otros países tropicales especialmente en África. Aquí muchas de sus propiedades son aún desconocidas y este es usado muy frecuentemente como leña y árbol de sombra.

Es utilizado como árbol de reforestación, para barreras rompe-vientos y sombra, así como para la producción de madera. Ésta es dura, resistente al comején y a la pudrición. Puede ser utilizada para postes, construcciones y fabricación de muebles. Las hojas pueden ser utilizadas como abono verde para el enriquecimiento de suelos pobres. Además sirven como componente en la alimentación del ganado (13-15 % de proteínas). La pulpa del fruto puede ser utilizada en la producción de gas metano. Las semillas descascaradas contienen alrededor de 50 % de aceite, el

cual es usado para la protección de granos almacenados contra plagas y la fabricación de jabón antiséptico, pomadas, cosméticos e insecticidas (Pérez y Serra, 2001).

Compuestos Presentes en el Neem. Las plantas al interactuar con el medio ambiente, poseen una casi ilimitada habilidad para sintetizar una gran variedad de sustancias (Franca *et al.*, 2001) entre ellas las aromáticas, la mayoría de las cuales corresponden al grupo de los fenoles, o derivados de la sustitución de oxígenos en su molécula. La mayoría son metabolitos secundarios, de los que por lo menos, se han aislado 12,000. Esta cantidad es considerada menor al 10 % del total de dichos compuestos (Cowan, 1999). Los metabolitos secundarios son aquellos compuestos producidos por las plantas a partir de un metabolismo específico, teniendo como base a los metabolitos primarios; es decir, no son compuestos esenciales para los metabolismos básicos de fotosíntesis y respiración de la planta (León, 1999; Theis y Lerdau, 2003).

Los metabolitos secundarios, en algunos de los casos, sirven como mecanismo de defensa de las plantas contra el daño causado por microorganismos, insectos y herbívoros. Entre éstos compuestos, los triterpenoides proporcionan el olor; otras sustancias como quinonas y taninos son los responsables de la pigmentación de la planta (Cowan, 1999); su distribución en la naturaleza esta restringida a grupos de familias, o especies (León, 1999).

Los productos naturales o metabolitos secundarios, ya sea de microbios, plantas o animales marinos, son el resultado de presiones evolutivas para preservar y mejorar la vida de los organismos que las producen (Pérez, 2004).

Triglicéridos

Los triglicéridos son los principales constituyentes del aceite de neem. Los porcentajes de aceite en el germen de la semilla varían dependiendo del lugar y la época de la recolección. Govindachari (1992), reportó que el contenido de aceite en el germen de semillas de Neem era del 30-45 %; otros investigadores reportaron que tiene un 45 % (Kumar y Parmar, 1996). Pérez y Serra (2001), reportaron que el germen de semilla de Neem contiene aproximadamente un 50 % de aceite.

Los ácidos grasos libres representan el 20 % del peso del aceite de semillas de neem. Entre los principales ácidos grasos están el ácido palmítico, esteárico, oleico y linoleico que se han aislado en mayor proporción del aceite del neem (**Cuadro 5**), como ácidos grasos libres (Kraus, 1995). De estos ácidos, el palmítico y esteárico contienen solamente enlaces sencillos o saturados, mientras que el ácido oleico es monoinsaturado, presentando un doble enlace y el linoleico es un ácido poliinsaturado al tener en su estructura más de dos dobles enlaces (Kaushik, 2002).

Cuadro 5. Contenido de ácidos grasos presentes en el aceite de Neem

Ácidos grasos		Abdillo y Rami, 1999	Van der Nat <i>et al.</i> , 1991	Ponnad y Rao, 1981	Kumar y Parmar, 1996	Vielmeyer, 1992
Insaturados	Oleico	53 %	50-75%	50%	48.6-69.0 %	41 %
	Linoleico	11 %	-	15%	0-4.8 %	20 %
	Linolenico	-	-	-	-	1 %
Saturados	Estearico	19 %	-	-	-	20 %
	Palmítico	16 %	-	-	14.5-25.0 %	18 %

Terpenoides

La gran diversidad de compuestos de naturaleza terpénica, y de sustancias con ellos relacionadas encontrados en las plantas, es un buen ejemplo de la capacidad de síntesis de los vegetales. Se han descrito miles de estructuras terpénicas en las plantas superiores, aunque también las plantas inferiores, los animales y los organismos procariontas sintetizan terpenos.

Los compuestos que forman parte de este numeroso grupo de productos naturales pueden realizar distintas actividades biológicas, como las de atraer y repeler insectos; hormonales, inhibitoras del crecimiento; fitoalexina, como parte constituyente de moléculas transportadoras de electrones y translocadoras de restos de azúcar a través de las membranas, entre otras (Koul *et al.*, 1990; León, 1999; Kumar *et al.*, 2003).

Los terpenoides son productos naturales que se derivan del isopreno (2-metil-1,3-butadieno). Estos contienen oxígeno y varios grupos funcionales. Los terpenoides son clasificados de acuerdo al número de unidades de isopreno (**Figura 2**) que contengan en: Monoterpenoides (C_{10}), Sesquiterpenoides (C_{15}), Diterpenoides (C_{20}), Triterpenoides (C_{30}), Tetraterpenoides (C_{40}), y Politerpenos ($C_{>40}$). La mayoría de los terpenoides son cíclicos, con diversas estructuras carbonadas. Un gran número de ellas puede poseer un grupo halógeno, sulfuro y nitrógeno en su estructura (Azcon-Bieto y Talon, 1993).

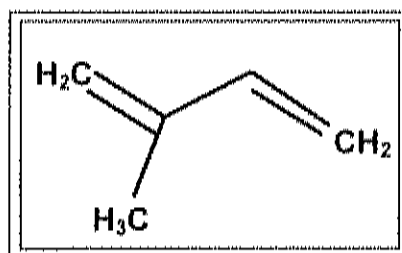


Figura 2. Estructura del isopreno

El neem posee un amplio rango de triterpenoides tales como azadiractina, nimbina, salanina, azadiractol, entre otros y una concentración de entre un 30-50 % de aceite. Estos triterpenoides son comúnmente conocidos como limonoides. La azadiractina es el limonoide más importante presente en la semilla de neem. Aun cuando se han reportado varios isómeros de la azadiractina, Aza-A a Aza-K, la

Azadiractina A es la más importante y es utilizada como un estándar para expresar la actividad de las semillas de neem, de los extractos y sus formulaciones. Mientras que el contenido de Azadiractina determina el valor de las semillas, la composición de los ácidos grasos indica la calidad de el aceite (Kaushik, 2002).

Azadiractina. Es un limonoide triterpenoide compuesto por carbono, hidrógeno y oxígeno (Johnson y Morgan, 1997). Es el principal ingrediente activo que se encuentra en el neem, el cual fue aislado e identificado por Butterworth y Morgan en 1968. Está constituida por al menos nueve isómeros estrechamente relacionados (**Figura 3**). Los tipos A y B de azadiractina son los que se presentan en mayor cantidad.

Es el compuesto activo más importante que se encuentra en el árbol de neem, sin embargo solo se hallan cantidades pequeñas de este compuesto en la semilla. La producción de azadiractina en el grano puede ser variable y depende del ecotipo de la planta, el área geográfica de origen y el ambiente (Kumar y Parmar, 1996).

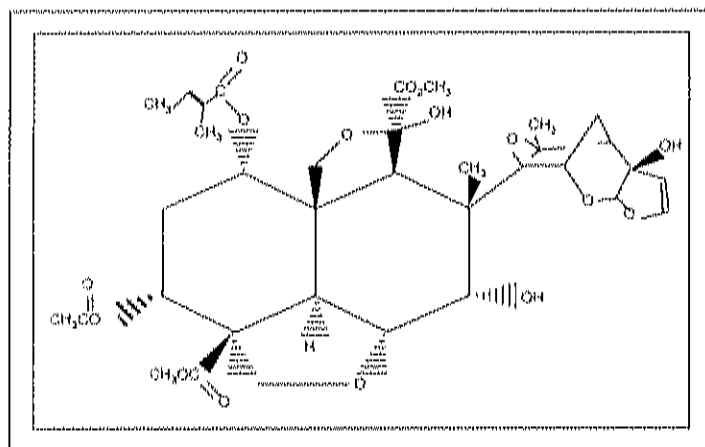


Figura 3. Fórmula estructural de Azadiractina

Salanina. Es un compuesto limonoide triterpeno (**Figura 4**), el cual se considera el segundo compuesto activo más importante que se encuentra presente en las semillas de neem. Al igual que la azadiractina, su contenido en las semillas puede variar dependiendo de las características geográficas, medio ambiente y genotipo del árbol (Kumar y Parmar, 1996).

Este compuesto limonoide actúa como agente antialimentario contra una gran variedad de insectos, tales como, *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera litura*, *Musca domestica*, *Lpetinotarsa decemlineata*, *Earias insulana* y *Trichogramma sp.* (Kumar y Parmar, 1996).

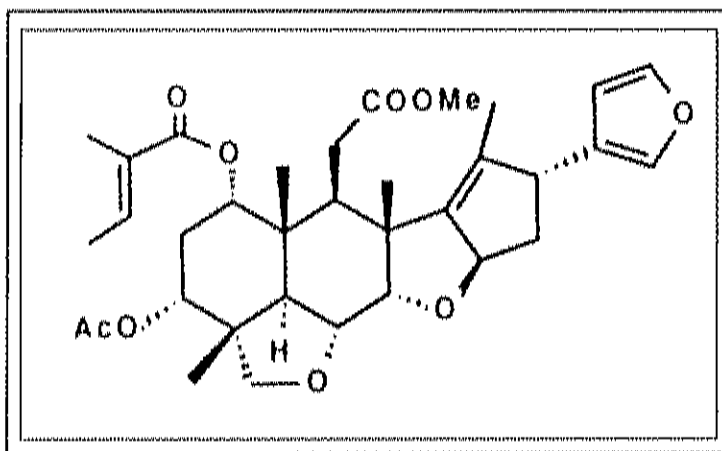


Figura 4. Fórmula estructural de Salanina

Nimbina. Fue el primer limonoide triterpenoide purificado de *A. Indica* (**Figura 5**). Se encuentra presente por todo el árbol, en semillas, raiz, tronco y hojas. Aunque es en las semillas donde se encuentra en mayor proporción.

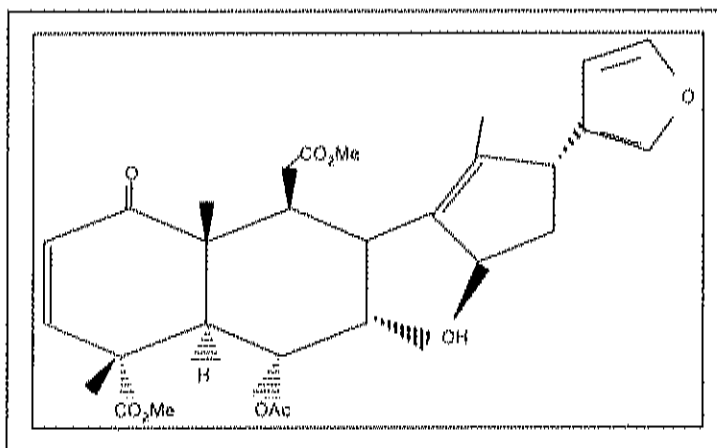


Figura 5. Fórmula estructural de Nimbina

se han realizado cientos de trabajos acerca de los compuestos con propiedades plaguicidas del árbol del neem. Además existe información relativa a la actividad antifúngica del neem, al probar extractos obtenidos del neem contra hongos patógenos de plantas y de humanos.

Zeringue y Bhatnagar (1990), realizando un bioensayo con el cultivo de algodón al cual le aplicaron esporas de *Aspergillus flavus* y posteriormente extractos acuosos de hoja de neem simultáneamente, encontraron que la producción de aflatoxinas (metabolito producido por el hongo *Aspergillus flavus*) disminuyó en un 16 %. Cuando la aplicación de extracto se inició 48 horas después de la inoculación de la espora, la disminución de la producción de aflatoxinas fué mayor del 98 %.

Suresh *et al.* (1997), demostraron que extractos metanólicos de hojas de neem lograron disminuir la esporulación de *Puccinia arachidis* (hongo fitopatógeno del cacahuate) al realizar un bioensayo sobre hojas de cacahuate. En este sentido, Govindachari *et al.* (1998), realizaron ensayos *in vitro* en donde encontraron que extractos metanólicos de semillas de neem inhibían el crecimiento de *Fusarium solani* y *Aspergillus niger*.

Olsen y Rasmusen (2001), encontraron que la combinación de un producto comercial de neem (Trilogic EC) con los fungicidas Benlate y metiltiofanato, aumentó la eficacia de éstos últimos en el control de *Sphaerotheca fuliginiea*, causante de la cenicilla en melón.

Melantriol. Actúa, al igual que la azadiractina como inhibidor de la alimentación. Hace posible que en concentrados extremadamente bajos, los insectos cesen de comer (**Figura 6**). Además actúa sobre el crecimiento de los insectos y afecta también a nematodos (Siddiqui *et al.*, 2000).

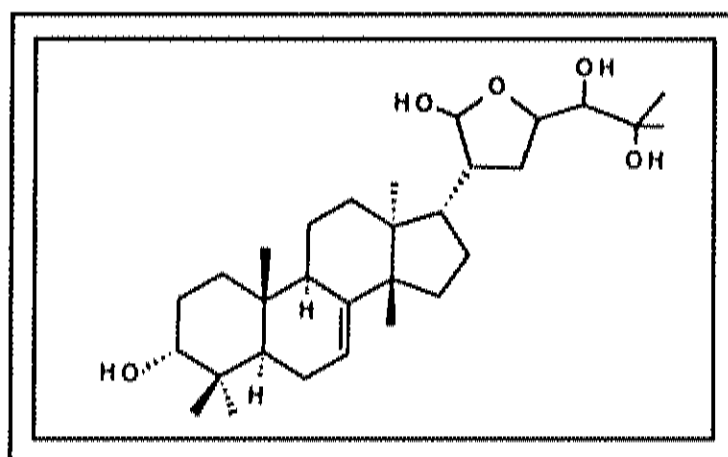


Figura 6. Fórmula estructural de Melantriol

Otros Triterpenoides Aislados del Árbol de Neem. Los compuestos azadiradiona, diacetil nimbina y epoxiazadiradiona, se aislaron del aceite de la semilla de neem (Govindanchari, 1998).

Trabajos Realizados Sobre el Efecto Antifúngico del Neem. Después de que en 1968 se aisló por primera vez la azadiractina a partir del germen de las semillas de neem,

Melantriol. Actúa, al igual que la azadiractina como inhibidor de la alimentación. Hace posible que en concentrados extremadamente bajos, los insectos cesen de comer (**Figura 6**). Además actúa sobre el crecimiento de los insectos y afecta también a nematodos (Siddiqui *et al.*, 2000).

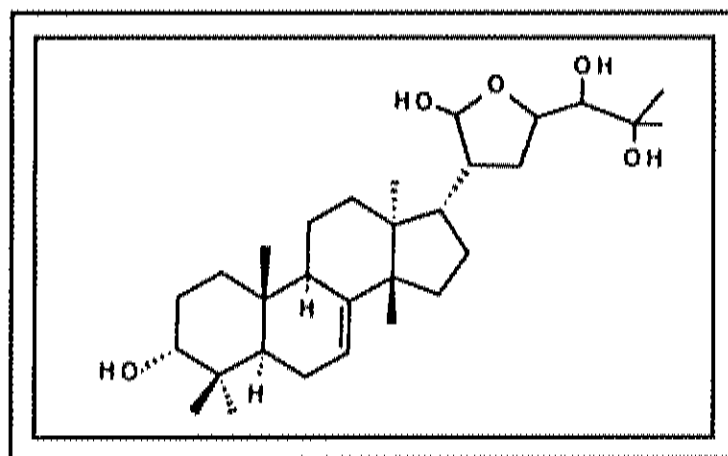


Figura 6. Fórmula estructural de Melantriol

Otros Triterpenoides Aislados del Árbol de Neem. Los compuestos azadiradiona, diacetil nimbina y epoxiazadiradiona, se aislaron del aceite de la semilla de neem (Govindachari, 1998).

Trabajos Realizados Sobre el Efecto Antifúngico del Neem. Después de que en 1968 se aisló por primera vez la azadiractina a partir del germen de las semillas de neem,

Coventry y Allan (2001), al evaluar la actividad antifúngica de un producto comercial de neem (NeemAzal), encontraron que concentraciones de 250 ppm de azadiractina preparado en etanol al 1 %, inhibieron completamente el crecimiento micelial de *Gaeumannomyces graminis tritici*. De igual forma estos mismos autores encontraron que concentraciones de 62.5 partes por millón de azadiractina, preparadas a partir del producto comercial NeemAzal (5 % de azadiractina), redujeron significativamente la germinación de conidios de *S. fuliginea* comparado con el control. La germinación para el control fue del 100 %, mientras que para el tratamiento con 62.5 partes por millón de azadiractina la germinación fue de 11 %.

Govindachari *et al.* (1998), en trabajos realizados con aceite de neem, extractos hexánicos y metanólicos, encontró que la mezcla de triterpenoides (limonoides) salanina, nimbina, azadiradiona, diacetil nimbina y epoxiazadiradiona, obtenidos del aceite de neem, mostraron efecto antifúngico en el crecimiento micelial contra *Drechslera oryzae* (70.1 % de inhibición), a una concentración de 1000 partes por millón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta y Preparación de las Semillas de Neem

Para la colecta y preparación de las semillas se siguió la metodología establecida por Jianming *et al.* (1999), la cual se describe en el siguiente párrafo.

Los frutos maduros de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) fueron recolectados de árboles de la Plazuela Rosales que se encuentra en la ciudad de Culiacán, Sinaloa, México, en la cosecha correspondiente a los meses de Junio, Julio y Agosto del 2003. Estas muestras se llevaron a las instalaciones del laboratorio de toxicología del CIAD, AC, Unidad Culiacán. Después, los frutos se remojaron para facilitar el despulpado, que se realizó de manera manual, lavando el fruto hasta dejar libre las semillas, que se colocaron seis horas bajo el sol y 15 días bajo sombra para su secado. Finalmente las semillas fueron almacenadas a 5 °C en un refrigerador convencional, que posteriormente fueron utilizadas para la extracción del material graso presente en el germen de las semillas.

Extracción del Material Graso de las Semillas de Neem

El germen de las semillas se molió en una licuadora comercial (Osterizer). Después de esto se pesaron 50 g y se colocaron en un matraz volumétrico de 250 mL, en seguida se adicionaron 200 mL de hexano. Se mezcló por 15 minutos en una placa de agitación magnética y se dejó reposar por 24 horas. Posteriormente la mezcla se filtró, para recuperar el germen de las semillas desengrasadas, por 3 ocasiones en un embudo Buchner con papel filtro Whatman No. 40, utilizando una bomba de vacío (Modelo SA55IXGTD). La pasta obtenida fue secada a temperatura ambiente por dos horas para eliminar los restos de hexano (Coventry y Allan, 2001).

Obtención de los Extractos Acetónicos, Etanólicos, Metanólicos y Hexánicos de Semillas de Neem

El extracto de las semillas fue obtenido de acuerdo a la metodología descrita por Jianming *et al.* (1999), como se describe a continuación: el germen se mezcló con 200 mL del solvente correspondiente (acetona, metanol y etanol), durante 15 minutos y se dejó reposar durante 24 horas. En seguida, la mezcla se filtró usando papel filtro Whatman No. 40; el filtrado se colocó en un frasco volumétrico para llevar a cabo la obtención del extracto por evaporación en un rotavapor (Buchi R-205, Suiza).

Evaluación en Condiciones de Laboratorio

Los microorganismos patógenos utilizados en este estudio fueron los siguientes: *Rhizopus stolonifer*, *Geotrichum candidum* y *Fusarium oxysporum*, los cuales se activaron a partir de cepas conservadas en aceite mineral del laboratorio de Fitopatología del CIAD, A.C. Unidad Culiacán. Esta activación se realizó tomando una porción de micelio del hongo, que posteriormente se colocó en el medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) acidificado con ácido láctico (Fagalab) al 80 %. Los cultivos de microorganismos fitopatógenos fueron mantenidos en el mismo medio de cultivo (PDA), al realizar transferencias semanales de porciones de micelio a medios de cultivo nuevos.

Para realizar este trabajo de investigación se hicieron 3 experimentos, en donde el experimento 1 consistió en la evaluación de las variables crecimiento micelial, esporulación y germinación de esporas para el hongo *Rhizopus stolonifer*, el experimento 2 para *Geotrichum candidum* y el experimento 3 para *Fusarium oxysporum* con las mismas variables anteriormente mencionadas.

Pruebas de Identificación de Hongos

Para la identificación de los hongos fitopatógenos poscosecha a evaluar, se realizaron observaciones de las estructuras de reproducción asexual, bajo el

microscopio, utilizando el objetivo de 40x, además se consideraron las características observadas en cuanto a forma del micelio, tamaño color y forma de esporas, así como también tamaño forma y color de la colonia en el medio de cultivo y se relacionaron con claves morfológicas para la identificación de hongos (Barnett y Hunter, 1998; Alexopoulos y Mims, 1985).

Preparación de la Mezcla de Agar Papa Dextrosa Acidificado-Extracto

Se pesaron 100 g de papa previamente lavada y pelada y se colocaron a ebullición con 600 mL de agua destilada por 5 min, filtrándose en caliente a través de una tela de organza. Se agregó agua destilada hasta completar 1000 mL, posteriormente se adicionaron 10 g de dextrosa y 20 g de agar bacteriológico. Se procedió a agitar, en una placa de agitación magnética hasta la homogenización de la mezcla. Se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 15 libras/pulgada² de presión. Posteriormente a la esterilización, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente a 45 °C, agregándose ácido láctico para inhibir el crecimiento de bacterias. Después de esto se agregó el extracto a evaluar y se procedió a vaciar en cajas petri estériles. Cada extracto se mezcló con el medio de cultivo hasta lograr las concentraciones de 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 % (v/v), para la muestra control solamente se vació a las cajas petri agar papa dextrosa (PDA) acidificado. Cada tratamiento se realizó por triplicado (Bautista *et al.*, 2000).

Preparación de la Suspensión de Esporas

Se preparó una suspensión de esporas en agua destilada estéril, de los distintos patógenos en estudio, para lo cual se tomó una porción de micelio del hongo con un asa de platino y se distribuyó en 9 mL de agua destilada estéril, agitándose en un vortex (Minishaker MS1). Una vez realizada la suspensión y para determinar la concentración de esporas obtenida, se procedió al conteo de esporas colocando una gota de la suspensión de esporas en una cámara de Neubauer. El conteo se realizó en ambos lados de la cámara, en el cuadro del centro obteniéndose un promedio de los dos conteos. La cantidad resultante del promedio se multiplica por 10,000 (French y Hebert, 1980).

Preparación de Cultivos Monospóricos

Para las evaluaciones en condiciones de laboratorio se trabajó con cultivos monospóricos, esto para asegurar la pureza del cultivo, de acuerdo a la metodología utilizada por French y Hebert, 1980, que se describe a continuación.

Se prepararon placas de agar PDA-Acidificado, para posteriormente preparar asepticamente suspensiones de esporas, siguiendo la metodología ya descrita. La concentración de esporas dependió del hongo a evaluar, esto con el propósito de obtener una concentración en donde se lograra una buena separación entre una y otra espora. Después de esto, se agregaron 100 μ L de la suspensión de esporas al centro

de la caja petri con agar PDA acidificado y utilizando perlas de vidrio se agitó la caja para asegurar una buena dispersión y separación de las esporas. Se dejó transcurrir el tiempo necesario hasta que se desarrolló ligeramente un tubo germinativo, o una ramificación micelial mayor, y así se logró la ubicación de las esporas, de tal manera que se puedan distinguir todos sus detalles y asegurarse que la colonia se origina a partir de una sola célula, con ayuda de un microscopio estereoscópico con aumentos de 80-120x. Una vez ubicada la espora o colonia monospórica y asegurándose que no había otra en su cercanía, con un asa-espátula se cortó el bloque de agar que la contenía, transfiriéndola al medio PDA acidificado.

Evaluación del Crecimiento Micelial

Discos de agar de 7 mm de diámetro conteniendo al patógeno respectivo fueron colocados en el centro de cada caja petri con el medio PDA acidificado-extracto. Las cajas se incubaron a 26 °C y se procedió a realizar evaluaciones después de 24 horas, hasta que el hongo cubrió la superficie total de la caja. Cuando la colonia del hongo cubrió toda la caja petri, se procedió a medir el radio de crecimiento, para determinar el efecto inhibitorio. Cada tratamiento se realizó por triplicado (Bautista *et al.*, 2000). Debido a las diferencias de crecimiento *Rhizopus stolonifer* se terminó de evaluar a las 48 horas, *Geotrichum candidum* a las 192 horas y *Fusarium oxysporum* a las 240 horas.

Evaluación de la esporulación

Para realizar esta evaluación se utilizaron las mismas cajas petri en donde se midió el crecimiento micelial de cada hongo en estudio, una vez que en alguno de los tratamientos la colonia del hongo cubrió toda la superficie de la caja. Las cajas petri conteniendo al hongo a evaluar, se lavaron con 10 mL de agua destilada estéril y la superficie se frotó con una varilla de vidrio, para posteriormente filtrarse a través de una tela de organza, con la finalidad de recolectar los conidios (esporas). El filtrado fue recolectado en vasos de precipitado de 100 mL. Para determinar la concentración de esporas obtenida, muestras de 0.5 mL de cada suspensión de conidios se transfirieron a una cámara de Neubauer. Se procedió al conteo de esporas, en ambos lados de la cámara, en el cuadro del centro, obteniéndose un promedio de los dos conteos. La cantidad resultante del promedio se multiplico por 10,000. Los resultados se reportaron en Esporas/mL (French y Hebert, 1980). Cada tratamiento se realizó por triplicado (Bautista *et al.*, 2000).

Evaluación de la Germinación de Esporas

Para la evaluación de la germinación de esporas, se procedió a preparar una suspensión de esporas del hongo a evaluar. Para *Rhizopus stolonifer* se preparó una suspensión de 1×10^4 , para *Geotrichum candidum* 1×10^5 y para *Fusarium oxysporum* 1×10^4 esporas/mL. La suspensión de esporas se agitó en un vortex (Minishaker MS1) y se procedió a tomar muestras de 100 μ L para *Rhizopus*

stolonifer y *Geotrichum candidum*, para *Fusarium oxysporum* se tomaron 50 μ L. Después de esto, cada muestra se agregó en el centro de una caja petri, la cual contenía el medio de cultivo PDA acidificado mezclado con el extracto y la concentración en evaluación. Posteriormente se agregaron perlas de vidrio a la caja petri y esta se agitó, para dispersar las esporas. Se incubó a 26 °C, hasta observar la presencia de esporas germinadas. Los resultados se expresaron en No. de esporas germinadas. Cada tratamiento se realizó por triplicado (Jawdah *et al.*, 2002).

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para realizar este trabajo de investigación, se hicieron 3 experimentos, en donde el experimento 1 consistió en la evaluación de *Rhizopus stolonifer*, el experimento 2 para *Geotrichum candidum* y el experimento 3 para *Fusarium oxysporum*. Las variables evaluadas para cada hongo fueron crecimiento micelial, esporulación y germinación de esporas.

En cada experimento se utilizaron los siguientes diseños:

Crecimiento Micelial

El diseño para esta fase del trabajo fue de dos factores cruzados (extracto y concentración) y un factor de medidas repetidas (tiempo), con las unidades experimentales (caja) anidadas en los factores extracto y concentración. Con los siguientes niveles para cada factor:

1.- Extracto: utilizándose los siguientes niveles:

- a) Etanólico
- b) Acetónico
- c) Metanólico
- d) Hexánico

2.- Concentración. Con los niveles:

- a) 0.0% Muestra control
- b) 0.5%
- c) 1.0%

d) 10.0%

3.- Tiempo: El tiempo de evaluación para cada hongo se realizó de la siguiente manera:

Rhizopus stolonifer: 0, 24 y 48 horas

Geotrichum candidum 0, 48 y 192 horas

Fusarium oxysporum: 0, 48 y 240 horas

Esporulación y Germinación de Esporas

En esta fase se realizó un diseño de dos factores (extracto y concentración) totalmente al azar.

1.- Extracto: Con los siguientes niveles:

- e) Etanólico
- f) Acetónico
- g) Metanólico
- h) Hexánico

2.- Concentración: Con los siguientes niveles:

- e) 0.0% Muestra control
- f) 0.5%
- g) 1.0%
- h) 10.0%

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos, siguiendo el orden de las actividades descritas en la metodología (Experimento 1, Experimento 2 y Experimento 3). En cada experimento se discute el análisis de varianza de su diseño correspondiente, posteriormente se procede a la discusión de los efectos de interacción y de los efectos principales que resultaron significativos.

Experimento 1. Efecto de los Extractos de Neem contra *Rhizopus stolonifer*.

Crecimiento Micelial

Análisis de Varianza. La tabla ANOVA para los extractos de neem contra *Rhizopus stolonifer* (**Cuadro 6**) muestra que los efectos principales de los factores extracto, concentración y tiempo, resultaron significativos, así como también las interacciones extracto-concentración, extracto-tiempo, concentración-tiempo y la interacción extracto-concentración-tiempo ($p= 0.000$).

Cuadro 6. ANOVA de extractos de neem contra crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*.

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Ex	3	2.8697	0,9566	100,78	0,000
Con	4	75.3288	18.8322	1984,00	0,000
Ti	2	100.1803	50.0902	5088,74	0,000
Caja(Ex Con)	40	0.3797	0.0095	0,96	0,540
Ex*Con	12	1,0377	0,0865	9,11	0,000
Ex*Ti	6	2.5906	0,4318	43,86	0,000
Con*Ti	8	40.0620	5.0078	508,75	0,000
Ex*Con*Ti	24	2.2829	0,0951	9,66	0,000
Error	80	0.7875	0,0098		
Total	179	225.5193			

GL= grados de libertad SS= Suma de cuadrados CM= Suma de cuadrados medios

Efectos de Interacción Triple. Para analizar la interacción triple, se construyeron gráficas de interacción doble de tiempo-concentración para cada uno de los extractos. La **Figura 7** muestra que los cuatro extractos presentaron perfiles de inhibición en el crecimiento micelial. En particular, el extracto etanólico mostró mayor inhibición y el extracto hexánico menor inhibición. Así mismo, los extractos etanólico y acetónico mostraron inhibiciones muy similares, mientras que los extractos metanólico y hexánico mostraron entre ellos, también, inhibiciones similares.

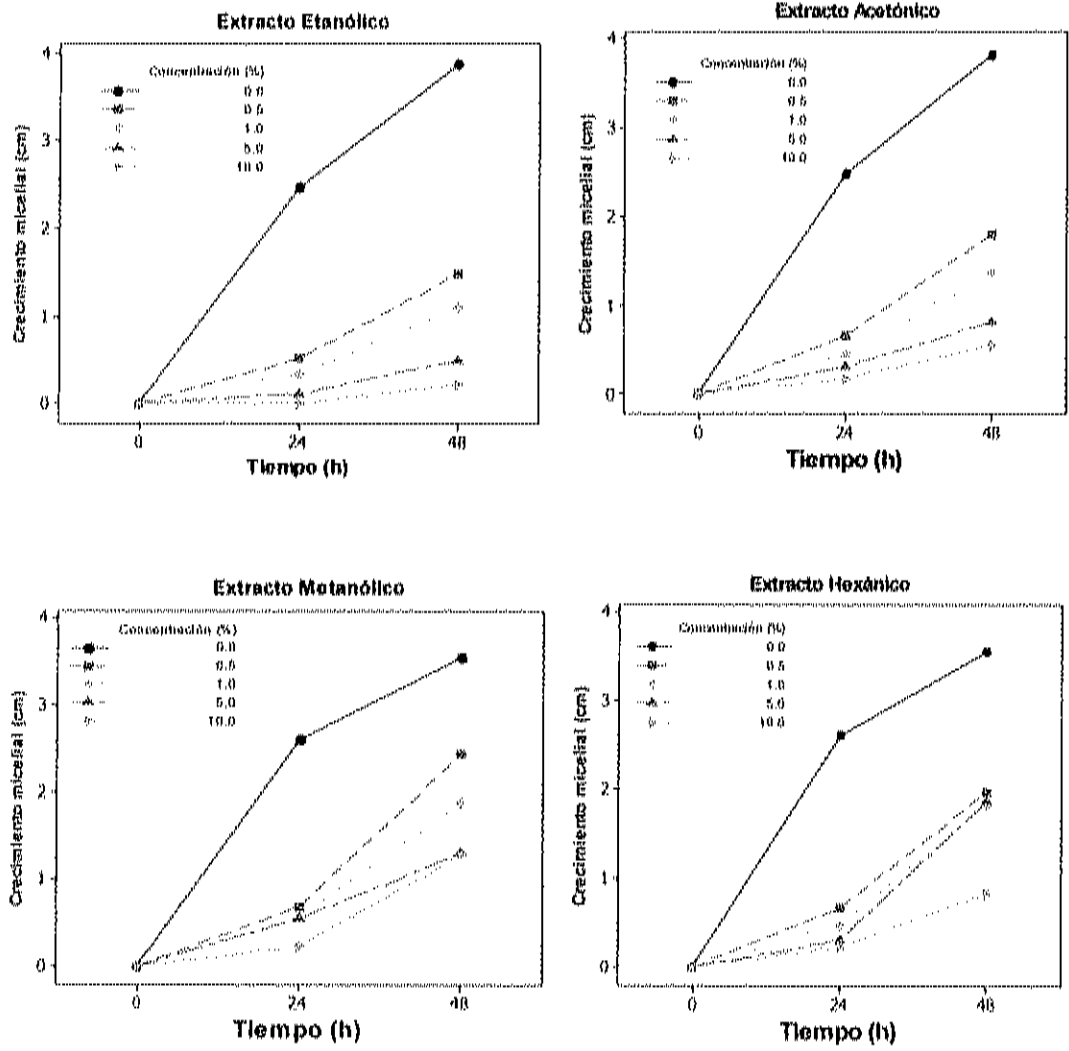


Figura 7. Efectos de interacción triple de los extractos etanólico, acetónico, metanólico y hexánico en el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*.

Al aumentar la concentración y el tiempo todos los extractos mostraron perfiles de disminución en el crecimiento micelial (mayor inhibición). De la misma **Figura 7**, puede observarse que el efecto de interacción triple está sustentado principalmente en el comportamiento de los extractos a 48 horas, debido a que a tiempos de 0 y 24 horas se observan perfiles muy similares para todos los extractos. Por la discusión anterior, dado que existen muchas comparaciones de medias de tratamientos posibles, solo se discuten los efectos de cada extracto y las concentraciones de 5 y 10 % a un tiempo de 48 horas.

Las diferencias entre las concentraciones de 5 y 10 %, para un mismo extracto, aparecen en el **Cuadro 7**.

Cuadro 7. Diferencias entre las concentraciones de 5 y 10 %, a 48 horas de evaluación, para un mismo extracto.

Concentración	Etanólico	Acetónico	Metanólico	Hexánico
5 %	(0.4886) a	(0.8106) b	(1.3160) c	(1.8630) d
10 %	(0.2163) a	(0.5440) b	(1.2830) c	(0.8333) e

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas

La muestra control fue diferente de todas las concentraciones evaluadas ($p=0.000$). Solamente el extracto hexánico mostró diferencias significativas de la concentración 5 % a la concentración de 10 % ($p=0.000$).

Las diferencias entre extractos, para cada una de las concentraciones de 5 y 10 %, a 48 horas de evaluación aparecen en el **Cuadro 8**.

Cuadro 8. Diferencias entre extractos para las concentraciones de 5 y 10 % a 48 horas de evaluación.

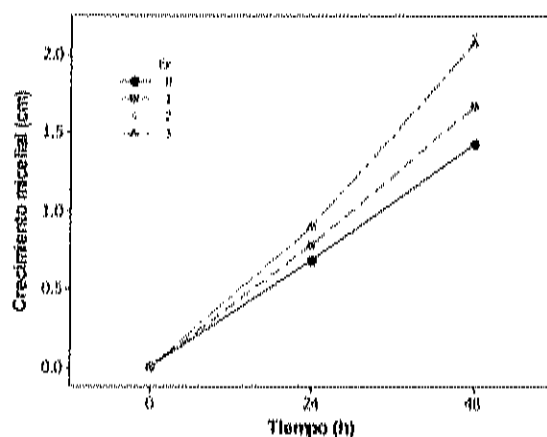
Extracto	5 %	10 %
Etanólico	(0.4886) a	(0.2163) d
Acetónico	(0.8106) a	(0.5440) de
Metanólico	(1.3160) b	(1.2830) f
Hexánico	(1.8630) c	(0.8333) ge

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas

Al realizar la comparación de medias por la prueba de Tukey, se encontró que para la concentración del 5 %, los extractos metanólico y hexánico, mostraron diferencias significativas entre ellos y con los extractos etanólico y acetónico ($p=0.000$). Para la concentración del 10 %, el extracto etanólico, mostró diferencias significativas con los extractos metanólico y hexánico. También el extracto acetónico mostró diferencias con el extracto metanólico ($p=0.000$).

Efectos de Interacción Doble. Con respecto a la interacción extracto-tiempo, en la **Figura 8** se observan perfiles similares entre los extractos al tiempo 0 y 24 horas, pero a 48 horas se observa un perfil distinto, por lo que el efecto de interacción se debe principalmente al comportamiento de los extractos a 48 horas.

Por la discusión anterior y dado que existen muchas comparaciones de medias de tratamientos posibles, solo se discuten los efectos de cada extracto y las concentraciones de la muestra control, del 5 y 10 %, a un tiempo de 48 horas.



Extractos: 1=Etanólico, 2= Acetónico, 3=Metanólico y 4=Hexánico

Figura 8. Efectos de interacción doble extracto-tiempo del crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*.

Las diferencias entre tiempos para cada extracto, aparecen en el **Cuadro 9**.

Cuadro 9. Diferencias entre tiempo para cada extracto de crecimiento micelial contra *Rhizopus stolonifer*.

Extracto	Tiempo		
	0	24	48
Etanólico	0 a	0.683 b	1.429 c
Acetónico	0 a	0.783 bd	1.671 f
Metanólico	0 a	0.906 c	2.121 g
Hexánico	0 a	0.889 cd	2.074 g

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas.

Los extractos etanólico y metanólico mostraron diferencias significativas a 24 horas ($p=0.000$). De igual manera, los extractos etanólico y acetónico (**Figura 8**) mostraron diferencias significativas con todos los demás extractos y entre ellos ($p=0.000$). Los extractos metanólico y hexánico, no mostraron diferencias significativas ($p=0.9738$) a 48 horas.

De la interacción concentración-tiempo, la **Figura 9** muestra que al aumentar la concentración disminuye el crecimiento micelial, implicando mayor inhibición. La interacción se explica principalmente por la muestra control y a las diferencias entre el tiempo 0 y 48 horas.

Por la discusión anterior y dado que existen muchas comparaciones de medias de tratamientos posibles, solo se discuten los efectos de cada extracto y las concentraciones de la muestra control, del 5 y 10 %, a un tiempo de 48 horas.

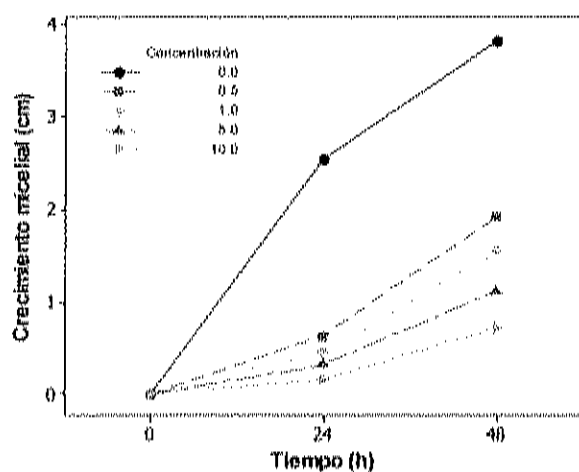


Figura 9. Efectos de interacción concentración-tiempo del crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*.

Las diferencias entre tiempos para cada concentración del crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* aparecen en el **Cuadro 10**.

Cuadro 10. Diferencias entre tiempo para cada concentración del crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*.

Concentración (%)	Tiempo (h)		
	0	24	48
0	0 a	2.5410 b	3.8166 f
0.5	0 a	0.6288 c	1.9226 g
1.0	0 a	0.4516 d	1.5466 h
5.0	0 a	0.3120 d	1.1155 i
10.0	0 a	0.1553 e	0.7193 j

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas

La comparación de medias, mediante la prueba de Tukey para la interacción concentración-tiempo (**Cuadro 10**), muestra que todas las concentraciones en estudio (**Figura 9**), resultaron con diferencias significativas a 48 horas ($p=0.000$).

El extracto etanólico, fue el mejor tratamiento desde la concentración del 5 %, la que no mostró diferencias con la concentración del 10 %. Este extracto logró inhibir el 94,4 % del crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* a la concentración del 10 %. Esto puede ser debido al mayor contenido de limonoides que posee el extracto etanólico. El extracto acetónico mostró también un buen efecto al inhibir 85,9 % del crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* a una concentración del 10 % y 48 horas.

López (2003), al determinar el contenido de limonoides en diferentes tipos de extractos de neem, encontró que el extracto etanólico contiene una mayor cantidad de limonoides. Estos resultados coinciden con trabajos realizados por Schmutterer y

Ascher (1983), en donde el extracto etanólico muestra mayor contenido de limonoides, seguido del extracto metanólico,

Govindachari *et al.* (1998), en trabajos realizados con aceite de neem, extractos hexánicos y metanólicos, encontró que la mezcla de triterpenoides (limonoides) salanina, nimbina, azadiradiona, diacetil nimbina y epoxiazadiradiona, obtenidos del aceite de neem, mostraron efecto antifúngico en el crecimiento micelial contra *Drechslera oryzae* (70.1 % de inhibición), a una concentración de 1000 partes por millón. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Govindachari *et al.* (1998), ya que encontraron que el aceite de neem posee compuestos, como los triterpenoides que poseen efecto antifúngico, ya que inhibieron el crecimiento de *Drechslera oryzae*. En nuestros resultados, el extracto etanólico de neem también mostró efecto antifúngico, al lograr mayor inhibición del crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* que los demás extractos en estudio.

Efectos Principales. La **Figura 10**, muestra que los extractos metanólico y hexánico presentan diferencias de los extractos etanólico y acetónico.

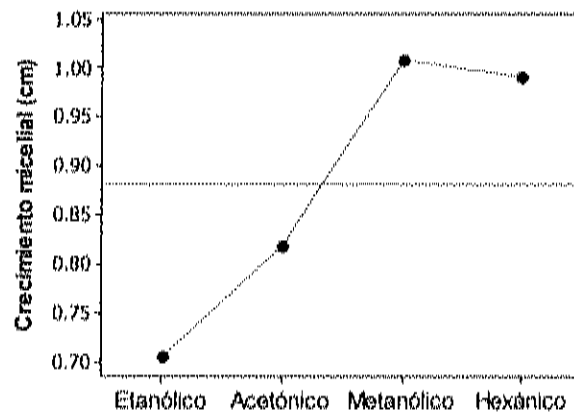


Figura 10. Efecto principal del factor extracto en el crecimiento micelial contra *Rhizopus stolonifer*.

Las diferencias entre extractos del crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* aparecen en el **Cuadro 11**.

Cuadro 11. Diferencias entre extractos en el crecimiento micelial contra *Rhizopus stolonifer*.

Extracto	Promedio de medias
Etanólico	(0.704) a
Acetónico	(0.818) b
Metanólico	(1.009) cd
Hexánico	(0.990) d

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas

La comparación de medias por la prueba de Tukey (**Cuadro 11**), muestra que los extractos etanólico, acetónico y metanólico fueron estadísticamente diferentes entre ellos ($p=0.000$).

Con respecto al efecto principal concentración de la **Figura 11**, podemos observar diferencias entre la muestra control y las demás concentraciones.

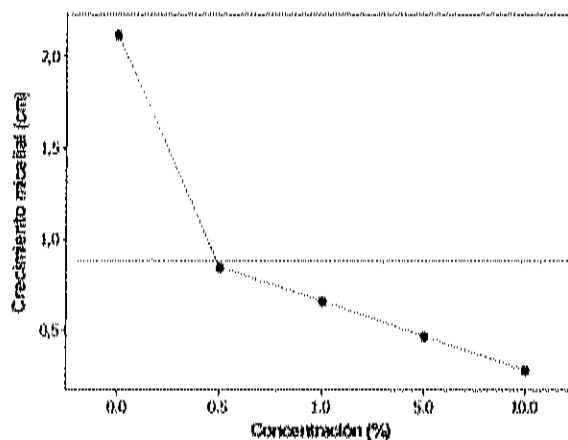


Figura 11. Efecto principal del factor concentración en el crecimiento micelial contra *Rhizopus stolonifer*.

Las diferencias entre concentraciones del crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* aparecen en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Diferencias entre concentraciones del crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*.

Concentración (%)	Promedio de medias
0	(2.119) a
0.5	(0.850) b
1.0	(0.666) c
5	(0.475) d
10	(0.291) e

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas

Al realizar la comparación de medias por la prueba de Tukey (Cuadro 12), se encontraron diferencias significativas entre las cinco concentraciones ($p=0.000$) (Figura 11).

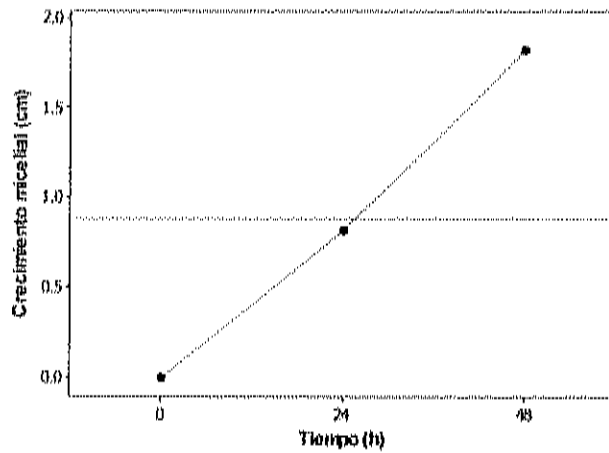


Figura 12. Efecto principal del factor tiempo en el crecimiento micelial contra *Rhizopus stolonifer*.

Las diferencias entre tiempos del crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* aparecen en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Diferencias entre tiempos en el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*.

Tiempo (h)	Promedio de medias
0	(0.0) a
24	(0.817) b
48	(1.824) c

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas

Al realizar la comparación de medias, mediante la prueba de Tukey, se encontraron diferencias estadísticas entre los tres tiempos ($p=0.000$) (Figura 12).

Esporulación

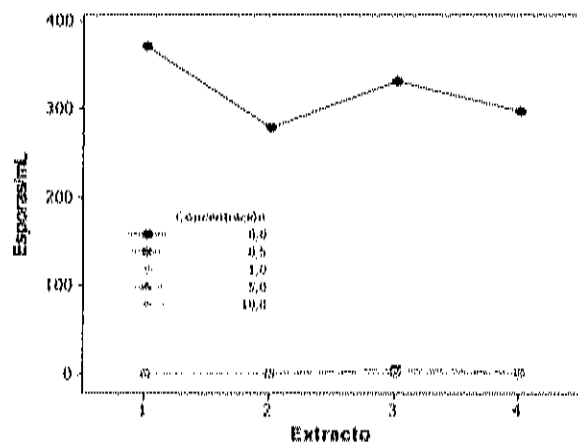
Análisis de Varianza. En la tabla ANOVA para los extractos de neem, el efecto de la esporulación de *Rhizopus stolonifer* (**Cuadro 14**), muestra que el factor concentración resultó significativo ($p=0.000$). La interacción extracto-concentración también resultó significativa ($p=0.031$).

Cuadro 14. ANOVA de extractos de neem contra esporulación de *Rhizopus stolonifer*.

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Extracto	3	2961	987	2.22	0.101
Con	4	981029	245257	552.03	0.000
Extracto*Con	12	11722	977	2.20	0.031
Error	40	17771	444		
Total	59	1013483			

GL= grados de libertad SS= Suma de cuadrados CM= Suma de cuadrados medios

Efectos de Interacción Doble. Se puede observar en la **Figura 13**, que todos los extractos mostraron perfiles muy similares a todas las concentraciones en estudio. Puede observarse que el efecto de interacción doble está sustentado solamente en el comportamiento de la muestra control. Todos los extractos mostraron más del 95 % de inhibición en la esporulación. Este comportamiento de *Rhizopus stolonifer* se debe a que todos los extractos inhibieron el crecimiento micelial de este hongo en diferentes porcentajes; si el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* se disminuye o inhibe, también se disminuirá la producción de esporas (Romero, 1993; Agrios, 2001).



Extractos: 1=Etanólico, 2= Acetónico, 3=Metanólico y 4=Hexánico

Figura 13. Efectos de interacción doble de la esporulación de *Rhizopus stolonifer*.

Las diferencias entre concentraciones para un mismo extracto en la esporulación de *Rhizopus stolonifer*, aparecen en el **Cuadro 15**.

Cuadro 15. Diferencias entre concentraciones para un mismo extracto en la esporulación de *Rhizopus stolonifer*.

Concentración(%)	Extractos			
	Etanólico	Acetónico	Metanólico	Hexánico
0	a	c	e	g
0.5	b	d	f	h
1.0	b	d	f	h
5.0	b	d	f	h
10.0	b	d	f	h

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas.

Al realizar la comparación de medias por la prueba de Tukey (**Cuadro 15**), todos los extractos a la concentración de la muestra control mostraron diferencias significativas, con las concentraciones de 0.5, 1.0, 5 y 10 % ($p=0.000$). Los cuatro extractos a las concentraciones de 0.5, 1.0, 5 y 10 %, no mostraron diferencias significativas ($p=1.000$).

Efectos Principales. La **Figura 14** del efecto principal concentración, muestra que la diferencia se encuentra en la muestra control.

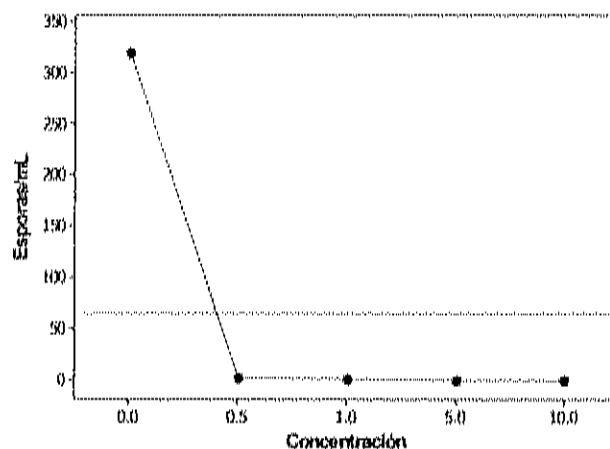


Figura 14. Efecto principal del factor concentración en la esporulación de *Rhizopus stolonifer*.

Las diferencias entre concentraciones en la esporulación de *Rhizopus stolonifer*, aparecen en el **Cuadro 16**.

Cuadro 16. Diferencias entre cada una de las concentraciones de la esporulación de *Rhizopus stolonifer*.

Concentración(%)	Promedio de medias
0	(320.417) a
0.5	(2.166) b
1.0	(0.75) b
5.0	(0.083) b
10.0	(0.0) b

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas.

Al realizar la comparación de medias por la prueba de Tukey (**Cuadro 16**), la concentración de la muestra control (**Figura 11**) mostró diferencias significativas entre todas las concentraciones en estudio ($p=0.000$).

Germinación de Esporas

Análisis de Varianza. La tabla ANOVA para los extractos de neem en el efecto de la germinación de *Rhizopus stolonifer* (**Cuadro 17**), muestra que los factores extracto y concentración resultaron significativos ($p=0.000$). La interacción extracto-concentración también resultó significativa ($p=0.001$).

Cuadro 17. ANOVA de extractos de neem contra germinación de esporas de *Rhizopus stolonifer*.

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Extracto	3	7953.33	2651.11	40.05	0.000
Conc	4	2246.10	561.53	8.48	0.000
Extracto*Conc	12	3137.50	261.46	3.95	0.001
Error	40	2648.00	66.20		

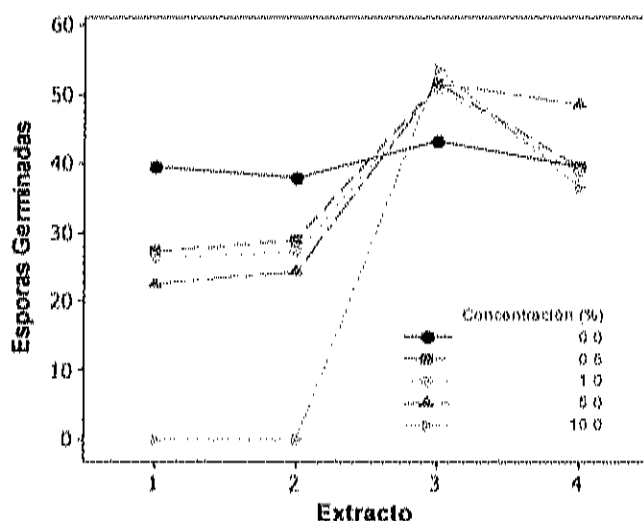
Total 59 15984.93

GL= grados de libertad SS= Suma de cuadrados CM= Suma de cuadrados medios

Efectos de Interacción Doble. La **Figura 15**, muestra que los extractos etanólico y acetónico presentaron perfiles similares en la inhibición de germinación de esporas, mostrando mejor efecto inhibitorio que los extractos metanólico y hexánico. Los extractos metanólico y hexánico, presentaron perfiles diferentes de inhibición en la germinación de esporas, entre ellos y también entre los extractos etanólico y acetónico. Al aumentar la concentración, solamente los extractos etanólico y acetónico mostraron disminución en la germinación de esporas, ya que la concentración de 10 % de ambos extractos, inhibieron completamente la germinación de esporas de *Rhizopus stolonifer*.

De la misma figura puede observarse que el efecto de interacción doble esta sustentado principalmente en la concentración de la muestra control y la concentración de 5 y 10 %.

Los extractos metanólico y hexánico, presentaron menor inhibición en la germinación de esporas a todas las concentraciones en estudio (**Figura 15**).



Extractos: 1=Etanólico, 2= Acetónico, 3=Metanólico y 4=Hexánico

Figura 15. Efectos de interacción doble de esporas germinadas de *Rhizopus stolonifer*.

Las diferencias entre concentraciones de 5 y 10 % para un mismo extracto de germinación de esporas de *Rhizopus stolonifer*, aparecen en el Cuadro 18.

Cuadro 18 Diferencias entre las concentraciones de 5 y 10 % para un mismo extracto de germinación de esporas para *Rhizopus stolonifer*.

Concentración(%)	Extractos			
	Etanólico	Acetónico	Metanólico	Hexánico
5.0	(22.667) a	(24.333) b	(51.666) c	(48.667) d
10.0	(0.000) a	(0.000) b	(53.666) c	(36.667) d

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas.

Las diferencias entre extractos para las concentraciones de 5 y 10 % de germinación de esporas para *Rhizopus stolonifer*, aparecen en el Cuadro 19.

Cuadro 19. Diferencias entre extractos para las concentraciones de 5 y 10 % de germinación de esporas para *Rhizopus stolonifer*.

Extracto	Concentraciones (%)	
	5	10
Etanólico	(22.667) a	(0.000) e
Acetónico	(24.333) ab	(0.000) e
Metanólico	(51.666) cd	(53.666) f
Hexánico	(48.667) db	(36.667) f

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas

Al realizar la comparación de medias por la Prueba de Tukey, ninguno de los extractos mostró diferencias significativas de la concentración de 5 % a la concentración de 10 % ($p=0.000$) (Cuadro 19).

Con respecto a la concentración de 5 % para cada extracto el extracto etanólico presentó diferencias con los extractos metanólico ($p=0.0108$) y hexánico ($p=0.0364$), además el extracto acetónico también fue diferente del metanólico ($p=0.021$). Para la concentración del 10 % los extractos etanólico y acetónico, mostraron diferencias de los extractos metanólico y hexánico ($p=0.000$) (Cuadro 19).

Los extractos etanólico y acetónico, mostraron mayor inhibición en la germinación de esporas que los extractos metanólicos y hexánicos, ya que la

concentración del 10 % de ambos extractos inhibió completamente la germinación de esporas de *Rhizopus stolonifer*.

Aún cuando el extracto etanólico posee mayor concentración de limonoides que los extractos acetónico y metanólico, estos resultados pueden deberse a que la proporción de limonoides con efecto antifúngico, sea la misma en los extractos etanólico y acetónico, ya que ambos extractos presentaron resultados similares. López (2003), al determinar la concentración de limonoides en distintos extractos de neem, reportó que el extracto etanólico contiene mayor cantidad de limonoides que el extracto metanólico y acetónico.

Los extractos metanólico y hexánico, mostraron menor inhibición que los extractos etanólico y acetónico. Govindachari *et al.* (1998), en trabajos realizados con aceite, extracto hexánico y metanólico de neem, encontraron que el extracto hexánico aceleró el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. Este efecto lo atribuyen a que los extractos de hexano contienen sustancias no-polares como grasas y ácidos grasos, los cuales son utilizados como fuente de carbono, logrando estimular el crecimiento fúngico. En este trabajo se encontraron resultados similares con el nuestro ya que el extracto metanólico presentó mayor germinación de *Rhizopus stolonifer* que la muestra control a todas las concentraciones y el extracto hexánico mostró el mismo comportamiento a la concentración de 5 %, lo que indica que estos extractos poseen algunos componentes que fueron utilizados como nutrientes por *Rhizopus stolonifer* y esto favoreció la

germinación.

De acuerdo a estudios realizados con un producto comercial de neem (Neemazal), Singh y Prithiviraj (1997), encontraron que concentraciones de 100 partes por millón de este producto, redujeron la formación de tubos germinativos de *Erysiphe pisi*. En la muestra control el 85.8 % de conidios formaron tubos germinativos después de 48 horas de la inoculación, mientras que solamente el 3.6 % de los conidios del tratamiento formaron tubos germinativos. Nuestros resultados son congruentes con los de Singh y Prithiviraj, ya que estos autores, demostraron que el producto comercial de neem, el Neemazal, inhibe la germinación del hongo fitopatógeno *Erysiphe pisi*.

Al realizar la comparación de medias por la Prueba de Tukey (**Cuadro 20**), los extractos metanólico y hexánico fueron diferentes a los extractos etanólico y hexánicos y entre ellos ($p=0.000$) (**Figura 16**).

El efecto principal concentración (**Figura 17**), muestra que la diferencia se encuentra principalmente entre la muestra control y la concentración del 10 %.

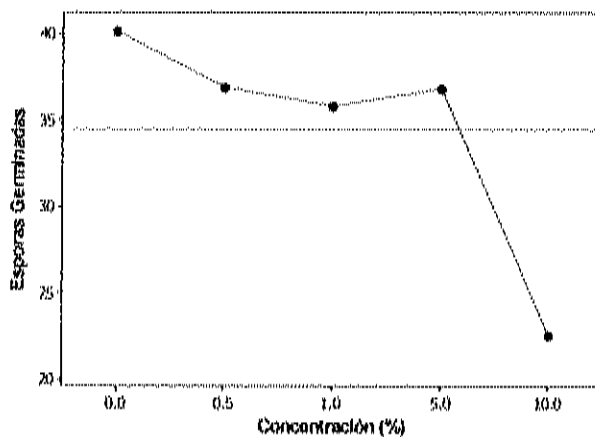


Figura 17. Efectos principales del factor concentración de esporas germinadas para *Rhizopus stolonifer*.

Las diferencias entre concentraciones en la germinación de *Rhizopus stolonifer*, aparecen en el **Cuadro 21**.

Cuadro 21. Diferencias entre cada una de las concentraciones de la germinación de *Rhizopus stolonifer*.

Concentración (%)	Promedio de medias
0	(40.166) a
0.5	(36.916) a
1.0	(35.833) a
5.0	(36.833) ab
10.0	(22.583) b

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas.

Al realizar la comparación de medias por la Prueba de Tukey (Cuadro 21) solamente la muestra control y la concentración del 10 %, mostraron diferencias significativas ($p=0.000$) (Figura 17).

Experimento 2. Efecto de los Extractos de Neem contra *Geotrichum candidum*.

Crecimiento Micelial

Análisis de Varianza. La tabla ANOVA para los extractos de neem contra *Geotrichum candidum* (Cuadro 22) muestra que los efectos de los factores extracto, concentración y tiempo, resultaron significativos ($p=0.000$), así como también las interacciones extracto-concentración, extracto-tiempo, concentración-tiempo y la interacción extracto-concentración-tiempo ($p=0.000$).

Cuadro 22. ANOVA de extractos de neem contra crecimiento micelial de *Geotrichum candidum*.

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Ex	3	0.53528	0.17843	50.85	0.000
Con	4	1.92041	0.48010	136.83	0.000
Ex*Con	12	1.04777	0.08731	24.88	0.000
Caja(Ex Con)	40	0.14035	0.00351	1.14	0.306
Ti	2	64.13540	32.06770	10412.59	0.000
Ex*Ti	6	0.36664	0.06111	19.84	0.000
Con*Ti	8	1.15849	0.14481	47.02	0.000
Ex*Con*Ti	24	0.77117	0.03213	10.43	0.000
Error	80	0.24638	0.00308		
Total	179	70.32189			

GL= grados de libertad SS= Suma de cuadrados CM= Suma de cuadrados medios

Efectos de Interacción Triple. Para analizar la interacción triple se construyeron gráficas de interacción doble de los factores extracto y concentración para cada uno de los extractos (**Figura 18**).

La **Figura 18** muestra que los extractos etanólico y acetónico presentaron perfiles de inhibición similares. Sin embargo podemos observar que los extractos metanólico y hexánico mostraron un comportamiento diferente a los extractos etanólico y acetónico, al mostrar un perfil de inhibición irregular. El extracto etanólico mostró mayor inhibición y el extracto metanólico menor inhibición.

Al aumentar la concentración y el tiempo, solamente los extractos etanólico y acetónico mostraron disminución en el crecimiento micelial (mayor inhibición) a todas las concentraciones. Por otra parte el extracto metanólico, a las concentraciones de 5 y 10 % muestra mayor crecimiento micelial que a las concentraciones de 0.5 y 1.0 %. El extracto hexánico no mostró perfil de inhibición al aumentar la concentración. De la **Figura 18**, puede observarse que el efecto de interacción triple esta sustentado principalmente en el comportamiento de los extractos a 192 horas, debido a que a tiempos de 0 y 24 horas se observan perfiles muy similares para todos los extractos.

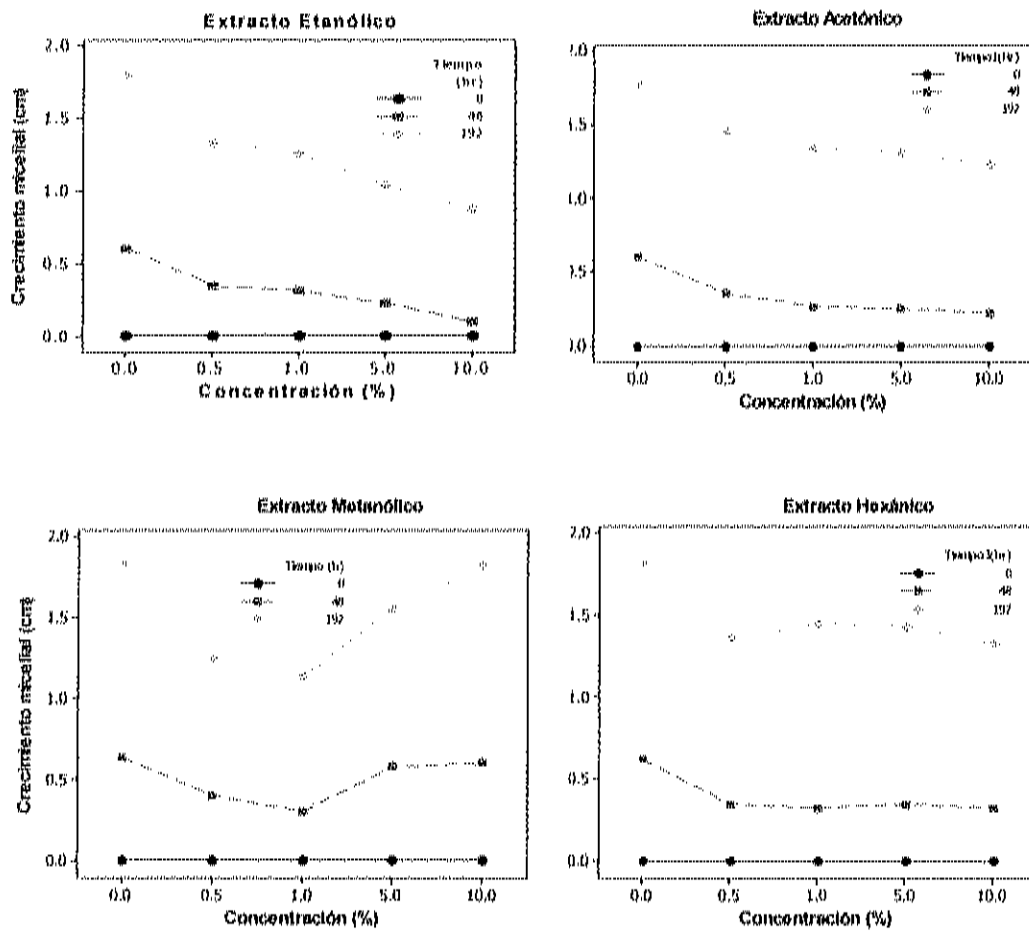


Figura 18. Efectos de interacción triple de los extractos etanólico, acetónico, metanólico y hexánico en el crecimiento micelial de *Geotrichum candidum*.

Por la discusión anterior y dado que existen muchas comparaciones de medias de tratamientos posibles, solo se discuten los efectos de cada extracto y las concentraciones de 5 y 10 % a un tiempo de 192 horas.

Las diferencias entre las concentraciones de 5 y 10 %, para un mismo extracto del crecimiento micelial de *Geotrichum candidum*, aparecen en el **Cuadro 23**.

Cuadro 23. Diferencias entre las concentraciones de 5 y 10 %, a 192 horas de evaluación, para un mismo extracto en el crecimiento micelial de *Geotrichum candidum*.

Concentración	Etanólico	Acetónico	Metanólico	Hexánico
5 %	(1.033) a	(1.311) b	(1.553) c	(1.422) e
10 %	(0.866) a	(1.221) b	(1.821) d	(1.322) e

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas

Al realizar la comparación de medias por la Prueba de Tukey (**Cuadro 23**), ninguno de los extractos mostró diferencias significativas de la concentración de 5 % a la concentración de 10 %.

Las diferencias entre extractos, para cada una de las concentraciones de 5% y 10 %, a 48 horas de evaluación aparecen en el **Cuadro 24**.

Cuadro 24. Diferencias entre extractos para las concentraciones de 5 y 10 % a 192 horas de evaluación del crecimiento micelial de *Geotrichum candidum*.

Extracto	5 %		10 %	
Etanólico	(1.033)	a	(0.860)	d
Acetónico	(1.311)	b	(1.221)	e
Metanólico	(1.553)	c	(1.821)	f
Hexánico	(1.422)	bc	(1.322)	e

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas

La prueba de Tukey para las concentraciones de 5 y 10 % para cada extracto (**Cuadro 24**), muestra que para la concentración de 5 %, el extracto etanólico presentó diferencias con los extractos acetónico, metanólico y hexánico ($p=0.000$). El extracto acetónico también fue diferente del extracto metanólico ($p=0.001$). Para la concentración del 10 %, el extracto etanólico, mostró diferencias con los tres extractos restantes y el extracto acetónico mostró diferencias con el extracto metanólico ($p=0.000$) (**Figura 18**).

Efectos de Interacción Doble. El efecto de interacción extracto-concentración, en la **Figura 19**, muestra que los cuatro extractos presentaron perfiles de inhibición diferentes. Particularmente el extracto etanólico presentó mayor inhibición de crecimiento micelial, y el extracto metanólico menor inhibición. Al aumentar la concentración, solamente los extractos etanólico y acetónico mostraron perfiles de disminución en el crecimiento micelial (mayor inhibición), por lo que el efecto de interacción esta sustentada en los dos factores. La concentración del 10 %, mostró la máxima inhibición del crecimiento en los extractos etanólico, acetónico y hexánico. No sucedió lo mismo con el extracto metanólico, donde esta concentración tubo el mismo crecimiento que la muestra control.

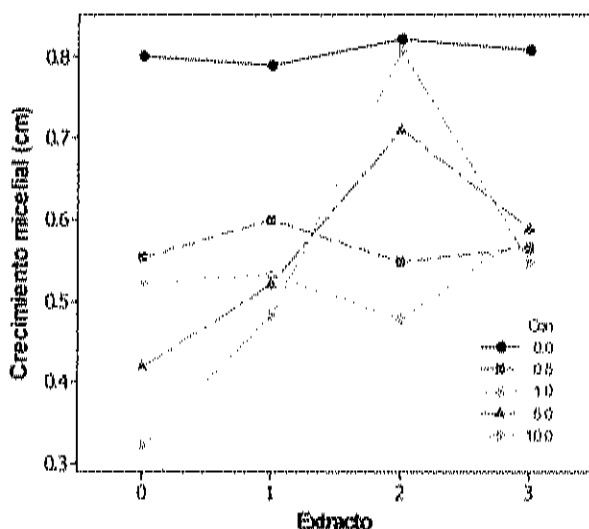


Figura 19. Efectos de interacción extracto-concentración del crecimiento micelial de *Geotrichum candidum*, en donde para los extractos 0=Etanólico, 1=Acetónico, 2=Metanólico y 3=Hexánico

Las diferencias entre concentraciones para un mismo extracto del crecimiento micelial de *Geotrichum candidum* aparecen en el Cuadro 25.

Cuadro 25. Diferencias entre concentraciones para un mismo extracto del crecimiento micelial de *Geotrichum candidum*.

Concentración(%)	Extractos			
	Etanólico	Acetónico	Metanólico	Hexánico
0	(0.800) a	(0.788) e	(0.822) h	(0.809) l
0.5	(0.553) b	(0.599) f	(0.548) ij	(0.566) m
1.0	(0.521) b	(0.532) fg	(0.477) j	(0.588) m
5.0	(0.418) c	(0.520) fg	(0.710) k	(0.588) m
10.0	(0.322) d	(0.482) g	(0.820) h	(0.548) m

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas.

Al realizar de comparación de medias por la prueba de Tukey, en el Cuadro 25 se observa que la concentración de la muestra control resultó diferente de casi todas las concentraciones en cada extracto ($p=0.000$), excepto para la concentración del 10 % del extracto metanólico. También podemos observar que de la concentración 5 % a la del 10 % solamente los extractos etanólico y metanólico mostraron diferencias significativas.

Para la interacción extracto tiempo, en la **Figura 20**, se observa que la interacción esta sustentada principalmente al tiempo 192 horas, ya que al tiempo 0 y 48 horas se observa un comportamiento similar.

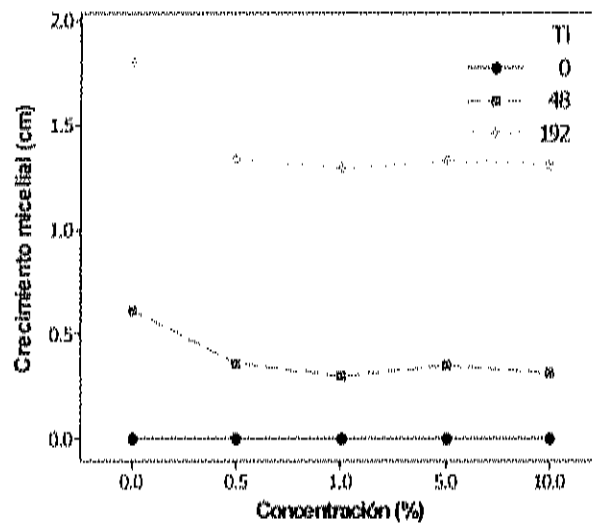


Figura 20. Efectos de interacción concentración-tiempo en el crecimiento micelial de *Geotrichum candidum*.

Las diferencias entre tiempos para cada concentración del crecimiento micelial de *Geotrichum candidum* aparecen en el **Cuadro 26**.

Cuadro 26. Diferencias entre tiempo para cada concentración del crecimiento micelial de *Geotrichum candidum*.

Concentración (%)	Tiempo (h)		
	0	48	192
0	0 a	(0.612) b	(1.802) d
0.5	0 a	(0.360) c	(1.340) e
1.0	0 a	(0.298) c	(1.291) e
5.0	0 a	(0.348) c	(1.329) e
10.0	0 a	(0.311) c	(1.3079) e

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas

La prueba de Tukey (**Cuadro 26**), muestra diferencias significativas entre la muestra control y todas las concentraciones en estudio al tiempo de 48 y 192 horas, aunque de manera práctica estas diferencias no se consideren significativas.

La interacción concentración-tiempo, de la **Figura 21**, muestra perfiles similares de inhibición a tiempo 0 y 48 horas, observándose mayor variabilidad a tiempo de 192 horas, por lo que el efecto de interacción doble esta sustentado principalmente en el comportamiento de los extractos a 192 horas. La concentración del 10 % a un tiempo de 192 horas, mostró mayor inhibición del crecimiento micelial de *Geotrichum candidum*.

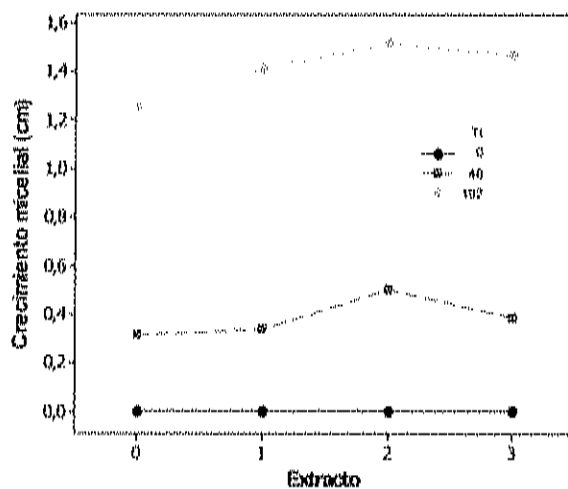


Figura 21. Efectos de interacción extracto-tiempo en el crecimiento micelial de *Geotrichum candidum*.

Las diferencias entre tiempos para un cada extracto en el crecimiento micelial de *Geotrichum candidum* aparecen en el Cuadro 27.

Cuadro 27. Diferencias entre tiempo para cada extracto en el crecimiento micelial de *Geotrichum candidum*.

Extracto	Tiempo (h)		
	0	48	192
Etanólico	0 a	(0.314) b	(1.254) c
Acetónico	0 a	(0.338) b	(1.415) f
Metanólico	0 a	(0.502) b	(1.517) g
Hexánico	0 a	(0.389) b	(1.470) fg

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas

Al realizar la comparación de medias de la interacción extracto-tiempo, el Cuadro 27 muestra que el extracto etanólico fue diferente de los demás extractos a las 192 horas ($p=0.000$).

El extracto etanólico, mostró menor crecimiento micelial de todos los extractos a la concentración del 10 %, con una inhibición del 51.94 %.

Coventry y Allan (2001), al evaluar un producto comercial de neem (NeemAzal) encontraron que concentraciones de 250 partes por millón de azadiractina (preparada en etanol al 1 %) inhiben completamente el crecimiento de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, mientras que a *Microdochium nivale*, lo inhibieron solo parcialmente.

El extracto metanólico mostró el menor efecto en el crecimiento micelial a las concentraciones del 5 y 10 %. Estos resultados no concuerdan con Suresh *et al.* (1997), que encontraron que extractos metanólicos de neem disminuyen más del 50 % los daños causados por *Puccinia arachidis* en hojas de cacahuete.

Efectos Principales. De la **Figura 22**, del efecto principal extracto, se observa diferencias principalmente entre los extractos etanólico y hexánico.

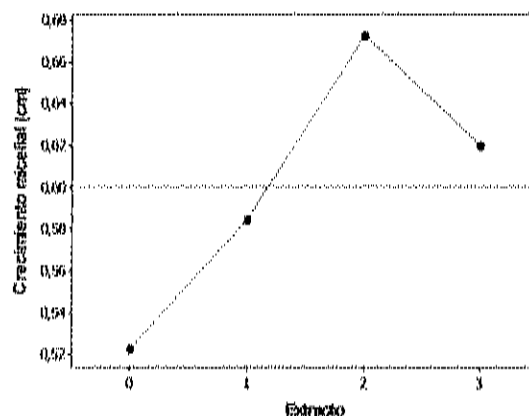


Figura 22. Efecto principal del factor extracto en el crecimiento micelial de *Geotrichum candidum*, en donde para los extractos: 0=Etanólico, 1= Acetónico, 2=Metanólico y 3=Hexánico

Las diferencias entre extractos del crecimiento micelial de *Geotrichum candidum* aparecen en el **Cuadro 28**.

Cuadro 28. Diferencias entre extractos en el crecimiento micelial de *Geotrichum candidum*.

Extracto	Promedio de medias
Etanólico	(0.523) a
Acetónico	(0.584) b
Metanólico	(0.673) c
Hexánico	(0.620) d

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas

Al realizar la comparación de medias por la prueba de Tukey (**Cuadro 28**), todos los extractos resultaron diferentes entre ellos, pero aún cuando éstas son diferencias estadísticas que pudieron resultar debido al tamaño de la muestra, en la práctica no se consideran diferencias significativas (**Figura 22**).

Del efecto principal concentración (**Figura 23**), se observa que la principal diferencia se encuentra en la muestra control.

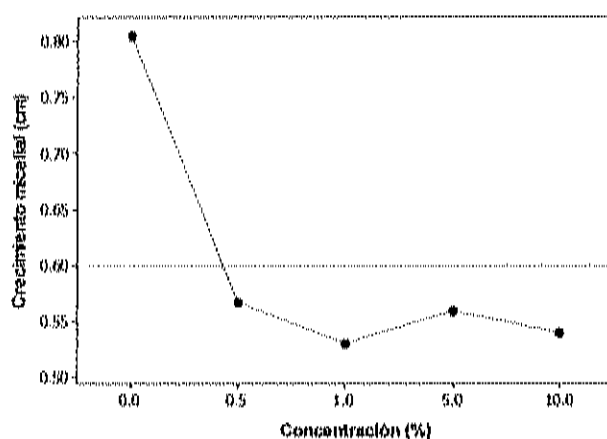


Figura 23. Efecto principal del factor concentración en el crecimiento micelial de *Geotrichum candidum*.

Las diferencias entre concentraciones del crecimiento micelial de *Geotrichum candidum* aparecen en el **Cuadro 29**.

Cuadro 29. Diferencias entre concentraciones del crecimiento micelial de *Geotrichum candidum*.

Concentración (%)	Promedio de medias
0	(0.805) a
0,5	(0.566) b
1.0	(0.530) b
5	(0.559) b
10	(0.539) b

Al realizar la comparación de medias por la prueba de Tukey (Cuadro 29), la concentración de la muestra control, mostró diferencias significativas con todas las concentraciones en estudio ($p=0.000$). Las concentraciones de 0.5, 1.0, 5 y 10 % no mostraron diferencias significativas.

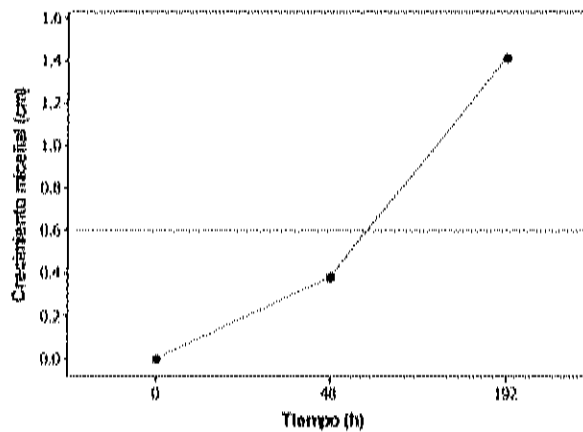


Figura 24. Efecto principal del factor tiempo en el crecimiento micelial de *Geotrichum candidum*.

Las diferencias entre tiempos en el crecimiento micelial de *Geotrichum candidum* (Figura 24) aparecen en el Cuadro 30.

Cuadro 30. Diferencias entre tiempos en el crecimiento micelial de *Geotrichum candidum*.

Tiempo (h)	Promedio de medias
0	(0.0) a
24	(0.386) b
48	(1.414) c

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas

Al realizar la comparación de medias por la prueba de Tukey (**Cuadro 30**)

Los tres tiempos en estudio, mostraron diferencias significativas ($p=0.000$)

Esporulación

Análisis de Varianza. En la tabla ANOVA para los extractos de neem en el efecto de la esporulación de *Geotrichum candidum* (**Cuadro 31**), se muestra que los efectos de los factores extracto y concentración resultaron con diferencias estadísticas significativas ($p=0.000$). La interacción extracto-concentración también resultó significativa ($p=0.019$).

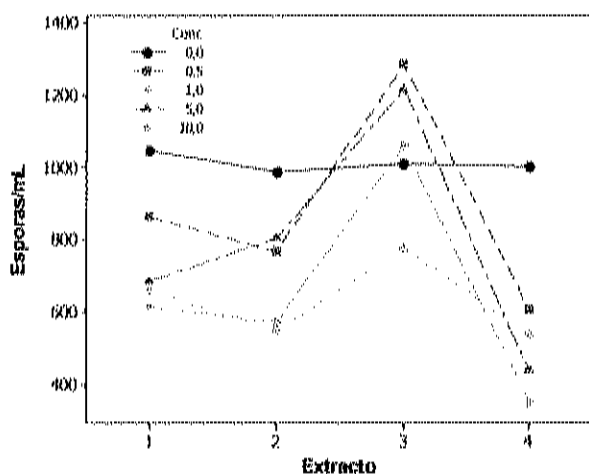
Cuadro 31. ANOVA de extractos de neem contra esporulación de *Geotrichum candidum*.

Fuente	GL	SC	CM	F	p
Extracto	3	1834249	611416	22.78	0.000
Cone	4	1230883	307721	11.46	0.000
Extracto*Cone	12	776840	64737	2.41	0.019
Error	40	1073775	26844		
Total	59	4915747			

GL= grados de libertad SS= Suma de cuadrados CM= Suma de cuadrados medios

Efectos de Interacción Doble. De acuerdo a la **Figura 25**, podemos observar que los extractos etanólico y acetónico, mostraron perfiles similares de inhibición de la esporulación. Particularmente, el extracto hexánico, mostró mayor inhibición en la

esporulación y el extracto metanólico menor inhibición. Al aumentar la concentración, solamente el extracto hexánico mostró disminución de la esporulación a todas las concentraciones en evaluación. De la misma **Figura 25** podemos observar que el efecto de interacción doble se debe, principalmente al comportamiento del extracto metanólico y hexánico.



Extractos: 1=Etanólico, 2=Acetónico, 3=Metanólico y 4=Hexánico

Figura 25. Efectos de interacción doble en la esporulación de *Geotrichum candidum*.

Las diferencias entre concentraciones para un mismo extracto en la esporulación de *Geotrichum candidum* aparecen en el **Cuadro 32**.

Cuadro 32. Diferencias entre concentraciones para un mismo extracto en la esporulación de *Geotrichum candidum*.

Concentración(%)	Extractos			
	Etanólico	Acetónico	Metanólico	Hexánico
0	(1044) a	(988) b	(1008) c	(1001) f
0.5	(862) a	(766) b	(1284) cd	(608) fg
1.0	(660) a	(547) b	(776) e	(534) fg
5.0	(684) a	(803) b	(1215) cde	(440) g
10.0	(614) a	(571) b	(1060) cde	(350) g

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas

De acuerdo a la comparación de medias (Prueba de Tukey) solamente los extractos metanólico y hexánico, mostraron diferencias significativas de la muestra control, pero el extracto metanólico, mostro mayor esporulación que la muestra control a las concentraciones de 0.5, 5 y 10 %. El extracto hexánico presentó menor esporulación a todas las concentraciones (**Cuadro 32**).

El extracto hexánico mostró menor esporulación con inhibición del 65.37 % a la concentración de 10 %, seguido por el extracto acetónico a la misma concentración con el 43.5 % de inhibición en la esporulación. Grayer y Harborne (1994), establecieron que existen ácidos grasos de cadena larga, especialmente los de 18 átomos de carbono, los cuales forman parte del mayor grupo de compuestos antifúngicos presentes en las plantas; entre éstos se mencionan compuestos derivados de los ácidos linoleico y linolénico. De acuerdo con Govindachari *et al.* (1998), los extractos de neem obtenidos a partir de hexano contienen sustancias no polares, como grasas y ácidos grasos, por lo tanto los ácidos grasos presentes en los extractos

hexánicos del neem, pueden causar el efecto antifúngico.

El extracto acetónico, mostró una mayor inhibición que el extracto etanólico a las concentraciones de 1 y 10 %. No sucedió lo mismo con el extracto metanólico el cual a concentraciones del 0.5, 5 y 10 %, mostró una mayor esporulación que la muestra control; es decir, que el extracto metanólico favoreció la esporulación de *Geotrichum candidum*. Coventry y Allan (2001), obtuvieron resultados similares al trabajar con extractos de semillas de neem obtenidos en laboratorio; al probar estos extractos contra *Gaeumannomyces graminis var tritici*, encontraron que aumentaba el crecimiento micelial de este hongo. Este efecto lo atribuyeron a que algunos compuestos presentes en los extractos actuaron como fuente de nutrientes para el hongo, favoreciendo de esta manera el aumento del crecimiento, debido a que la concentración de los compuestos inhibitorios fue más baja que su dosis efectiva.

Efectos Principales. La **Figura 26** del factor extracto muestra que la principal diferencia se encuentra en el extracto metanólico.

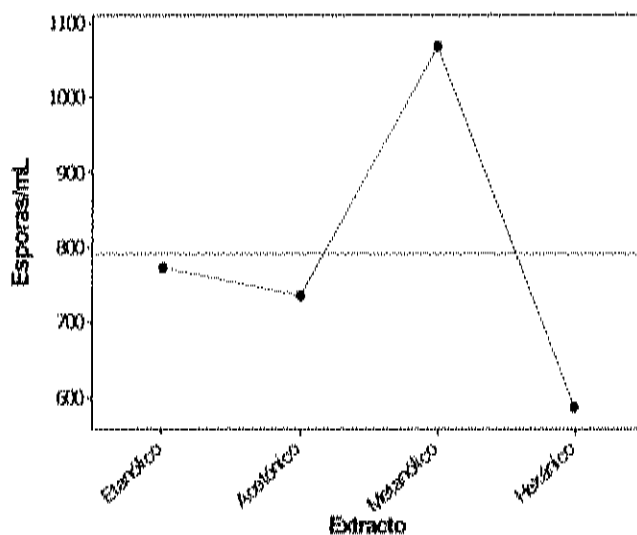


Figura 26. Efecto principal del factor extracto en la esporulación de *Geotrichum candidum*.

Las diferencias entre extractos en la esporulación de *Geotrichum candidum* aparecen en el **Cuadro 33**.

Cuadro 33. Diferencias entre extractos en la esporulación de *Geotrichum candidum*.

Extracto	Promedio de medias
Etanólico	(773) a
Acetónico	(735) ab
Metanólico	(1068) c
Hexánico	(586) bc

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas.

Efectos Principales. La **Figura 26** del factor extracto muestra que la principal diferencia se encuentra en el extracto metanólico,

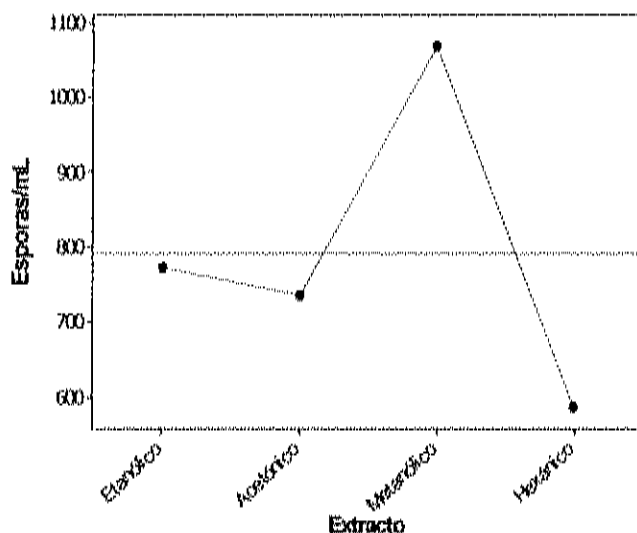


Figura 26. Efecto principal del factor extracto en la esporulación de *Geotrichum candidum*.

Las diferencias entre extractos en la esporulación de *Geotrichum candidum* aparecen en el **Cuadro 33**.

Cuadro 33. Diferencias entre extractos en la esporulación de *Geotrichum candidum*.

Extracto	Promedio de medias
Etanólico	(773) a
Acetónico	(735) ab
Metanólico	(1068) c
Hexánico	(586) bc

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas.

Al realizar la comparación de medias por la prueba de Tukey (**Cuadro 33**), los extractos etanólico y metanólico (**Figura 26**), metanólico y hexánico; acetónico y metanólico ($p=0.000$), así como también los extractos etanólico y hexánico ($p=0.017$), mostraron diferencias significativas. No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los extractos etanólico y acetónico ($p= 0.921$), ni entre los extractos acetónico y hexánico ($p=0.078$).

Con respecto al efecto principal del factor concentración, la **Figura 27** muestra que la principal diferencia se encuentra entre la muestra control y la concentración de 10 %.

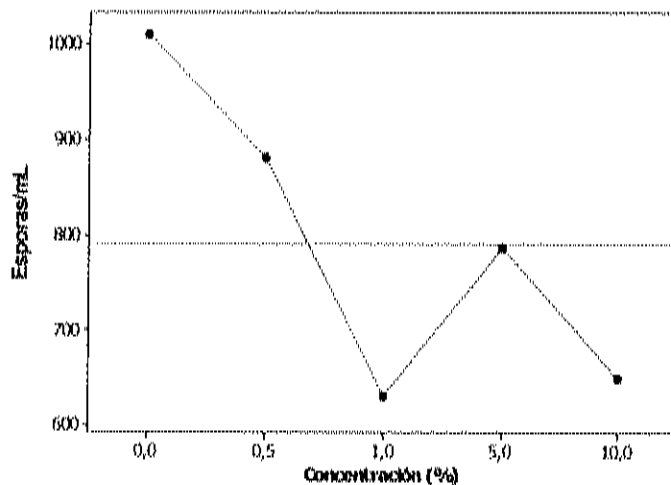


Figura 27. Efecto principal del factor concentración en la esporulación de *Geotrichum candidum*.

Las diferencias entre concentraciones para la esporulación de *Geotrichum candidum* aparecen en el **Cuadro 34**.

Cuadro 34. Diferencias entre concentraciones para la esporulación de *Geotrichum candidum*.

Concentración (%)	Promedio de medias
0	(1010) a
0.5	(880) ab
1.0	(669) c
5	(785) bc
10	(648) c

Al realizar la comparación de medias por la prueba de Tukey (**Cuadro 34**), mostraron diferencias estadísticas significativas la muestra control, 1 % ($p=0.000$), 5 % ($p=0.013$) y 10 % ($p=0.000$) así como también las concentraciones de 0.5 %, 1 % ($p=0.004$) y 10 % ($p=0.010$).

Germinación de esporas

Análisis de Varianza. En la tabla ANOVA para los extractos de neem en el efecto de la germinación de *Geotrichum candidum* (Cuadro 35), se muestra que los efectos de los factores extracto y concentración resultaron significativos ($p=0.000$). La interacción extracto-concentración también resultó significativa ($p=0.000$).

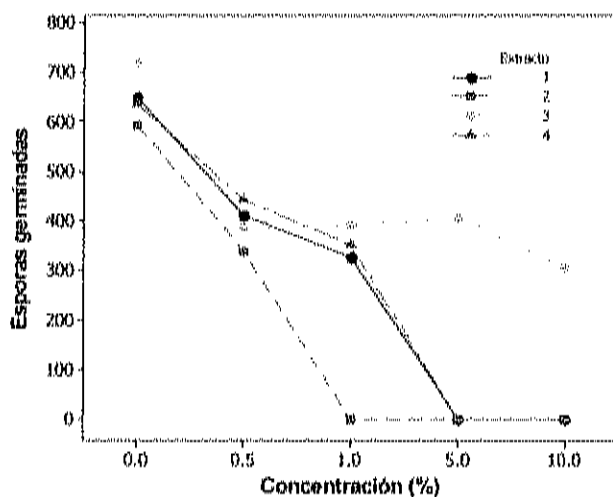
Cuadro 35. ANOVA de extractos de neem contra germinación de esporas de *Geotrichum candidum*.

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Extracto	3	506307	168769	79.70	0.000
Conc	4	2653945	663486	313.33	0.000
Extracto*Conc	12	408920	34077	16.09	0.000
Error	40	84701	2118		
Total	59	3653873			

GL= grados de libertad SS= Suma de cuadrados CM= Suma de cuadrados medios

Efectos de Interacción Doble. De acuerdo a la **Figura 28**, podemos observar que los extractos etanólico, acetónico y hexánico, mostraron perfiles muy similares. Este comportamiento difiere con el extracto metanólico. Esta misma figura, muestra que el extracto acetónico presentó mayor inhibición en la germinación de esporas y el extracto metanólico menor inhibición. Al aumentar la concentración todos los extractos muestran disminución en la germinación de esporas (mayor inhibición). Podemos observar también de esta misma figura, que el efecto de interacción se debe

principalmente al comportamiento del extracto metanólico a las concentraciones de 5 y 10 %.



Extractos: 1=Etanólico, 2= Acetónico, 3=Metanólico y 4=Hexánico

Figura 28. Efecto de interacción doble en la germinación de esporas de *Geotrichum candidum*.

Las diferencias entre concentraciones para un mismo extracto en la germinación de esporas de *Geotrichum candidum* aparecen en el Cuadro 36.

Cuadro 36. Diferencias entre concentraciones para un mismo extracto en la germinación de esporas de *Geotrichum candidum*.

Concentración(%)	Extractos			
	Etanólico	Acetónico	Metanólico	Hexánico
0	(648) a	(591) d	(720) g	(635) j
0.5	(411) b	(338) e	(385) h	(443) k
1.0	(325) b	(0) f	(392) hi	(351) k
5.0	(0) c	(0) f	(405) hi	(0) l
10.0	(0) c	(0) f	(305) i	(0) l

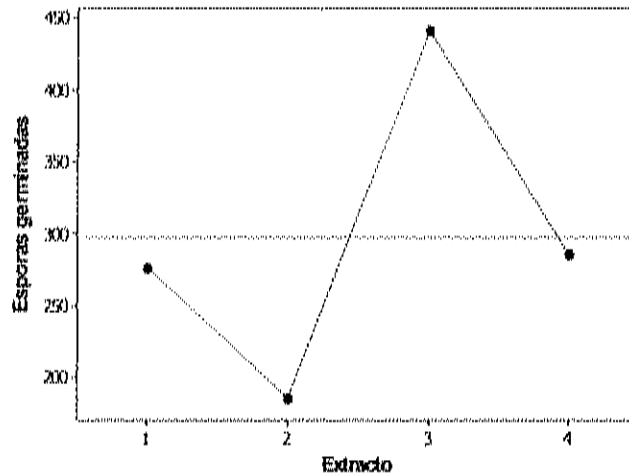
En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas.

De acuerdo a la comparación de medias por la prueba de Tukey (Cuadro 36), la muestra control mostró diferencias con todas las concentraciones en estudio y en todos los extractos ($p=0.000$). Ninguno de los extractos mostró diferencias significativas de la concentración 5 a la concentración del 10 %.

El extracto acetónico mostró la mejor respuesta al lograr el 100 % de inhibición de la germinación de esporas de *Geotrichum candidum* a las concentraciones de 1, 5 y 10 %, seguido por el extracto etanólico, que mostró también el 100 % de inhibición a las concentraciones de 5 y 10 %. El que menor respuesta mostró fue el extracto metanólico ya que a la concentración del 10 %, logró solamente una inhibición del 52.8 %. Estos resultados son congruentes con los obtenidos por Coventry y Allan (2001), ya que al evaluar concentraciones de 62.5 partes por millón de azadiractina, preparadas a partir del producto comercial NeemAzal (5 % de azadiractina), se obtuvo una reducción significativa de la germinación de conidios de *S. fuliginea* comparado con el control. La germinación para el control fue del 100 %, mientras

que para el tratamiento con 62.5 partes por millón de azadiractina la germinación fue de 11 %. Con los resultados obtenidos por Coventry y Allan (2001), se demuestra el efecto inhibitorio en la germinación de productos obtenidos a partir de neem.

Efectos Principales. Con respecto al efecto principal del factor extracto (Figura 29), la principal diferencia es con respecto al extracto acetónico y metanólico.



Extractos: 1=Etanólico, 2= Acetónico, 3=Metanólico y 4=Hexánico

Figura 29. Efecto principal del factor extracto para la germinación de esporas de *Geotrichum candidum*.

Las diferencias entre extractos para la germinación de esporas de *Geotrichum candidum* aparecen en el Cuadro 37.

Cuadro 37. Diferencias entre extractos para la germinación de esporas de *Geotrichum candidum*.

Extracto	Promedio de medias
Etanólico	(277) a
Acetónico	(186) b
Metanólico	(441) c
Hexánico	(286) ad

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas.

Al realizar la comparación de medias mediante la prueba de Tukey (**Cuadro 37**), los extractos etanólico, acetónico y metanólico, mostraron diferencias significativas ($p=0.000$) (**Figura 29**).

Con respecto al efecto principal del factor concentración (**Figura 30**), se observan diferencias principalmente entre las concentraciones de la muestra control y las del 1, 5 y 10 %.

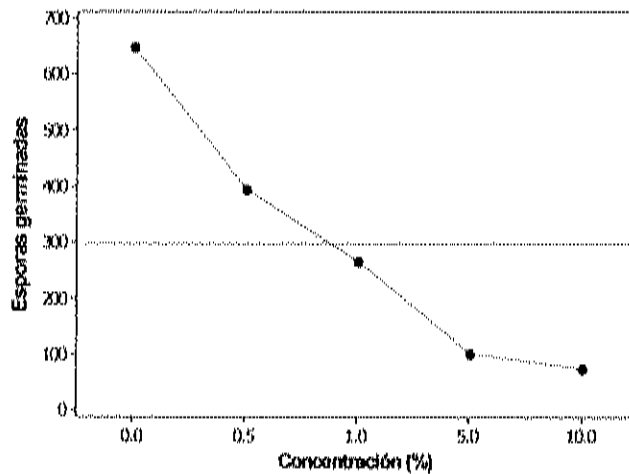


Figura 30. Efecto principal del factor concentración para la germinación de esporas de *Geotrichum candidum*.

Las diferencias entre concentraciones para la germinación de esporas de *Geotrichum candidum* aparecen en el **Cuadro 38**.

Cuadro 38. Diferencias entre concentraciones para la germinación de esporas de *Geotrichum candidum*.

Concentración (%)	Promedio de medias
0	(648) a
0.5	(394) b
1.0	(267) c
5	(101) d
10	(76) d

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas.

De acuerdo la comparación de medias mediante la prueba de Tukey (**Cuadro 38**), todas las concentraciones mostraron diferencias significativas de la muestra control. Las concentraciones 0.5, 1.0 y 5.0 % también mostraron diferencias significativas ($p=0.000$) (**Figura 30**).

Experimento 3. Efecto de los Extractos de Neem contra *Fusarium oxysporum*

Crecimiento Micelial

Análisis de Varianza. La tabla ANOVA para los extractos de neem contra *Fusarium oxysporum* (Cuadro 39) muestra que los efectos de los factores extracto, concentración y tiempo, resultaron significativos ($p=0.000$), así como también las interacciones extracto-concentración, extracto-tiempo, concentración-tiempo y la interacción extracto-concentración-tiempo.

Cuadro 39. ANOVA de extractos de neem en el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*.

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Ex	3	0.84987	0.28329	49.69	0.000
Con	4	6.34156	1.58539	278.09	0.000
Ex*Con	12	0.76761	0.06397	11.22	0.000
Tie	2	51.10243	25.55121	4284.08	0.000
Ca(Ex Con)	40	0.22804	0.00570	0.96	0.553
Ex*Tie	6	1.38116	0.23019	38.60	0.000
Con*Tie	8	5.25253	0.65657	110.08	0.000
Ex*Con*Tie	24	1.46286	0.06095	10.22	0.000
Error	80	0.47714	0.00596		
Total	179	67.86319			

GL= grados de libertad SS= Suma de cuadrados CM= Suma de cuadrados medios

Efectos de Interacción Triple. Para analizar la interacción triple se construyeron gráficas de interacción doble de concentración-tiempo para cada extracto. La **Figura 31**, muestra que los cuatro extractos presentaron un perfil de inhibición en el crecimiento micelial. El extracto etanólico mostró mayor inhibición y el extracto metanólico menor inhibición.

Al aumentar la concentración, casi todos los extractos mostraron disminución en el crecimiento micelial (mayor inhibición), excepto el extracto acetónico que a la concentración del 1 %, presentó una menor inhibición que a la concentración de 0.5 %. También puede observarse (**Figura 31**) que el efecto de interacción triple esta sustentada principalmente en el comportamiento de los extractos a 240 horas. Por la discusión anterior y dado que existen muchas comparaciones de tratamientos posibles, solo se discuten los efectos de cada extracto y las concentraciones de 5 y 10 % a un tiempo de 240 horas.

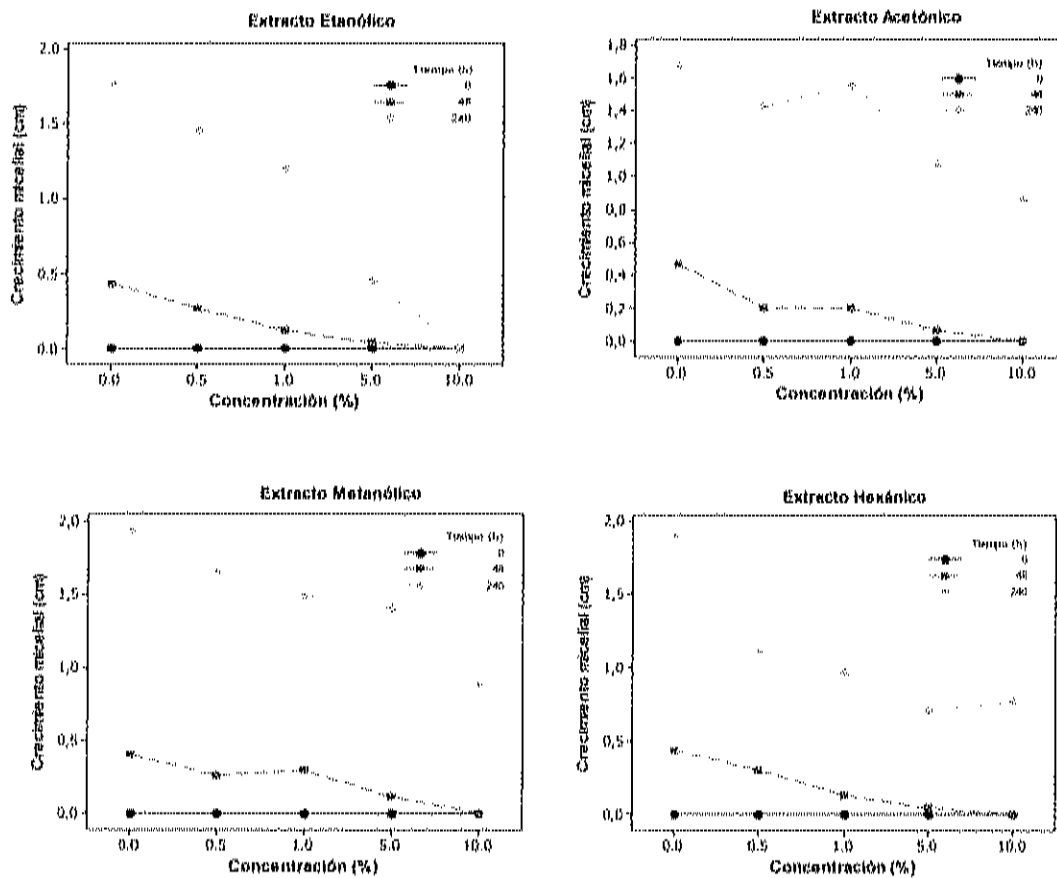


Figura 31. Efectos de interacción triple de los extractos etanólico, acetónico, metanólico y hexánico en el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*.

Las diferencias entre las concentraciones de 5 y 10 % a 240 horas de evaluación para un mismo extracto del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* aparecen en el Cuadro 40.

Cuadro 40. Diferencias entre las concentraciones de 5 y 10 %, a 240 horas de evaluación, para un mismo extracto del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*.

Concentración	Etanólico	Acetónico	Metanólico	Hexánico
5 %	(0.455) a	(1.066) c	(1.399) d	(0.710) f
10 %	(0.000) b	(0.855) e	(0.876) e	(0.766) f

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas

Al realizar la comparación de medias por la prueba de Tukey (Cuadro 40), solamente el extracto metanólico mostró diferencia de la concentración 5 a la concentración de 10 % a 240 horas de estudio ($p=0.000$).

Las diferencias entre extractos, para las concentraciones de 5 % y 10 %, a 240 horas de evaluación del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, aparecen en el Cuadro 41.

Cuadro 41. Diferencias entre extractos para las concentraciones de 5 y 10 % a 240 horas de evaluación del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*.

Extracto	5 %	10 %
Etanólico	(0.455) a	(0.000) d
Acetónico	(1.066) b	(0.855) e
Metanólico	(1.399) c	(0.876) e
Hexánico	(0.710) a	(0.766) e

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas

Al realizar la comparación de medias para las concentraciones de 5 y 10 %, el **Cuadro 41**, muestra que para la concentración del 5 %, el extracto etanólico mostró diferencias con los extractos acetónico y metanólico ($p=0.000$). Para la concentración del 10 %, el extracto etanólico mostró diferencias con los extractos acetónico, metanólico y hexánico ($p=0.000$).

El extracto etanólico, presentó mayor inhibición desde la concentración del 5 %; a la concentración del 10 % inhibió completamente el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*.

El extracto metanólico mostró menor respuesta al presentar mayor crecimiento a todas las concentraciones a las 240 horas de evaluación.

Efectos de Interacción Doble. La interacción extracto-concentración (**Figura 32**), muestra que los cuatro extractos presentaron un comportamiento diferente a todas las concentraciones en estudio. El extracto etanólico mostró mayor inhibición en el crecimiento micelial a las concentraciones de 1, 5 y 10 %. El extracto metanólico presentó menor inhibición a todas las concentraciones. De acuerdo a la misma **Figura 32**, puede observarse que el efecto de interacción se debe al comportamiento de los extractos, principalmente a las concentraciones de 5 y 10 %. Por la discusión anterior y dado que existen muchas comparaciones de medias posibles, solo se discuten los efectos de cada extracto y las concentraciones de 5 y 10 %.

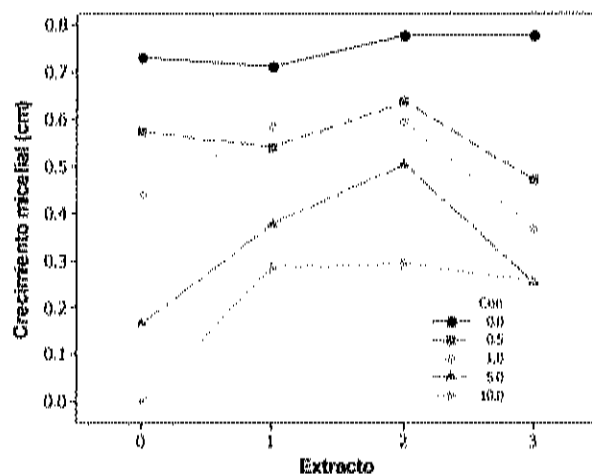


Figura 32. Efectos de interacción extracto-concentración en el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*.

Las diferencias entre concentraciones para un mismo extracto evaluación del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, aparecen en el **Cuadro 42**.

Cuadro 42. Diferencias entre concentraciones de 5 y 10 % para los extractos en el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*.

Concentración(%)	Extractos			
	Etanólico	Acetónico	Metanólico	Hexánico
5.0	0.164 a	0.3769 c	0.503 d	0.253 f
10.0	0.000 b	0.2851 c	0.292 e	0.253 f

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas.

La interacción extracto tiempo (Figura 33), muestra un comportamiento similar entre los extracto al tiempo 0 y 48 horas, pero a 240 horas observamos una importante diferencia, por lo que el efecto de interacción se debe al comportamiento de los extractos a 240 horas.

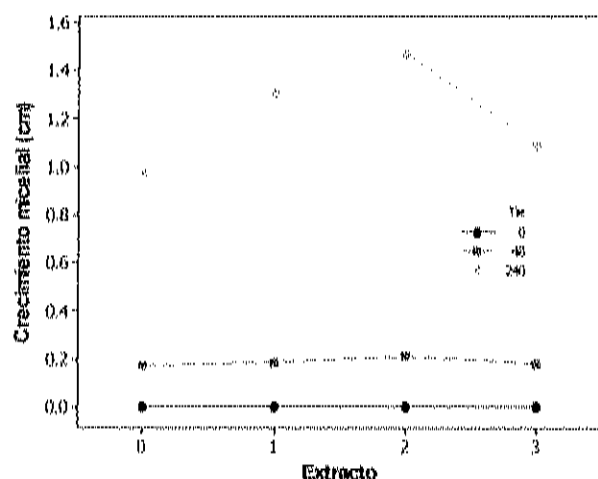


Figura 33. Efectos de interacción extracto-tiempo en el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*.

Las diferencias entre tiempos para cada extracto del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, aparecen en el Cuadro 43.

Cuadro 43. Diferencias entre tiempo para cada extracto del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*.

Extracto	Tiempo		
	0	48	240
Etanólico	0 a	0.172 b	0.975 c
Acetónico	0 a	0.186 b	1.313 d
Metanólico	0 a	0.212 b	1.470 e
Hexánico	0 a	0.184 b	1.090 f

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas

En las comparaciones de medias por la prueba de Tukey entre tiempos para cada extracto (Cuadro 43), observamos que a 240 horas todos los extractos mostraron diferencias significativas, aunque no diferencias prácticas ($p=0.000$) (Figura 34).

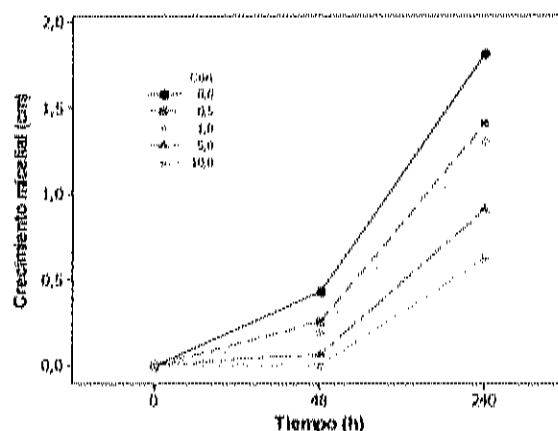


Figura 34. Efectos de interacción concentración-tiempo en el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*.

Las diferencias entre tiempos para cada extracto del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, aparecen en el Cuadro 44.

Cuadro 44. Diferencias entre tiempo para cada concentración en el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*.

Concentración (%)	Tiempo		
	0	48	240
0	0 a	0.433 b	1.811 f
0.5	0 a	0.255 c	1.411 gh
1.0	0 a	0.186 d	1.302 h
5.0	0 a	0.064 d	0.907 i
10.0	0 a	0.000 e	0.624 j

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas.

Al realizar la comparación de medias (**Cuadro 44**) del efecto de interacción concentración-tiempo (Prueba de Tukey), las concentraciones de 5 y 10 % mostraron diferencias significativas entre ellas, así como también de la muestra control ($p=0.000$).

El extracto etanólico, mostró mayor inhibición, ya que concentraciones del 10 %, inhibieron completamente el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*. El extracto metanólico a la misma concentración mostró el 51.7 % de inhibición. Estos resultados son congruentes con Govindachari *et al.* (1998), en trabajos realizados con aceite, extractos hexánico y metanólico de neem, encontró que los extractos metanólicos a una concentración de 1000 partes por millón, mostraron efecto antifúngico en el crecimiento micelial de *Drechslera oryzae*, *Alternaria tenuis* y *Fusarium oxysporum* vasinfectum con porcentajes de inhibición de 70.1 %, 35.1 % y 26.5 %, respectivamente. En nuestros resultados el extracto metanólico al 1 % inhibió solamente un 18 % el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*.

Efectos Principales. Del factor extracto en la **Figura 35**, se observa que la principal diferencia se encuentra en el extracto metanólico.

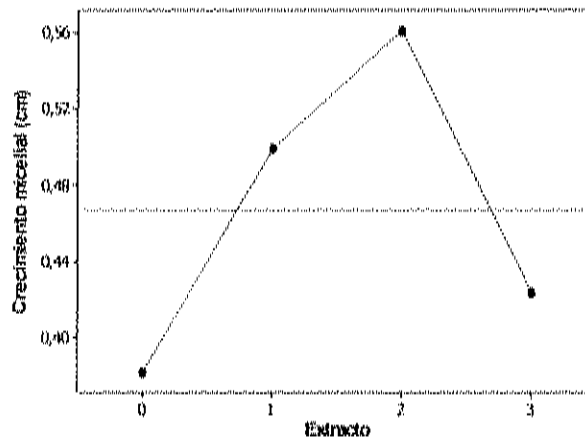


Figura 35. Efecto principal del factor extracto para el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*.

Las diferencias entre extractos para el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, aparecen en el **Cuadro 45**.

Cuadro 45. Diferencias entre extractos para el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*.

Extracto	Promedio de medias
Etanólico	(0,384) a
Acetónico	(0,499) b
Metanólico	(0,560) c
Hexánico	(0,424) a

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas.

Al realizar la comparación de medias, por la prueba de Tukey (**Cuadro 45**), El extracto etanólico mostró diferencias significativas de los extractos acetónico y

metanólico. Los extractos acetónico y metanólico, también mostraron diferencias significativas ($p=0.000$) (Figura 35).

Con respecto al efecto principal del factor concentración (Figura 36), podemos observar que la diferencia se encuentra entre la muestra control y las concentraciones de 5 y 10 %.

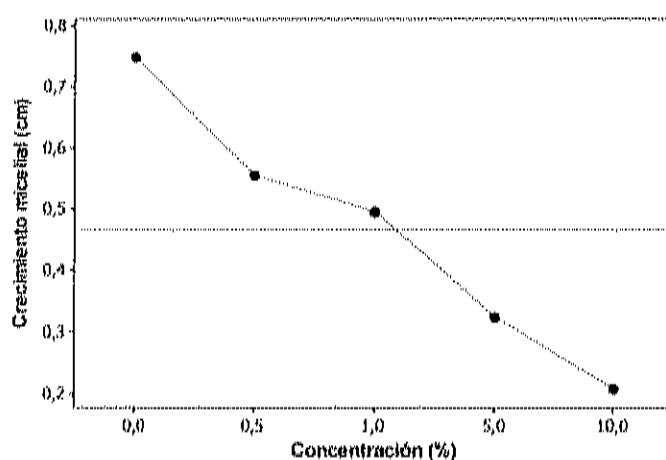


Figura 36. Efecto principal del factor concentración para el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*.

Las diferencias entre concentraciones para el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, aparecen en el Cuadro 46.

Cuadro 46. Diferencias entre concentraciones para el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*.

Concentración (%)	Promedio de medias
0	(0.750) a
0.5	(0.550) b
1.0	(0.496) c
5	(0.324) d
10	(0.208) e

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas.

Al realizar la comparación de medias, por la prueba de Tukey (**Cuadro 46**), todas las concentraciones mostraron diferencias significativas, aunque de manera práctica no sean diferentes (**Figura 36**).

Para el efecto principal tiempo, de la **Figura 37**, se observa que la diferencia se encuentra entre el tiempo 0 y 240 horas.

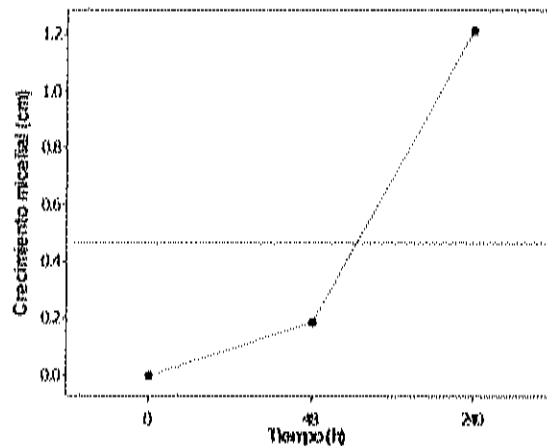


Figura 37. Efecto principal del factor tiempo del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*.

Las diferencias entre tiempos para el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, aparecen en el Cuadro 47.

Cuadro 47. Diferencias entre tiempos del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*.

Tiempo (h)	Promedio de medias
0	(0.0) a
48	(0.187) b
240	(1.212) c

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas.

Al realizar la comparación de medias, por la prueba de Tukey (Cuadro 47), los tres tiempos mostraron diferencias significativas (Figura 37).

Esporulación

Análisis de Varianza. En la tabla ANOVA para los extractos de neem en el efecto de la esporulación de *Fusarium oxysporum* (Cuadro 48), se muestra que los efectos de los factores extracto y concentración resultaron significativos ($p=0.000$). La interacción extracto-concentración también resultó significativa con un valor ($p=0.000$).

Cuadro 48. ANOVA de extractos de neem contra esporulación de *Fusarium oxysporum*.

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Extracto	3	1049720	349907	35.96	0.000
Concentración	4	2533296	633324	65.08	0.000
Extracto* Concentración	12	990245	82520	8.48	0.000
Error	40	389249	9731		
Total	59	4962511			

Efectos de Interacción Doble. La **Figura 38**, muestra que los cuatro extractos presentaron un perfil de inhibición en la esporulación de *Fusarium oxysporum*. Todos los extractos presentaron un comportamiento diferente en la inhibición de la esporulación. En particular, el extracto etanólico mostró mayor inhibición y el extracto acetónico menor inhibición. Al aumentar la concentración solamente el extracto etanólico mostró disminución en la esporulación (mayor inhibición). De la misma **Figura 38**, puede observarse que el efecto de interacción doble está sustentado principalmente a las diferencias entre la muestra control y el comportamiento de los extractos a las concentraciones de 5 y 10 %. El extracto etanólico mostró mayor inhibición a las concentraciones de 1, 5 y 10%. A la concentración del 10 %, este mismo extracto mostró una inhibición de la esporulación del 100 %.

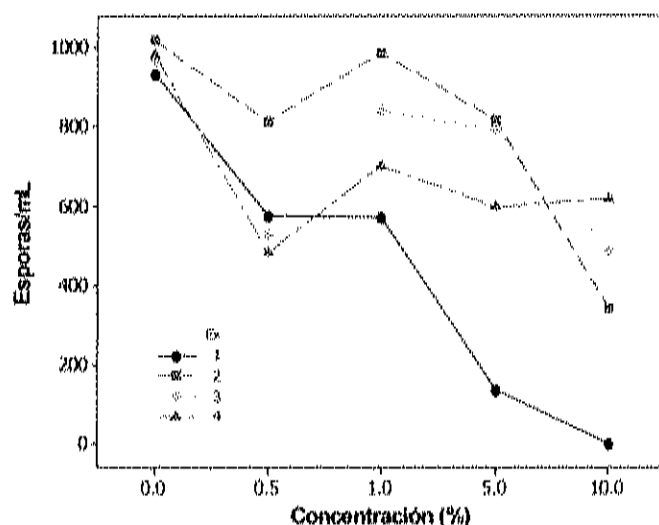


Figura 38. Efectos de interacción extracto-concentración en la esporulación de *Fusarium oxysporum*.

Las diferencias entre concentraciones para un mismo extracto de la esporulación de *Fusarium oxysporum*, aparecen en el **Cuadro 49**.

Cuadro 49. Diferencias entre concentraciones para un mismo extracto de la esporulación de *Fusarium oxysporum*.

Concentración(%)	Extractos			
	Etanólico	Acetónico	Metanólico	Hexánico
5.0	133 a	818 c	793 f	597 h
10.0	0 a	342 d	486 g	618 h

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas

Al realizar la comparación de medias (Prueba de Tukey), el **Cuadro 49** muestra que los extractos acetónico y metanólico, mostraron diferencias de la concentración 5 % a la concentración de 10 %.

El extracto etanólico mostro mayor inhibición en la esporulación de *Fusarium oxysporum* desde la concentración del 5 % y a la concentración de 10 % inhibió completamente la esporulación.

Efectos Principales. Para el factor extracto (**Figura 39**), se muestra que el extracto etanólico fue diferente del resto de los extractos.

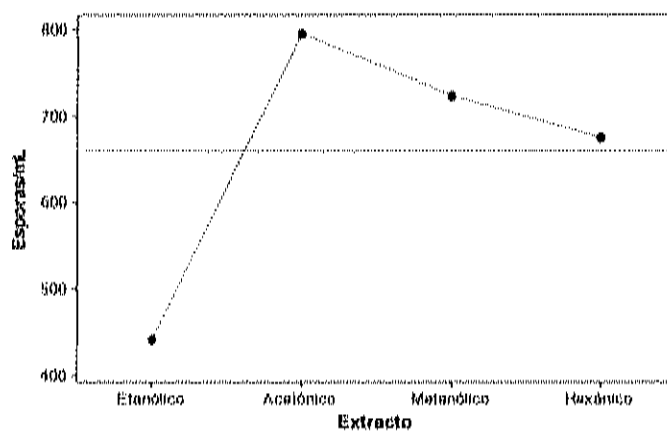


Figura 39. Efecto principal del factor extracto en la esporulación de *Fusarium oxysporum*.

Las diferencias entre concentraciones para un mismo extracto de la esporulación de *Fusarium oxysporum*, aparecen en el **Cuadro 50**.

Cuadro 50. Diferencias entre extractos en la esporulación de *Fusarium oxysporum*.

Extracto	Promedio de medias
Etanólico	(442) a
Acetónico	(795) b
Metanólico	(723) cd
Hexánico	(676) d

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas.

Al realizar la comparación de medias (**Cuadro 50**). El extracto etanólico mostró diferencias con todos los extractos ($p=0.000$). El extracto acetónico, mostró diferencias significativas con el extracto hexánico ($p=0.0101$).

Para el efecto principal concentración en la **Figura 40**, se observan diferencias a todas las concentraciones.

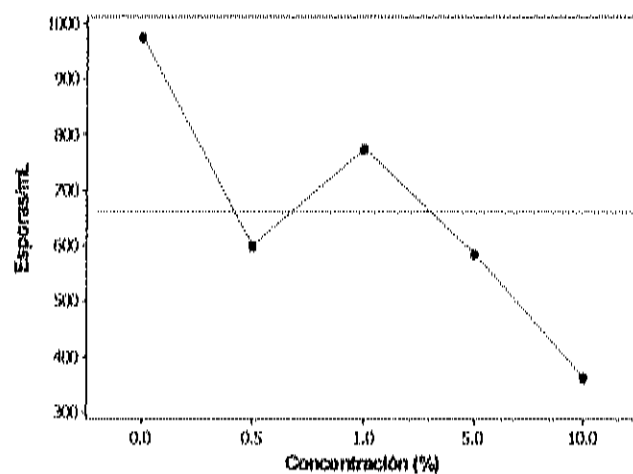


Figura 40. Efecto principal del factor concentración en la esporulación de *Fusarium oxysporum*.

Las diferencias entre concentraciones en la esporulación de *Fusarium oxysporum*, aparecen en el **Cuadro 51**.

Cuadro 51. Diferencias entre concentraciones en la esporulación de *Fusarium oxysporum*.

Concentración (%)	Promedio de medias
0	(975) a
0.5	(599) b
1.0	(775) c
5	(585) bd
10	(361) e

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas.

Al realizar la comparación de medias (Prueba de Tukey), todas las concentraciones mostraron diferencias con la muestra control. Las concentraciones 0.5, 1.0 y 10 % mostraron diferencias significativas ($p=0.000$) (Cuadro 51).

Germinación de esporas

Análisis de Varianza. La tabla ANOVA para los extractos de Neem en el efecto de la germinación de esporas *Fusarium oxysporum* (**Cuadro 52**), muestra que los efectos de los factores extracto y concentración resultaron significativos ($p=0.000$). La interacción extracto-concentración también resultó significativa ($p=0.000$).

Cuadro 52. ANOVA de extractos de neem contra germinación de esporas de *Fusarium oxysporum*.

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Extracto	3	1814.85	604.95	26.53	0.000
Conc	4	6008.23	1502.06	65.88	0.000
Extracto*Conc	12	1523.90	126.99	5.57	0.000
Error	40	912.00	22.80		
Total	59	10258.98			

GL= grados de libertad SC= Suma de cuadrados CM= Suma de cuadrados medios

Efectos de Interacción Doble. La **Figura 41**, muestra que los extractos etanólico, acetónico y hexánico presentaron un perfil de inhibición similar en la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum*. El extracto metanólico presentó un comportamiento diferente a los demás extractos en estudio. El extracto etanólico mostró mayor inhibición y el metanólico menor inhibición en la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum*. Al aumentar la concentración los extractos etanólico,

acetónico y hexánico, mostraron disminución en la germinación de esporas (mayor inhibición). No sucedió lo mismo con el extracto metanólico, que presentó mayor número de esporas germinadas que la muestra control a las concentraciones de 1 y 10 %. Los extractos etanólico, acetónico y hexánico inhibieron al 100 % la germinación de esporas a las concentraciones del 5 y 10 %.

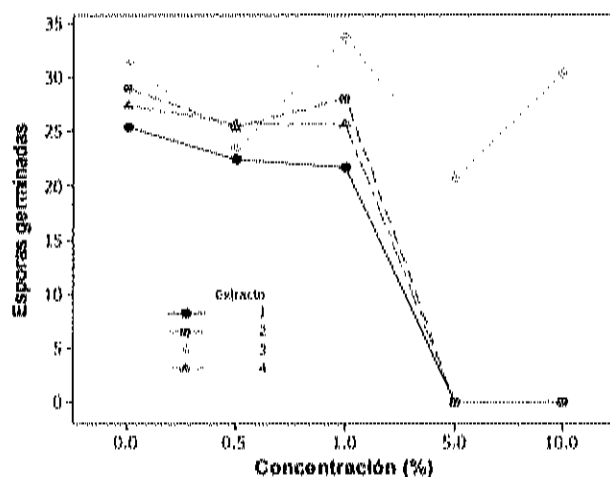


Figura 41. Efectos de interacción de los factores extracto y concentración para la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum*.

Las diferencias entre concentraciones para un mismo extracto en la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum*, aparecen en el **Cuadro 53**.

Cuadro 53. Diferencias entre concentraciones para un mismo extracto en la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum*.

Concentración(%)	Extractos			
	Etanólico	Acetónico	Metanólico	Hexánico
5.0	(0.00) a	(0.00) b	(20.66) c	(0.00) d
10.0	(0.00) a	(0.00) b	(30.33) c	(0.00) d

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas.

De acuerdo a la comparación de medias (**Cuadro 53**), ningún extracto mostró diferencias de la concentración 5 % a la concentración 10 %.

Los extractos etanólico, acetónico y hexánico a la concentración de 5 y 10 % inhibieron completamente la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum*.

Efectos Principales. La **Figura 42** muestra que el extracto metanólico presenta mayor diferencia entre los extractos.

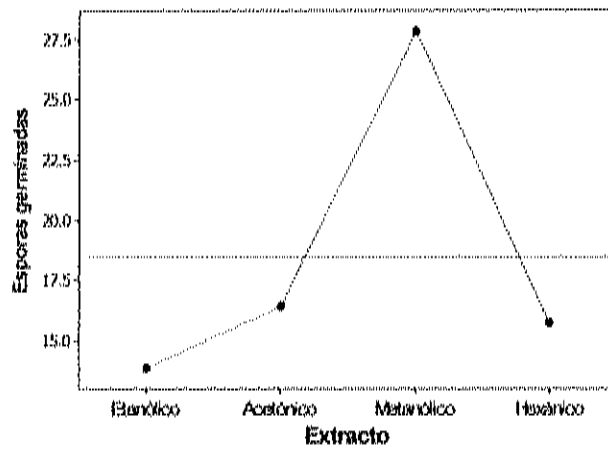


Figura 42. Efecto principal extracto de la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum*.

Las diferencias entre extractos de la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum*, aparecen en el **Cuadro 54**.

Cuadro 54. Diferencias entre extractos de la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum*.

Extracto	Promedio de medias
Etanólico	(13.86) a
Acetónico	(16.46) a
Metanólico	(27.86) b
Hexánico	(15.73) a

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas.

De acuerdo a la comparación de medias por la prueba de Tukey (**Cuadro 54**), solamente el extracto metabólico mostró diferencias significativas ($p=0.000$).

De la **Figura 43**, para el efecto principal concentración, se observa que la diferencias se encuentran en la muestra control y las concentraciones de 5 y 10 %.

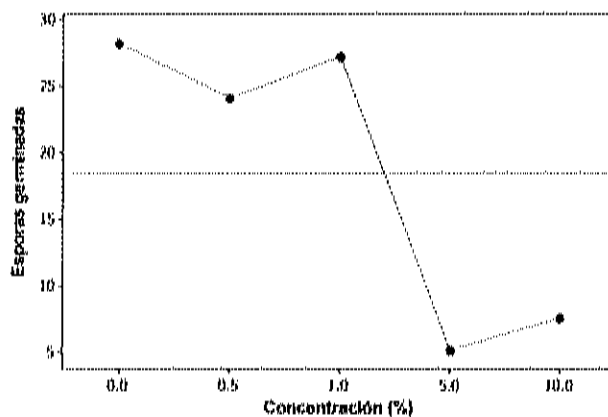


Figura 43. Efecto principal concentración de la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum*.

Las diferencias entre concentraciones de la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum*, aparecen en el **Cuadro 55**.

Cuadro 55. Diferencias entre concentraciones de la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum*.

Concentración (%)	Promedio de medias
0	(28.25) a
0.5	(24.16) a
1.0	(27.25) a
5	(5.16) b
10	(7.58) b

En una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas.

De la comparación de medias por la prueba de Tukey (**Cuadro 54**), solo las concentraciones de 5 y 10 %, mostraron diferencias significativas de la muestra control ($p=0.000$).

CONCLUSIONES

1. Los extractos de neem poseen efecto antifúngico.
2. El efecto de los extractos evaluados en los hongos *Rhizopus stolonifer* y *Geotrichum candidum* fue fungistático. Solamente el extracto etanólico mostró efecto fungicida en *Fusarium oxysporum*.
3. Los extractos etanólico y acetónico mostraron mayor efecto antifúngico.
4. La concentración del 10 % mostró mayor efecto antifúngico.
5. El género y la especie del hongo influyó en la respuesta mostrada frente a los extractos de neem.

LITERATURA BIBLIOGRÁFICA CITADA

Agrios, G. N. 2001, Fitopatología Editorial Limusa, p. 273-312.

Alexopoulos, C.J. y Mimms, C.W. 1985. Introducción a la Micología. Omega, Barcelona, España. pp. 638.

Ambrosino, P., Fresa, R., Fogliano, V., Monti, S.M. and Ritieni, A. 1999. Extraction of azadirachtin A from neem seed kernels by supercritical fluid and its evaluation by HPLC and LC/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(12):5252-5256.

Azcon-Bieto, J. y Talon, M. 1993. Fisiología y bioquímica vegetal. Primera Edición. McGraw-Hill Interamericana de España. pp. 238-244.

Bailey, L.H. 1997. Manual of cultivated plants. McMillan Publishing Co. Inc. New York, USA. pp 612-613.

Barnet, L. y Hunter, B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4ta. Edit. Burgess Publishing Company. Minnesota.

Bautista, B.S., Hernández L.M., y Barrera N.L. 2000. Antifungal screening of plants of the state of Morelos, México against four fungal postharvest pathogens of fruits and vegetables. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 18 (1):36-41

Cantoral, F.J. 2000. Microbiología industrial y micopatología. *Revista Iberoamericana de Micología* 17:S29-S30.

Carpinella, M.C., Giorda, L.M., Ferrayoli, C.G. and Palacios, S.M. 2003. Antifungal effects of different organic extracts from *Melia azedarach L.* on phytopathogenic fungi and their isolated active components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 2506-2511.

CIDH, 2004. Cierre de ciclo de hortalizas 2003-2004, Resumen Ejecutivo, pp 1-15.

Coventry, E. and Allan, E.J. 2001. Microbiological and chemical analysis of neem (*Azadirachta indica*) extracts: new data on antimicrobial activity. *Phytoparasitica*. 29 (5):1-10.

Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. pp. 564-582.

Franca, S.C., Roberto, P.G., Marins, M.A., Puga, R.D., Rodríguez, A. and Pereira J.O. 2001. Biosíntesis of secondary metabolites in sugarcane. *Genetics and Molecular Biology*, 24 (1-4):243-250.

French, E. R. y Hebert T. T. 1980. Métodos de investigación fitopatológica Instituto Americano de Ciencias Agrícolas Editorial IICA. pp. 165.

Grayer, R.J. and Harborne J.B. 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants 1982-1983. *Phytochemistry*. Vol. 37(1):19-42.

Govindachari, T.R.1992. Chemical and biological investigations on *Azadirachta indica* (The Neem Tree). *Current Science* 63; 117-122.

Govindachari, T.R., Suresh, G. Gopalakrishnan, G., Banumathy, B. and Masilamani, S. 1998. Identification of antifungal compounds from the seed oil of *Azadirachta indica*. *Phytoparasitica*. 26:2 1-8

Govindachari, T.R, Gopalakrishnan, G. and Suresh, G. 1999. Triterpenoidal constituents of an aqueous extract from neem kernels. *Fitoterapia*. 70:558-560.

Iannacone, J. and Lamas G. 2003. Efecto insecticida de cuatro extractos botánicos y del cartap sobre la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae), en el Perú. *Entomotropica*. Vol. 18(2): 95-105.

Isman, M.B., Koul, O., Luczynski, A. and Kaminski, J. 1999. Insecticidal and antifeedent bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38:1406-1411.

Jawdah, Y.A., Sogh, H. and Salameh A. 2002. Antimycotic activities of selected plant flora, growing wild in Lebanon, against Phytopathogenic fungi. *Journal of agricultural and Food Chemistry*. 50: 3208-3213.

Jianming D., Varoujan A., Yaylayan, G.S., Raghavan, V. and Jocelyn R. P. 1999. Extraction and colorimetric determination of azadirachtin-related limonoids in neem seed kernel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 3738-3742.

Johnson, S. and Morgan, E.D. 1997. Comparison of chromatographic systems for triterpenoids from neem (*Azadirachta indica*) seeds. *Journal of Chromatography A*. 761:53-63.

Jones, J.B., Jones, J.P., Stall, R.E. and Zitter, T.A. 1997. Compendium of tomato diseases. APS PRESS. *The American Phytopathological Society*. pp. 14-15, 44-49.

Kaushik N., 2002, Determination of azadirachtin and fatty acid methyl ester of *Azadirachta indica* seeds by HPLC and GLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* OI 10.1007/s00216-002-1638-7.

Koul, O., Isman, M.B. and Ketkar, C.M. 1990. Properties and uses of neem, *Azadirachta indica*. *Canadian Journal of Botanic*. 68:1-11.

Kraus, W. 1995. Biologically active ingredients: azadirachtin and other triterpenoids, in the neem tree *Azadirachta indica* A. Juss and other Meliaceus plants. Weinheim, Germany. pp. 35-74

Kumar, I. and Parmar, B.S. 1996. Physicochemical variation in neem oils and some bioactivity leads against *Spodoptera litura* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:1735-1739.

Kumar, A .R.V., Jayadevi, H.C., Ashoka, H .J., and Chandrashekara, K . 2003. Azadirachtin use efficiency in commercial neem formulations. *Current Science* 84:1459-1464.

Lanting, M. and Palaypayon C. 2002. Forest tree species with medicinal uses. Ecosystems Research and Development Bureau. Department of Environment and Natural Resources College, Laguna 4031. Vol. 11:17.

León, V. M. G. 1999. Potencial de extractos vegetales. *Aconteceres entomológicos*. pp 31-45.

López, P.Y. 2003. Efecto antimicrobiano de extractos de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y Venadillo (*Swietenia humilis* Zucc) contra microorganismos modelo. Tesis de Maestría, CIAD, Unidad Culiacán.

Mahovic, M., Steven A.S. and Bartz, J.A. 2002. Guide to identifying and controlling postharvest tomato diseases in Florida. University of Florida, Extension, Institute of Food and Agricultural Sciences. HS866.

Mari, M. and Guizzardi M. 1998. The postharvest phase: emerging technologies for the control of fungal diseases. *Phytoparasitica* 26:1: 59-66.

Messiaen C.M., Blancard, D., Rouxel, F. y Lafon, R. 1995. Enfermedades de las hortalizas, Ediciones Mundi-Prensa.

Murray, P.R., Kobayashi, G.S., Pfaller, M. A. and Rosenthal, K.S. 1997. *Microbiología médica*. Editorial Harcourt Brace Publishers Internatinal, segunda edición. Pp 297-300

Okemo, P.O., Mwata, W.E., Chhabra, S.C. and Fabry, W. 2001. The kill kinetics of *Azadirachta Indica* A. Juss. (Meliacea) extracts on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *African Journal of Science and Technology*. Science and Engineering Series. Vol. 2(2):113-118.

Olsen, M.W. and Rasmussen, S. 2001. Evaluation of fungicide rotations for control of Powdery Mildew of Cantaloupe. University of Arizona College of Agriculture 2001. Vegetable Report.

Parida M.M., Upadhyay, C., Pandya, G. and Jana, A.M. 2001. Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on Dengue virus type-2 replication. *Journal of Ethnopharmacology*. 79:273-278

Parrota, A.J. and Chaturvedi, A. N 1994. *Azadirachta indica* A. Juss. Margosa neem, margosa. SO-ITF-SM-70. New Orleans, LA. US Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, pp 65-72.

Pérez, J.E., Maíz, J., Alfonsi, C., Gómez, H.J., Nirchio, M. y Manzi, L., 2004. ¿Tienen las plantas más compuesto activos que los animales?. *Tecnociencia*, Vol. 6(1):153-169.

Pérez, M.C. y Serra, C. A. 2001. *Red Apícola Dominicana (REDAPI)*, Publicación del Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal. pp 1-4.

Romero, C.S. Dr. 1993. Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma de Chapingo. Dirección del Patronato Universitario, A.C. pp 105-109.

Ruiz, H. J. 2001. El asombroso reino de los hongos. *Avance y Perspectiva*. 20:275-281.

SAGARPA, 2001. Validación de Hortalizas, Informe Final, Publicación especial no. 2 pp. 1.

Schmid, L. and Joker, D. 2000. Seed leaflet *Azadirachta indica* A. Juss Danida Forest Seed Centre No. 12 September 2000.

Schmutterer, H. and Ascher K.R. 1983. Natural pesticides from the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other tropical plants. Proceedings of the 2nd Internat, Neem Conference, Rauschholzhausen, Federal Republic of Germany, 25-28 May, 1983. pp 18-35.

Silveira, N.S., Michereff, S.J., Mariano, R.L. Tavares, L.A. y Maia, L.C. 2001. Influencia da temperatura, período de molhamneto e concentracao do inóculo de fungos na incidencia de podridoes pos-colheita em frutos de tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*. 26(1).

Singh, U.P. and Prithiviraj, B. 1997. Neemazal, a product of neem (*Azadirachta indica*), induces resistance in pea (*Pisum sativum*) against *Erysiphe pisi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51, 181-194.

Smilanik, J.L., Crisosto, C. and Mlikota, F. 1999. Postharvest use of ozone on fresh fruits. *Perishables Handling Quarterly Issue* No. 99. pp 10-14.

Stauffer, A.B., Orrego, F.A. y Aquino, A.J. 2000. Selección de extractos vegetales con efecto fungicida y/o bactericida. *Revista de Ciencia y Tecnología*. Dirección de Investigaciones-UNA Vol. 1 No. 2:29-33.

Suresh, G., Narasimhan, N.S., Masilamani, S., Partho, P.D. and Gopalakrishnan, G. 1997. Antifungal fractions and compounds from uncrushed green leaves of *Azadirachta indica*. *Phytoparasitica*, 25(1):33-39.

Sutherland J., Baharally, V. and Permaul, D., 2002. Use of the botanical insecticide, neem to control the small rice stinkbug *Oebalus poecilus* (Dallas 1851) (Hemiptera:Pentatomidae) in Guyana. *Entomotriopica*. Vol. 17(1):97-101.

Theis, N. and Lerdau, M. 2003. The evolution of function in plant secondary metabolites. *Journal of Plant Science*, 164 (3 Suppl.): S93-S102.

Therapeutic Goods Administration (TGA), 2001. Evaluation of cold-pressed oil from the seeds kernels of *Azadirachta indica* A. Juss (neem) for use in listable therapeutic goods. Australian department of Health and ageing. pp 1-30.

Tortora, G.J., Funke, B.R. and Case, C.L., 1995. *Microbiology an Introduction*, 5th. Edition. The Benjamin/Coming Publishing Company, Inc. USA. pp 128-130.

Walters, D.R., Walker, R.L. and Walker K.C. 2003. Lauric acid exhibits antifungal activity against plant pathogenic fungi. *Journal Phytopathology*. 151:228-230.

Williams, J.R., Christine Y.S. Peng, R., Chuang, Y., Roy H. D. and Mussen, E.C. 1998. The inhibitory effect of azadirachtin on *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood in the honeybee, *Apis mellifera* L. *Journal of Invertebrate Pathology*. 72:252-257.

Xu, L. 1999. Use of ozone to improve the safety of fresh fruits and vegetables. *Food Technology*. Vol. 53(10):58-63

Zeringue, H. and Bhatnagar D., 1990. Inhibition of aflatoxin production in *Aspergillus flavus* infected cotton bolls after treatment with neem (*Azadirachta indica*) Leaf Extracts. *JACOS*. Vol. 67(4):215-216

Williams, J.R., Christine Y.S. Peng, R., Chuang, Y., Roy H. D. and Mussen, E.C. 1998. The inhibitory effect of azadirachtin on *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood in the honeybee, *Apis mellifera* L. *Journal of Invertebrate Pathology*. 72:252-257.

Xu, L. 1999. Use of ozone to improve the safety of fresh fruits and vegetables. *Food Technology*. Vol. 53(10):58-63

Zeringue, H. and Bhatnagar D., 1990. Inhibition of aflatoxin production in *Aspergillus flavus* infected cotton bolls after treatment with neem (*Azadirachta indica*) Leaf Extracts. *JACOS*. Vol. 67(4):215-216