



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**Facultad de Química**

**Aislamiento, Identificación y Control de Posibles  
Fitopatógenos en Experimentos con Barbasco y  
Limón, a Nivel de Invernadero.**



**EXHIBICIÓN DE TESIS  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**T E S I S**

**Que para obtener el título de:**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P r e s e n t a :**

**MARIA RAMIREZ PEREZ**

**México, D. F.**

**1982**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## C O N T E N I D O

	Página
1.- INTRODUCCION Y OBJETIVO	1
2.- REVISION DE LITERATURA	4
2.1 Generalidades sobre Hongos.	4
2.1.2 Taxonomía, características e importancia de los hongos en estudio.	7
2.2 Generalidades sobre Barbasco.	10
2.2.1 Importancia, distribución y descripción de las especies más importantes.	11
2.3 Generalidades sobre el Limón mexicano.	15
2.3.1 Importancia y aplicación.	17
2.4 Generalidades sobre Fungicidas.	20
2.4.1 Características de los fungicidas empleados.	22
3.- MATERIALES Y METODOS	31
3.1 Aislamiento	34
3.1.1 Muestreo	34
3.1.2 Desinfección	34

	Página
3.1.3 Inoculación e incubación	34
3.1.4 Obtención de cultivos puros	35
3.2.1 Identificación parcial	36
3.2.2 Conservación	37
3.3 Pruebas de Patogenicidad	37
3.3.1 Propagación de las cepas	37
3.3.2 Desinfección e inoculación de los árboles	37
3.3.3 Reaislamiento	39
3.4 Identificación	39
3.4.1 Observación de la morfología colonial	39
3.4.2 Observación de la morfología <u>microscópica</u>	39
3.5 Pruebas de control "in vitro"	41
3.5.1 Soluciones de fungicidas	41
3.6 Pruebas de control "in vivo"	43
3.6.1 Pruebas para prevenir infecciones	43
3.6.2 Pruebas para controlar infecciones	45
4.- RESULTADOS	48

	Página
5.- DISCUSION	60
6.- RESUMEN	66
7.- CONCLUSIONES	68
8.- BIBLIOGRAFIA	70

INTRODUCCION Y

OBJETIVO

## 1.- INTRODUCCION Y OBJETIVO

La producción vegetal es esencial para el sostenimiento de la vida humana y animal en nuestro planeta. Este proceso-dinámico es influido por factores ecológicos, en forma positiva o negativa, así como por las necesidades de consumo; lo que determina cambios en la ecología natural, e introducción de nuevas alternativas de cultivo. Lo que trae consigo nuevos problemas de manejo de las plantas, y de sa lud y enfermedad de las mismas.

Para cada variedad o especie vegetal existe un conjunto de condiciones ambientales, que favorecen su desarrollo óptimo.

Cuando una planta es continuamente afectada por algún factor que interfiere con su estructura normal, o actividades fisiológicas, se dice que está enferma. Una planta se con sidera enferma, cuando no se desarrolla o produce normalmente.

Las enfermedades de las plantas se dividen en dos grupos - principales: Fisiogénicas, o sea, aquellas provocadas por factores abióticos, como son las condiciones del suelo: hu medad, estructura física, provisión de oxígeno com posición química; las condiciones meteorológicas: luz, temperatura, humedad relativa, viento, lluvia, granizo. Las prácticas-agrícolas inadecuadas, y la contaminación atmosférica.

Y aquellas causadas por parásitos: bacterias, hongos, vi-

rus, nemátodos, etc. denominadas enfermedades parasitarias o infecciosas.

Las enfermedades que se van a considerar en este caso, son las causadas por hongos.

Los hongos parásitos causan enfermedades infecciosas, que, a menudo se propagan fácilmente, de las plantas enfermas - a las plantas sanas. (26, 31)

Las pérdidas causadas por este tipo de microorganismos son muy cuantiosas. Por ejemplo, para el caso específico del aguacate, en México se han reportado pérdidas hasta del - 10%. La "pudrición negra" que disminuye significativamente la producción del cacao, ocasionando cuantiosas pérdidas en El Soconusco y otros lugares del Estado de Chiapas, es producida por un hongo que ataca las flores, mazorcas, - ramas, tallos y hasta las raíces de los árboles de cacao.

Lo anterior indica la importancia que tiene la aplicación de medidas preventivas o curativas, a nivel agrícola y experimental, pues se ha observado que a nivel de invernadero, frecuentemente se presentan contaminaciones por microorganismos que alteran el desarrollo de las plantas en estudio. Por lo cual, en el presente trabajo, se tiene como objetivo, aislar e identificar a hongos establecidos en barbasco y limón, en experimentos que se están realizando en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química. Así mismo, aplicar métodos químicos de su control, - investigando el fungicida más efectivo para controlar o - erradicar estos hongos.

REVISION DE LITERATURA

## 2.- REVISION DE LITERATURA

### 2.1 Generalidades sobre Hongos.

Los hongos son plantas simples que carecen de clorofila; - obtienen sus nutrimentos de las plantas y animales vivos, - o de las plantas y animales en proceso de descomposición, - que constituyen la llamada materia orgánica, contribuyendo a su degradación.

Un hongo típico, usualmente empieza su vida en forma de - una espora microscópica, que puede compararse en su fun- - ción, a la semilla de una planta superior. En condiciones de profundidad y humedad adecuadas, la espora germina y - produce una o más ramificaciones filamentosas, llamadas - hifas.

Las hifas, o ramificaciones, crecen y dan origen al mico- - lio, o cuerpo fungoso. El micelio varía en sus caracterís- - ticas, observándose como un conjunto de filamentos mezcla- - dos en forma laxa, o bien en forma compacta, dando la apa- - riencia de masa velluda, o bien, de un cuerpo uniforme só- - lido, más o menos compacto.

Un micelio parasítico puede crecer en la superficie de una planta hospedera apareciendo como delicados filamentos - - blanquecinos, o como pequeñas manchas negras o cafés, que- - dan el aspecto de tizne; este color se debe a la formación de esporas sobre el micelio.

En otros casos el micelio puede estar completamente en el interior de la planta hospedera, y no ser evidente en la superficie de la misma, produciendo alteraciones metabólicas que ocasionan el marchitamiento.

Los hongos que crecen sobre o dentro de una planta viva y obtienen su nutrición de ella, son llamados parásitos, y la planta viva se llama hospedero. Los hongos que obtienen su nutrición de la materia orgánica muerta, son llamados saprófitos.

Ciertos hongos tienen la propiedad de ser, tanto saprófitos como parásitos.

Las hifas de los hongos pueden penetrar a una planta por medio de una lesión de la misma (abertura natural directa) o forzando su entrada sobre la epidermis.

Las esporas juegan un papel importante en la multiplicación, diseminación, y supervivencia del hongo; son fácilmente transportadas por corrientes de aire, agua, insectos, hombre, animales y plantas.

Se tiene conocimiento de que ciertas esporas de hongos han sido encontradas a 24,384 m. o más, de altitud, descendiendo frecuentemente a sustratos adecuados, por efecto del agua de lluvia, donde inician su desarrollo.

Ciertas esporas resisten condiciones desfavorables de crecimiento, tales como calor y frío extremos, desecación e inundación.

Las esporas de ciertos hongos pueden permanecer latentes - por muchos años.

Cuando persisten en el suelo, son extremadamente difíciles de destruir.

Determinados hongos no producen esporas, éstos, se multiplican por formación de masas compactas de hifas, llamadas esclerocio, que corresponden a fragmentos del cuerpo fúngico, los que son diseminados por el agua, el hombre, y - - otros agentes.

Los hongos son más abundantes y perjudiciales a las plantas en áreas húmedas que en zonas áridas. Esto se debe a que la humedad es esencial para que se efectúe su reproducción, extensión, penetración, e infección en las plantas.-

Los hongos causan la mayoría de las enfermedades infecciosas o parasíticas en las plantas, incluyendo todo tipo de enmohecimiento, tizón, roya, costra, mancha de hojas, putrefacción de la raíz, tallo y fruto, marchitamiento de hojas, etc.

La mayoría de las esporas e hifas de los hongos, son fácilmente destruidas por condiciones adversas. Conociendo las condiciones habituales de su desarrollo, se pueden tomar - medidas efectivas de control.

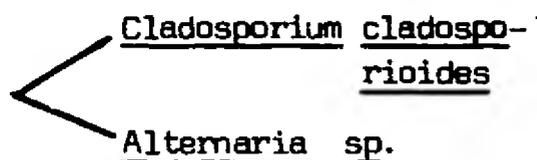
2.1.2 Taxonomía, características generales de los hongos-  
en estudio, y enfermedades que producen.

Posición taxonómica, según clave de Barnett H. L. 1972.

Clase : Deuteromycetes

Orden : Moniliales

Familias :            Moniliaceae    — Penicillium sp.

Dematiaceae     Cladosporium cladospo-  
rioides

Alternaria sp.

Stilbellaceae

Tuberculariaceae

Penicillium sp.

Características.— El micelio aéreo es casi siempre incoloro. Comúnmente aparecen áreas de hifas amarillas y rojas - en la sección biverticilada-simétrica, pero en el examen - microscópico, la sustancia colorante se encuentra distri- buída como gránulos en la superficie de la pared celular.

El micelio sumergido de varias especies, se observa de di- ferentes colores: amarillo, naranja, rojo, castaño, lila -

con áreas verdes o negras; dependiendo de la composición - del sustrato.

Conidióforos: son simples, tienen el aspecto de un pequeño pincel.

Conidias: son elípticas, globosas o subglobosas, y pueden ser rugosas o lisas.

Algunas especies importantes en Fitopatología son:

P. italicum: Agente causal de la pudrición de fruto en cítricos.

P. digitatum: Agente causal de la pudrición de fruto en sandía y cítricos.

P. sp. Agente causal: enfermedad en el almacenamiento de la cebolla

Penicillium del grano en el arroz

Pudrición del grano en el maíz

Pudrición verde en la manzana

### Cladosporium.

Características.- Micelio inmerso, y frecuentemente también, superficial, septado.

Conidióforos: Perfectamente diferenciados del micelio, lisos o verrugosos, rectos o flexibles; generalmente no ramificados, o con ramificaciones limitadas a la región apical.

Conidia: Enlazada generalmente, pero a veces es solitaria, simple, cilíndrica, elipsoidal, fusiforme, ovoide, esférica o subesférica; de color pardo a oscuro, oliva castaño, o castaño; lisa, verrugosa, o erizada.

Algunas especies importantes en Fitopatología son:

C. herbarium: Agente de "El mal negro de los cereales".

C. carpophyllum: Causante de "La sama del duraznero".

C. sp. Produce ataque secundario de la hoja encítricos.

C. cucumerinum: Causante de la enfermedad conocida como "cucumber" en cucurbitáceas.

C. fulvum: Produce moho en la hoja, y pudrición en la parte terminal del fruto en el tomate.

### Alternaria.

Características.-- Presenta micelio septado, de colores oscuros, generalmente negruzcos.

Conidióforos: cortos, erectos.

Conidias: pluricelulares, en cadenas, las cuales presentan tabiques longitudinales y transversales.

Entre las especies conocidas en Fitopatología se pueden citar las siguientes:

- A. dianthi: Causante de "La mancha gris" del clavel.
- A. brassicae: Causante de "La mancha negra" del repollo, que puede atacar a otros vegetales, como - el nabo, coliflor, etc.
- A. citri: Agente etiológico de "La podredumbre interna" de los frutos cítricos.
- A. solani: Causante de la enfermedad de la papa llamada "tizón temprano".
- A. mali: Produce la enfermedad llamada "corazón - mohoso" de la manzana.
- A. sp.: Ocasiona la pudrición en aguacate y ataca - también al papayo, al guayabo y la vid.

## 2.2 Generalidades sobre el Barbasco.

El barbasco pertenece a la familia Dioscoreacea, género - Dioscorea.

### Características del género Dioscorea:

Son plantas trepadoras, con bases rizomatosas o tuberosas, los tubérculos generalmente son hipógenos y en algunas especies son epígeos; son grandes y con corteza escamosa; el tallo es sinuoso, algunas veces angular, liso y terso, ocasionalmente espinoso; hojas pecioladas, a menudo en forma de corazón, con una punta larga, y redondeadas o truncadas en la base; presentan de tres a 13 nervaduras, las que aparecen desde la inclinación del nervio central; son reticuladas, horizontales, y se conectan con las venas principales. (24)

Las dioscoreas son un grupo de plantas de tipo monocotiledóneo, de las cuales existen más de cien especies en México, que se localizan desde el nivel del mar, hasta los 2,600 m. de altitud; su distribución corresponde a zonas de climas cálido-húmedos, subcálido-húmedos, subtemplados y templados.

#### 2.2.1 Importancia, distribución y descripción de las especies más importantes.

El barbasco es una planta tropical que se encuentra en forma silvestre en México, y de cuyo rizoma o camote se extrae la diosgenina, usada para elaborar hormonas y anticonceptivos; entre sus derivados se encuentran las hormonas corticales, que sirven para aliviar diversos males, como la artritis, reumatismo, quemaduras intensas, asma, infecciones de la piel, ojos y oídos.

Las hormonas masculinas derivadas del barbasco se utilizan

para rehabilitar tejidos anormales, y las femeninas, para aliviar síntomas menopáusicos.

A partir de los años 1943-44, el Dr. Russell Marker, que trabajó en México, sintetizó la hormona conocida como progesterona, cuya fórmula química es muy parecida a las hormonas esteroides animales, a partir de la diosgenina obtenida de la "cabeza de negro" (Dioscorea mexicana).

Desde ese momento, debido a la gran demanda de ésta y - - otras sustancias hormonales, que se sintetizaron posteriormente, se generó una gran industria química, que en un - - principio se sostenía a partir de camotes de Dioscorea mexicana (cabeza de negro). Posteriormente en 1949, se dirigió la demanda hacia la Dioscorea composita, conocida comúnmente como barbasco.

En la actualidad, la demanda abarca además, *D. floribunda* y *D. spiculiflora* aunque en menor escala.

El rizoma del barbasco se ha venido explotando en forma - silvestre, en los Estados de Veracruz, Chiapas, Tabasco, - Oaxaca y Puebla.

Se ha observado que la mayor producción ocurre en los actuales (fases seriales de 20-25 años de edad de los tipos vegetativos primarios) cuyas características, son las más idóneas para el desarrollo de una planta con rizomas perennes, guías anuales y heliófilas.

Distribución de las especies mexicanas más importantes:

Dioscorea composita Hemsl. "barbasco rojo".

Se distribuye en los Estados de Veracruz, Puebla, Oaxaca, Tabasco y Chiapas. El rizoma es ramificado y subterráneo, lo que proporciona mayor oportunidad de regeneración por fracturación. El contenido de Diosgenina es de 0 - 13 %.

Dioscorea floribunda Mart et Gal. "barbasco amarillo".

Crece en los Estados de Veracruz, Oaxaca, Tabasco, Campeche, Yucatán, Chiapas y Guerrero.

Su rizoma es ramificado, con tamaños menores a los de D. composita; contiene alrededor de 0.2 - 10 % de diosgenina.

Dioscorea spiculiflora Hemsl. "barbasco blanco".

Se localiza en los Estados de Yucatán, Campeche y Chiapas; contiene de 0.7 - 1.5 % de diosgenina.

Los rendimientos y pureza de la diosgenina, sin embargo, varían dentro de una misma especie, de acuerdo a su situación ecológica; también la velocidad de crecimiento y disponibilidad, varían entre especies, por ejemplo: para Dioscorea composita se obtienen rendimientos de diosgenina, de 5 - 7 % en lotes de barbasco secos obtenidos en el norte de Oaxaca, mientras que, en Pichucalco, Chis. es de 3 - 4 %, pero la diosgenina se encuentra mezclada con otras sapogeninas, como la penogenina y la yamogenina, dando como resultado la elevación del costo industrial en la-

extracción primaria.

La D. floribunda contiene diosgenina de mayor pureza en - ciertas áreas, pero la planta se encuentra más dispersa y con menor disponibilidad, haciendo más difícil su concen- tración; esto mismo se puede decir para las otras especies, pero la factibilidad para su cultivo es alta.

El barbasco es una planta que se puede reproducir por semi- lla, trozos de rizoma, o corte de tallo y hojas; siendo la reproducción por semilla, donde se ha adquirido mayor expe- riencia, habiéndose detectado técnicas sobre colecta, mane- jo y almacenamiento de ella, lo que ha permitido llevar a- cabo reproducciones masivas de las especies comerciales.

Considerando que el barbasco es una planta dioica, la semi- lla que se trabaja es, en su mayoría, de origen silvestre, dando lugar a poblaciones muy heterogéneas.

El barbasco es una fuente importante de divisas, y el me- dio de subsistencia de un gran número de familias de campe- sinos de las regiones del trópico húmedo de México, México abastece actualmente el 60 % de las necesidades mundiales- de esteroides, mediante la producción de barbasco. (?)

### 2.3 Generalidades sobre el Limón Mexicano.

#### Origen.

Se cree que es nativo de la región comprendida por el Archipiélago Malayo, regiones tropicales y subtropicales de Asia.

A principios del siglo XVI fue traído por los españoles a las "Indias Occidentales" y se extendió a Florida y México.

#### Clasificación.

Pertenece a la familia de las Rutáceas, género Citrus, y su nombre científico es: Citrus aurantifolia; también se le llama lima ácida.

#### Principales variedades:

Limón mexicano o lima ácida.

Limón italiano.

Limón canario.

Limón Lisboa.

Limón Eureka.

### Características.

El árbol es de tamaño mediano a grande, con copa generalmente abierta y ramas provistas de espinas de color grisáceo. Las hojas son de color verde pálido, con ápice agudo y bordes aserrados. Sus flores son hermafroditas, de color morado blanquecino, por lo cual los capüllos parecen rojizos. El fruto es ovalado, de piel algo gruesa, de color verde-amarillo, y provisto de glándulas oleíferas; la pulpa es amarillo verdoso, de sabor ácido. Las semillas son ovoides, pequeñas, puntiagudas, lisas y blancas.

### CONTENIDO NUTRITIVO POR FRUTO

(análisis químico)

CONCEPTO	CANTIDAD
Calorías	30
Proteínas	1.0 gr.
Grasa	0.2 gr.
Hidratos de carbono	9.2 gr.
Calcio	25 mg.
Fósforo	23 mg.
Hierro	1.48 mg.
Tiamina	0.06 mg.
Riboflavina	0.03 mg.
Niacina	0.2 mg.
Acido ascórbico	42 mg.

### 2.3.1 Importancia y aplicación

En cuanto a las propiedades medicinales e industriales, se puede decir que es fuente de vitamina C.

#### Usos:

El zumo natural, o conservado, se destina a la preparación de bebidas refrescantes, en confitería, en perfumería; además se utiliza el fruto como guarnición y otros usos culinarios.

Como fruta procesada, sus posibilidades son muy amplias, - ya que, sirve como base para la obtención de productos industriales, tales como: aceites esenciales, terpenos, pectinas, ácido cítrico, jugos, compostas, cáscaras cristalizadas; enzimas, vitaminas, confitados, forrajes, etc.

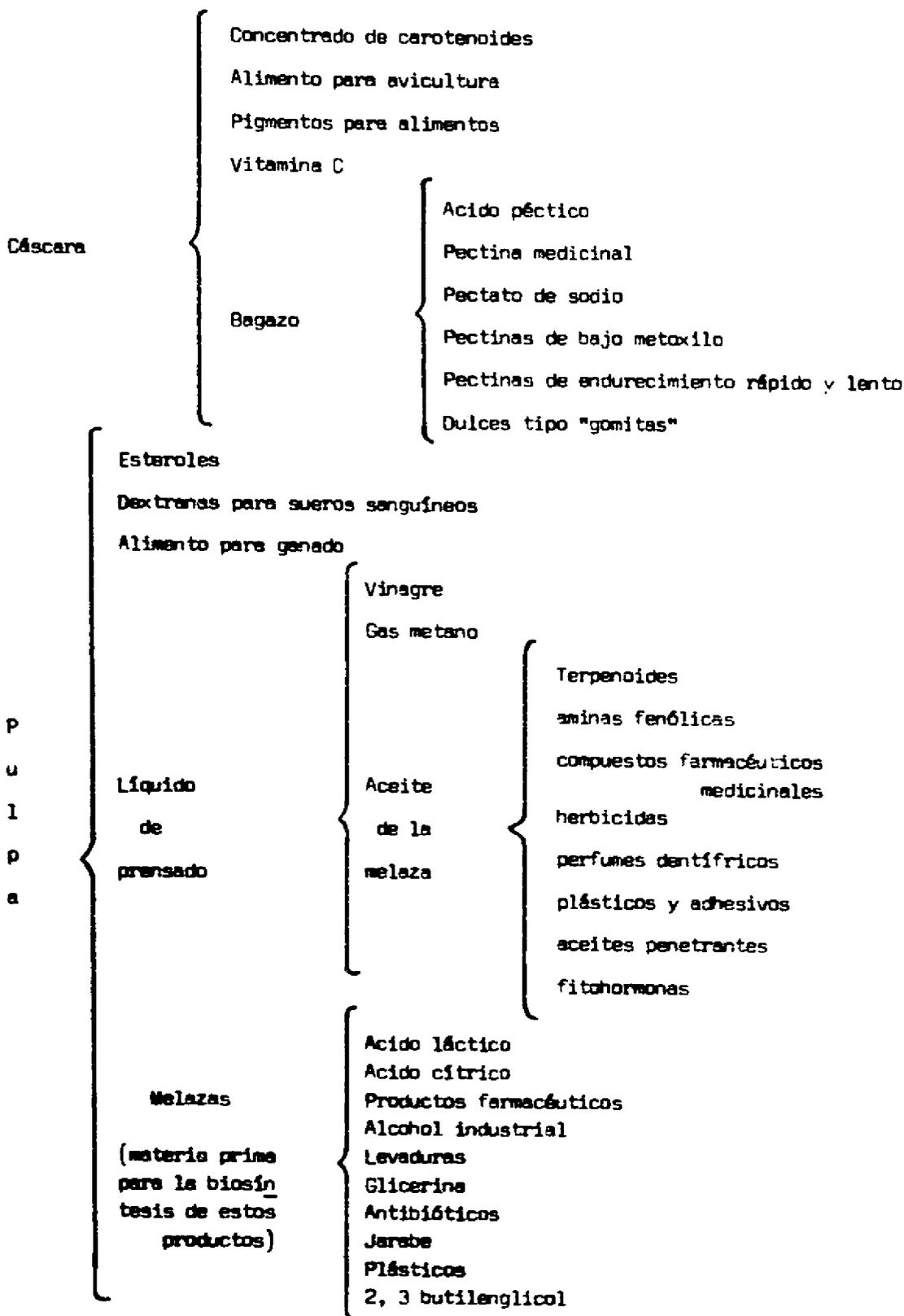
#### Algunos productos obtenidos de las diferentes partes del limón.

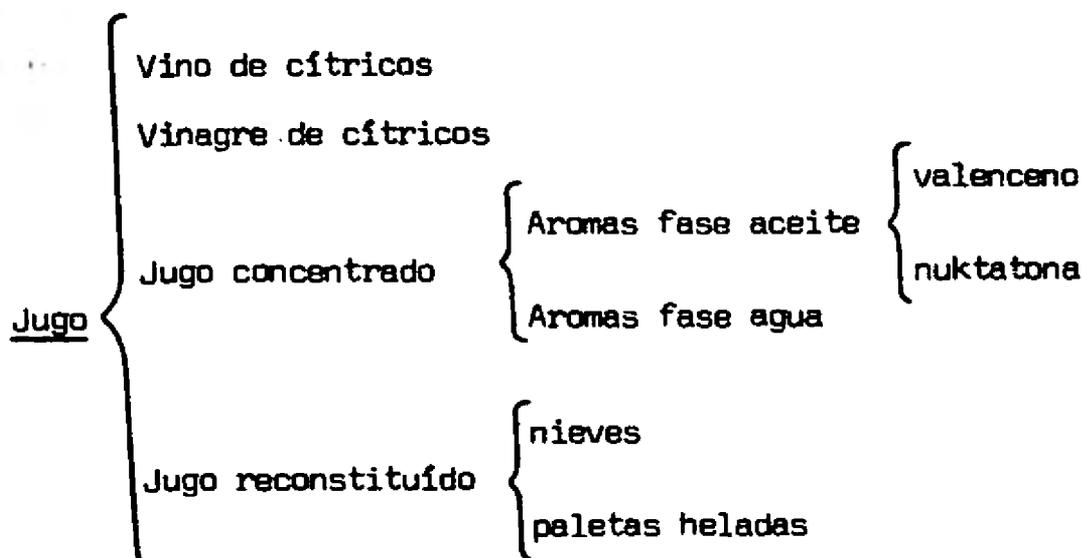
Hojas	}	Aceites de hoja.
		Compuestos nitrogenados.
		Perfumes.
		Descongestionantes de sinefrina.
		Prolina.
		Octamina.

Flores: Miel de cítricos.

Productos del fruto:

Membrenas	}	Celdillas congeladas	{	bebidas	
				rellenos para pastel	
		Cáscaras deshidratadas	{	sabores para repostería	
				bebidas en polvo	
		Flavonoides y bioflavonoides	{	tangeritina	hespartina
		hespiridina	ácido pirocatecólico		
		nobiletina			
		pigmentos			
		endulzantes			
		ácido P - hidroxibenzoico			
		Aceite centrifugado	{	saborizantes	
				desodorantes industriales	
				cumarinas	
				limetina	
				aceite destilado:	
					- sabores
					- perfumes
					- jarabe





#### 2.4 Generalidades sobre fungicidas.

Los fungicidas son productos químicos que inhiben la germinación de las esporas o el crecimiento del micelio, sin destruir el cuerpo del hongo, propiamente deben ser llamados fungistáticos, aunque existen conservadores orgánicos que actúan como verdaderos fungicidas, eliminando los hongos aún después de manifestarse la enfermedad, reprimiendo o erradicando dicha enfermedad.

Los fungicidas sistémicos tienen la propiedad de pasar a través de la epidermis de las hojas, flores, tallos, raíces, o semillas de las plantas, incorporándose a la savia, la cual los transporta a todas las partes de la planta, inhibiendo, de este modo, el desarrollo de microorganismos parásitos.

## Actividad biológica de los fungicidas.

El mecanismo de acción de los fungicidas se conoce sólo — parcialmente, sin embargo, sobre este aspecto existen varias teorías generales sobre la forma de penetración y la manera en que actúan sobre la célula, ya que, en seguida — que los fungicidas penetran en la membrana celular o en el citoplasma, pueden actuar por diversos caminos, para interrumpir las funciones vitales.

Se postula que el residuo insoluble en agua de los fungicidas libera lentamente algunas moléculas, las cuales pasan al interior del hongo, acumulándose en cantidad suficiente para envenenarlo.

Otra teoría postula que cuando un hongo crece excreta sustancias en el medio y esas sustancias transforman el compuesto fungicida en un compuesto soluble tóxico. Según — esta teoría el hongo desempeña un papel activo en la eliminación de sí mismo.

Teorías más actualizadas postulan que el efecto fungicida se debe a algunos de los siguientes factores:

- 1.- La precipitación de las proteínas causada principalmente por la formación de quelatos de las proteínas con los metales pesados.
- 2.- Interferencia del compuesto fungicida con los sistemas enzimáticos.
- 3.- Antagonismo de los metabolitos esenciales con el fungicida, en el interior de la célula.

4.- Reacciones de oxidación - reducción del fungicida con los compuestos celulares.

2.4.1 Características de los fungicidas empleados en el presente trabajo.

### 1. MILCURB

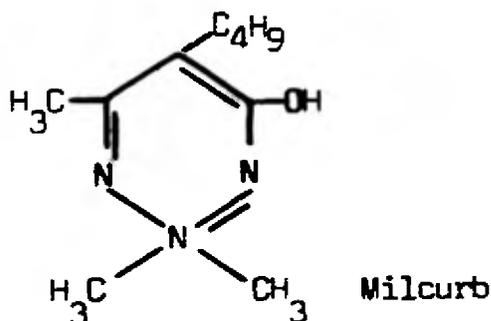
Nombre químico: 5 - n - butil - 2 , 2 - dimetilamino - 4 hidroxí - 6 metil pirimidina.

Nombre común: Dimetirimol.

Acción: Fungicida sistémico.

Toxicidad: LD 50=2,350 mg / kg

Presentación: Líquido cuya concentración para diluirse es de 125 g/l.



Es un fungicida sistémico que erradica el moho que afecta a cucurbitáceas, melones, y ciertas plantas ornamentales.

Una aplicación al suelo, puede protegerlo por seis semanas, o más.

## 2. BENLATE

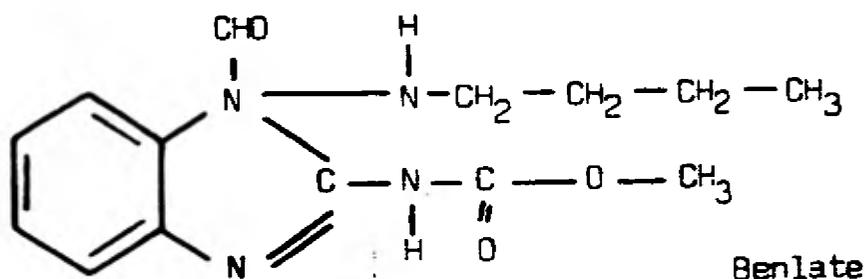
Nombre químico: Metil - 1 - (butil carbamil) - 2 - bencimidazolcarbamato.

Nombre común: Benomyl.

Acción: Fungicida sistémico.

Toxicidad : LD 50 > 10,000 mg/Kg

Presentación : Sólido soluble 50 % en H<sub>2</sub>O



Es un fungicida sistémico de baja toxicidad que presenta - gran poder residual y un amplio rango de acción en enfermedades causadas por hongos en fruta encerada y almacenada y en vegetales y plantas ornamentales.

### 3. ZINEB O PARZATE

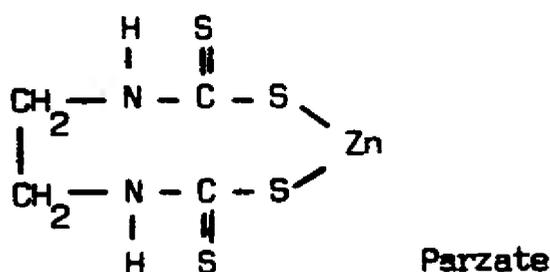
Nombre químico: Etilbisditiocarbamato de Zn.

Nombre común : Zineb

Acción : Fungicida

Toxicidad : LD 50 oral = 5,200 mg/Kg

Presentación : Sólido soluble 85 % en H<sub>2</sub>O



Es un compuesto empleado, como bactericida y como fungicida, es inestable al calor, a la humedad y a la luz, pudiendo - ser fitotóxico.

Es incompatible con medios alcalinos, compuestos cuaterna-

rios de amonio, derivados organomercúricos y sulfato de hierro.

#### 4. DIFOLATAN.

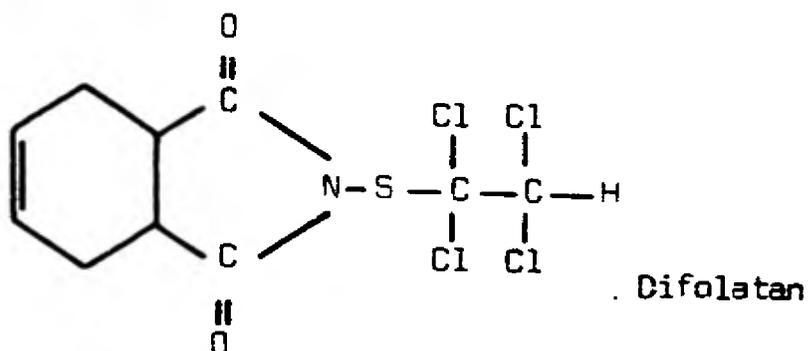
Nombre químico: Cis - N - (1, 1, 2, 2 tetracloroetil) tio - 4 ciclohexano - 1, 2 dicarboximida.

Nombre común : Captafol.

Acción : Fungicida.

Toxicidad : LD 50 = 6,200 mg/Kg

Presentación : Líquido conteniendo 0.4 Kg/l



Es un compuesto insoluble en agua, incompatible con otros fungicidas o productos alcalinos, es erradicante, inócuo a los seres humanos, animales superiores y plantas; pues, incluso a dosis elevadas, no causa daño a la vegetación.

## 5. MELPREX O VANODINE.

Nombre químico: Acetato de n - dodecilguanidina.

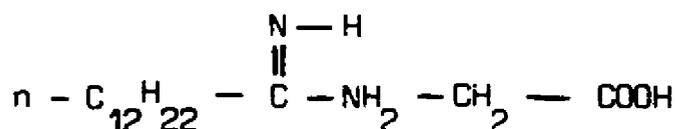
Nombres comunes Vanodine, dodine.

Acción : Fungicida.

Toxicidad : LD 50 oral = 1,000 mg/Kg

LD 50 dérmica = 1,500 mg/Kg

Presentación : Sólido, soluble 65 % en H<sub>2</sub>O



## Melprex

Es fungicida y bactericida de amplio rango de acción, tiene poder residual, acción inmediata, se adhiere fácilmente al tejido vegetal, es de gran estabilidad sistémica y no es fitotóxico. Su cualidad más relevante es su capacidad para erradicar infecciones ya implantadas; por tanto, se considera curativo.

Empleándose a las dosis recomendadas, se usa como fungicida en tratamientos de postcosecha en frutos.

## 6. MANZATE.

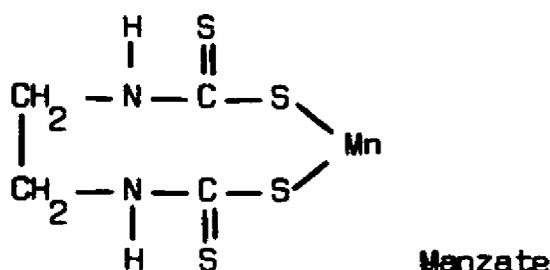
Nombre químico: Etilbisditiocarbamato de manganeso.

Nombre común : Maneb o Manzate

Acción : Fungicida.

Toxicidad : LD 50 oral = 6,750 mg/Kg

Presentación : Sólido, soluble 80 % en H<sub>2</sub>O



Es el menos tóxico de los etilbisditiocarbamatos, se descompone con el calor y en presencia de humedad, produciendo ácido sulfhídrico y otros productos, como polisulfuros de cobre, que dan un color oscuro al producto en tratamiento, resultando fitotóxico. Es poco resistente a las lluvias e incompatible con productos alcalinos.

Se utilizó el Manzate (etilbisditiocarbamato de manganeso al 80 %) sinónimo de Maneb, que tiene grandes propiedades de adherencia, dispersión y humectabilidad.

## 7. SAPROL.

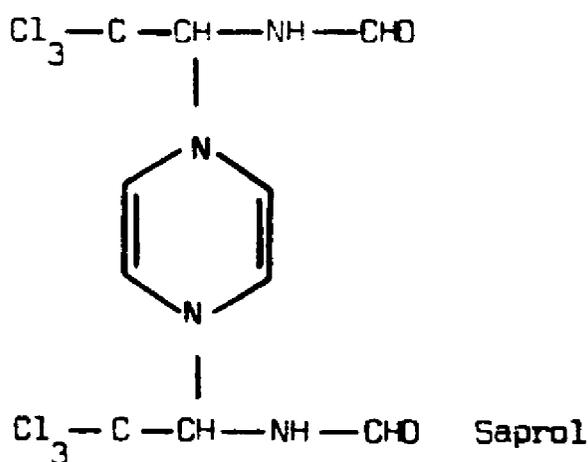
Nombre químico: N - N' [1, 4 - piperamina di - bis - (2, 2 tricloroetildeno)] bis - (formamida)

Nombre común : Triforine.

Acción : Fungicida.

Toxicidad : LD 50 > 16,666 mg/Kg

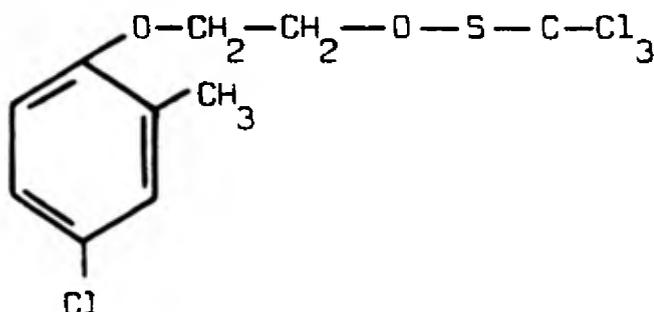
Presentación : Concentrado emulsificable.



Es un fungicida sistémico, curativo, fácilmente absorbido por los tejidos vegetales, y con amplio espectro de acción.

## COMPUESTOS "26" y "28"

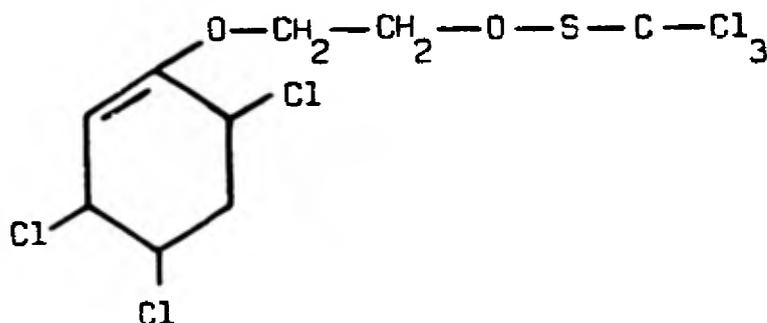
"26"



1 - triclorometansulfenil oxi - 2 - (4 cloro - 2 - metil fenoxi) etano.

Es un compuesto sólido, blanco, más o menos compacto.

"28"



1 - triclorometansulfenil oxi - 2 - (2,4,5 - tricloro fenoxi) etano.

Es un compuesto líquido, espeso, color anaranjado.

MATERIALES Y METODOS

### 3.- MATERIALES Y METODOS .

Con objeto de alcanzar las metas señaladas, este estudio - fue dividido en dos etapas:

La primera, referente al aislamiento e identificación de - los posibles fitopatógenos.

La segunda, relacionada con el control químico de estos - hongos.

En los diagramas uno y dos, se esquematiza, de manera general, la secuencia de cada una de las etapas, y posteriormente, se describe con detalle la metodología empleada.

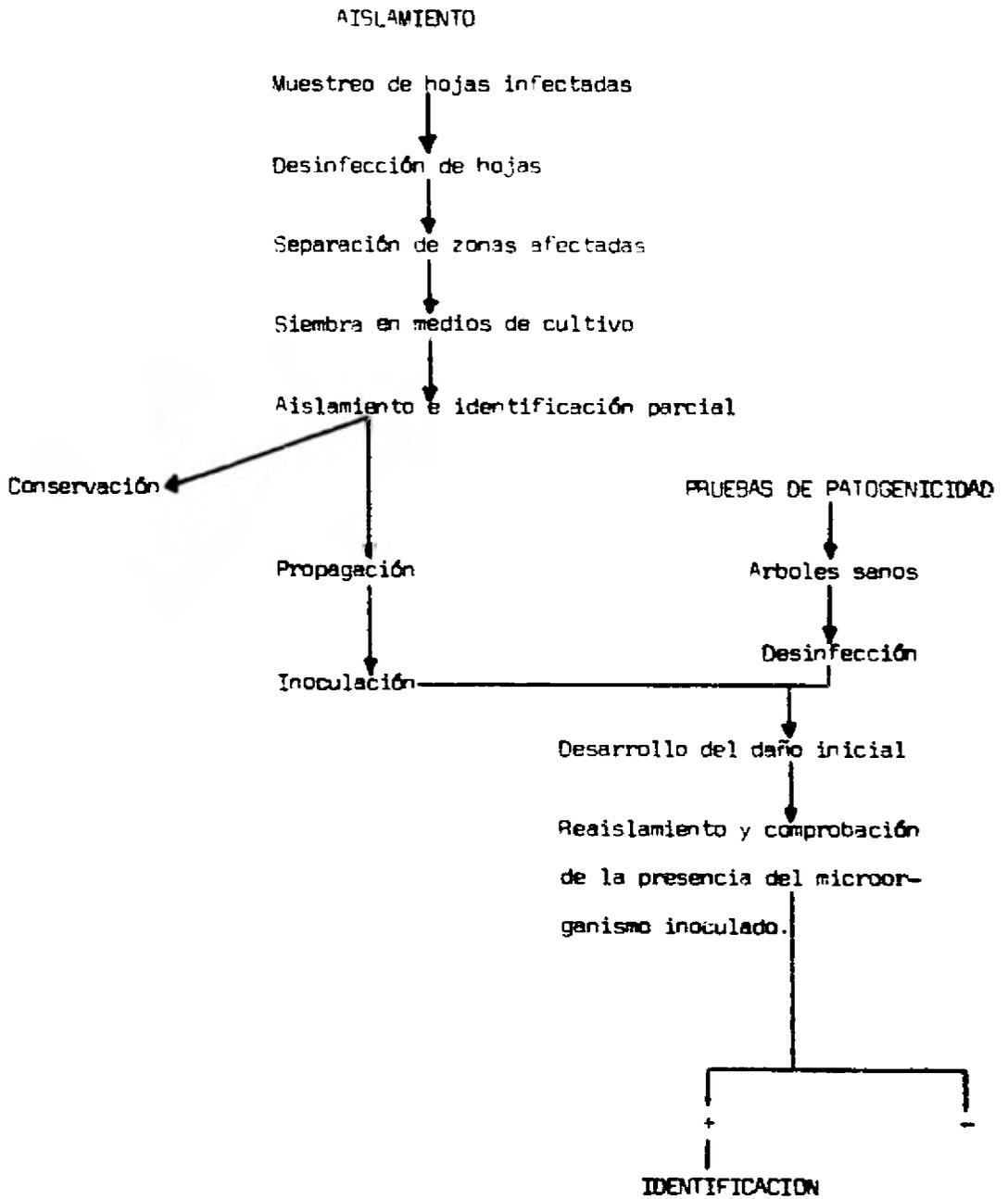


Fig. 1.- Secuencia de la primera etapa del Experimento.

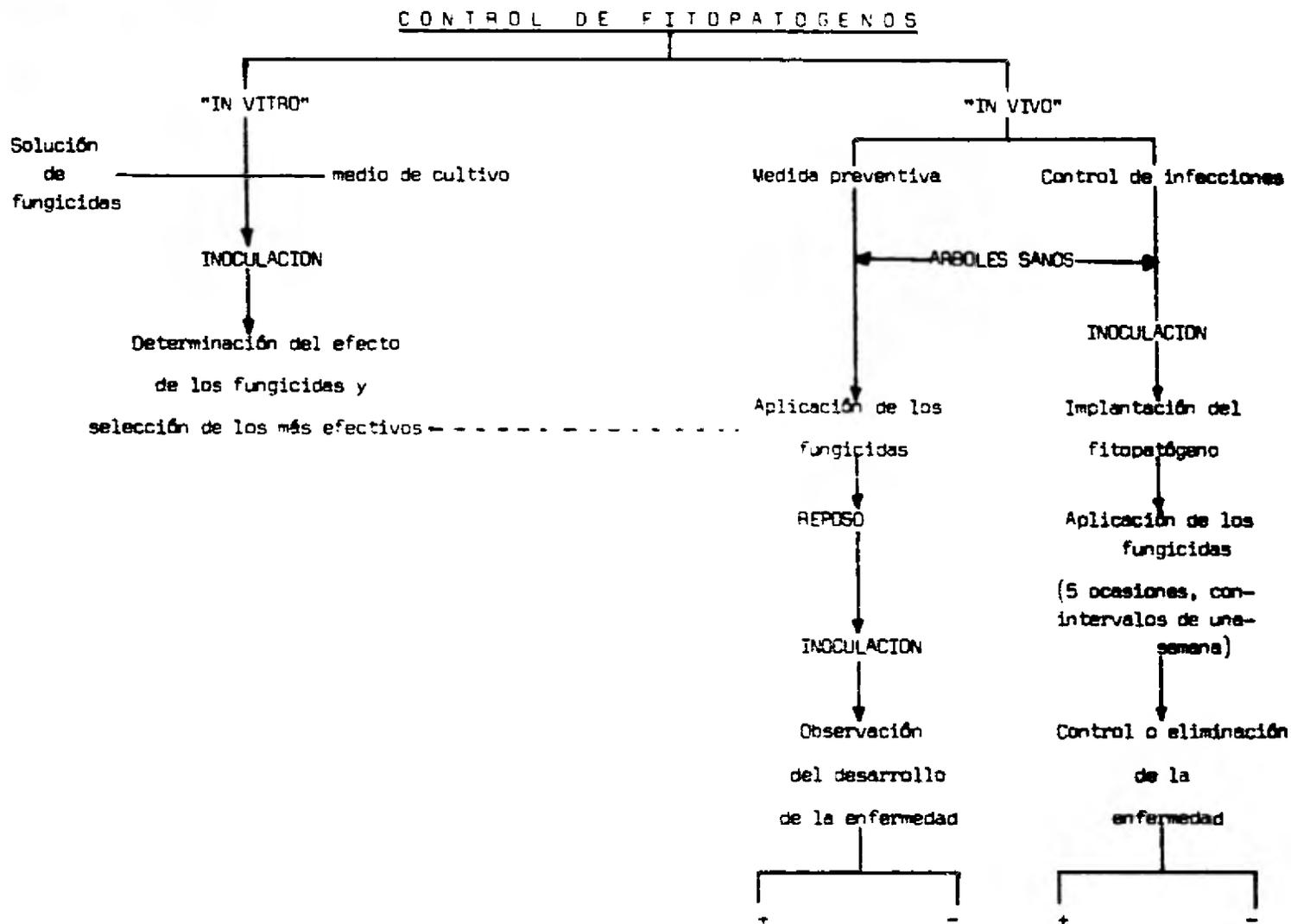


Fig. 2.- Secuencia de la segunda etapa del experimento.

### 3. 1. AISLAMIENTO

#### 3. 1. 1. Muestreo

Se tomaron muestras representativas de hojas y tallos de - barbasco y limón que estuvieran en etapas intermedias del - desarrollo de la enfermedad.

A estas muestras, que presentaban manchas negras y cafés, - se les colocó en cajas de petri estériles en las que fue - ron transportadas al laboratorio.

#### 3. 1. 2. Desinfección

Se lavaron las hojas y tallos con solución jabonosa para - eliminar residuos (polvo y otras sustancias superficiales) que pudieran interferir en el desarrollo del hongo de inte - rés; se enjuagó con agua de la llave y después con agua - destilada.

En condiciones asépticas se procedió a cortar las zonas - afectadas con bisturí estéril, colocándolas en solución de Hg Cl<sub>2</sub> al 0.1 % durante dos minutos y se lavaron después - con agua destilada estéril.

#### 3. 1. 3. Inoculación e incubación

Con pinzas estériles se transfirieron a las cajas, que con - tenían los siguientes medios de cultivo:

Sabouraud Rosa de Bengala - Estreptomycin. (Martín P.J. - 1950)

Agar jugo V8. (Eddie Echandi 1971)

P D A (Bioxon de México, S.A.)

Se incubaron a 28°C y se observaron a las setenta y dos horas procediéndose a anotar las características morfológicas de las diferentes colonias (Tabla Núm. 1) y a efectuar el aislamiento.

#### 3.1.4. Obtención de cultivos puros.

Se seleccionaron aquellas colonias con aspecto diferente y que estuvieran separadas y se procedió a transferir una parte de éstas a diferentes tubos con agua estéril para hacer una suspensión de esporas y a partir de este inóculo, se sembró en cajas de Petri que contenían el medio de Sabouraud, procediéndose a la incubación y a la diferenciación en base a: la cantidad de desarrollo, aspecto superior e inferior del micelio (algodonoso, compacto, etc.), variaciones del color, y se obtuvo el desarrollo de nueve tipos de colonias diferentes en el aislamiento efectuado de barbasco, y cuatro en el caso del limón, las cuales fueron transferidas a tubos inclinados con el mismo medio, con fines de conservación, y que se identificaron con las siguientes claves:

Aislamiento de barbasco: A, B, C, D, E, F, G, H, I.

Aislamiento de limón : L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub>

Las características observadas se presentan en la Tabla Núm. 2.

### 3.2.1. Identificación Parcial.

Las nueve cepas aisladas de barbasco, así como las cuatro-  
cepas aisladas del limón, se cultivaron en tres diferentes  
medios:

Sabouraud

Agar Jugo V8

P D A

por duplicado para observar y comparar mejor sus caracte-  
rísticas, pudiendo en esta forma eliminar las cepas que se  
sospechaba eran iguales.

A las setenta y dos horas de incubación se efectuó la lec-  
tura, anotando las características morfológicas de las co-  
lonias en los tres diferentes medios, de cada una de las -  
cepas (Tabla Núm. 3).

Una vez observadas perfectamente las características, se -  
procedió a eliminar algunas cepas que resultaron idénticas  
macroscópicamente, y que fueron:

$$C = D$$

$$A = B$$

$$H = I = L_3$$

$$L_1 = L_2$$

siendo entonces, seis cepas diferentes del aislamiento -

del barbasco:

B, C, E, F, G, H.

y dos en el caso del limón:  $L_2$  y  $L_4$

### 3.2.2. Conservación.

Las ocho cepas aisladas se transfirieron a tubos de ensaye con medio de Sabouraud y por duplicado; una serie para conservación con vaselina, y otra para la realización de las-determinaciones necesarias.

### 3.3 Pruebas de Patogenicidad.

Se propagaron las ocho cepas en tubo inclinado con medio - de Sabouraud y cuando el desarrollo fue suficiente, se prepararon suspensiones de esporas, agregando agua estéril.

#### 3.3.2. Desinfección e inoculación de los árboles.

Se emplearon ocho árboles sanos de limón, donados por la - Comisión Nacional de Fruticultura (CONAFRUT). Los que fue- ron tratados de la siguiente manera:

Se lavaron hoja por hoja, con solución jabonosa, y después con agua corriente abundante.

seleccionaron las hojas terminales y se desinfectaron - con  $HgCl_2$  al 0.1 % durante dos minutos, y después se lava-

ron perfectamente con agua estéril.

Se marcaron los árboles con números del 1 al 8, se dejaron secar las hojas, y se procedió a la inoculación, comenzando con las hojas de la parte inferior. La inoculación se efectuó por contacto con hisopos estériles, aplicando la suspensión de esporas en un área de aproximadamente 3 cm. en la parte central de la hoja. Se inocularon dos cepas en cada árbol.

Arbol 1: Inoculación de cepas B y C.

Arbol 2: Inoculación de cepas B y C.

Además, se trataron varias hojas aplicando solamente agua estéril, las cuales sirvieron como testigo.

En cada árbol se inocularon cinco hojas con cada una de las dos cepas, se cubrió la parte tratada de la hoja con una capa delgada de algodón estéril húmedo, y se cubrieron las hojas con bolsas de papel semitransparente, marcadas con la clave correspondiente a la cepa inoculada.

Se sujetó el extremo de las bolsas, y se trasladaron los árboles al invernadero. Posteriormente se inocularon los árboles restantes, siguiendo el mismo procedimiento que con los dos primeros.

Arboles 3 y 4: Inoculación de cepas E y F

Arboles 5 y 6: Inoculación de cepas G y H

Arboles 7 y 8: Inoculación de cepas  $L_2$  y  $L_4$

Se hicieron observaciones a los tres, cinco, siete, diez y quince días. (Tabla Núm. 4)

### 3.3.3. Reaislamiento.

A los quince días posteriores a la inoculación, se procedió a efectuar el reaislamiento de las cepas implantadas - (B, F y L<sub>2</sub>) siguiendo la misma metodología usada en el - - aislamiento.

Se cultivó en medio de Sabouraud, y se compararon las características macroscópicas con las cepas aisladas originalmente y cultivadas también en medio de Sabouraud, comprobando que eran iguales, macroscópica y microscópicamente.

Se transfirieron entonces a tubos de ensayo y se clasificaron como: B' F' y L'<sub>2</sub> respectivamente.

### 3.4 Identificación.

La identificación de los microorganismos se efectuó:

3.4.1. Mediante la observación de las características macroscópicas en los siguientes medios de cultivo: -

Sabouraud

Agar - Malta

3.4.2. Mediante la observación de la morfología microscópica realizada en microcultivos, en los que se hizo observación, a tres tiempos de incubación: veinticuatro, cuarenta y ocho y setenta y dos horas.

Para preparar los microcultivos se utilizó el siguiente mé-  
todo:

Se introdujo en una caja Petri un triángulo de vidrio y so-  
bre éste, un portaobjetos, procediéndose a su esteriliza-  
ción.

En condiciones asépticas se cortó de una placa de medio de Sabouraud un pequeño fragmento cuadrado, y se colocó sobre el portaobjetos.

Se inocularon, por picadura, los cuatro lados del corte, - con una porción del cultivo del hongo, y el medio se cu- -  
brió con un cubreobjetos estéril, flameado previamente; se agregaron de 3 - 4 ml. de agua estéril en el interior de -  
la caja para mantener la humedad, procediéndose a incubar-  
a 28°C, a los diferentes tiempos.

Técnica de Tinción.

Se agregaron unas gotas de alcohol para separar el cubreob-  
jetos sin destruir la estructura del hongo en estudio.

El cubreobjetos fue retirado con unas pinzas y se procedió a eliminar los fragmentos del medio de cultivo, colocando-  
los portaobjetos y cubreobjetos en una caja Petri limpia, -  
dejándose reposar doce horas, con objeto de que el desarro-  
llo del hongo se secase.

Se pasaron los portaobjetos y cubreobjetos al colorante -  
azul de algodón por un período de veinticuatro horas, a -  
temperatura ambiente.

Se lavó el colorante con agua de la llave. Se deshidrató - rápidamente, pasándolo por alcoholes de 70, 80 y 96 %, de uno a dos minutos, en cada uno.

Se pasaron por Xilol y se montaron con bálsamo de Canadá.

Las características observadas en estos microcultivos se - compararon con los datos e ilustraciones encontrados en la Literatura (3, 14, 15, 25) llegando a los resultados que - se muestran en las Tablas Núms. 5a y 8.

### 3.5 Pruebas de Control "in vitro".

Se emplearon suspensiones de esporas de las ocho cepas ais-  
ladas.

Se seleccionaron siete fungicidas, teniendo en cuenta los-  
de amplio espectro, de mayor actividad, y baja toxicidad -  
en plantas.

Además, se probaron dos compuestos con propiedades fungici-  
das, que fueron sintetizados en la División de Estudios de  
Posgrado (Depto. de Química Orgánica) de esta Facultad, -  
clasificados como "26" y "28".

#### 3.5.1. Soluciones de fungicidas.

Se prepararon soluciones o suspensiones de los fungicidas-  
en 100 ml. de agua estéril, para lo que se esterilizaron -  
nueve frascos con 100 ml. de agua destilada.

Se marcaron con el nombre del fungicida correspondiente y se agregaron los fungicidas, en las concentraciones indicadas, y en condiciones asépticas. (Para determinar estas concentraciones, se consideró el valor promedio de las dosis recomendadas comercialmente, para cada uno de los fungicidas).

FUNGICIDA:	CONCENTRACION UTILIZADA:
Milcurb	0.1 ml. / 100 ml. H <sub>2</sub> O
Benlate	0.075 gr. / 100 ml. H <sub>2</sub> O
Zineb	0.21 gr. / 100 ml. H <sub>2</sub> O
Difolatan	0.15 gr. / 100 ml. H <sub>2</sub> O
Vanodine	0.11 gr. / 100 ml. H <sub>2</sub> O
Manzate	0.21 gr. / 100 ml. H <sub>2</sub> O
Saprol	0.15 ml. / 100 ml. H <sub>2</sub> O
"26"	0.15 gr. / 100 ml. H <sub>2</sub> O
"28"	0.15 ml. / 100 ml. H <sub>2</sub> O

Se prepararon 450 ml. de medio Sabouraud, se colocaron en nueve matraces (50 ml. en cada uno), y se esterilizaron.

Se dejaron enfriar un poco (más o menos a 35°C) ya que, algunos fungicidas son termolábiles.

Se marcaron los matraces con el nombre de cada fungicida - y después, con pipetas estériles y en condiciones asépti--

cas, se agregó a cada matraz 0.5 ml. de la solución o suspensión de fungicidas; se mezcló perfectamente, por agitación, y se distribuyó el medio en Cajas Petri estériles.

Este mismo procedimiento fue repetido para el estudio de todas las cepas.

Se preparó también medio sin fungicida, el cual fue vertido en las cajas que se utilizaron como testigo.

Las cajas se marcaron con el nombre del fungicida correspondiente y la clave de la cepa a inocular.

Posteriormente se procedió a inocular con 0.1 ml. de la suspensión de esporas, extendiendo con hisopos estériles.

Se incubó a 28°C, haciendo observaciones cada veinticuatro horas, y la lectura se efectuó a las noventa y seis horas. (Tabla Núm. 6)

### 3.6 Pruebas de control "in vivo".

#### 3.6.1 Pruebas para prevenir infecciones.

Se emplearon doce árboles sanos de limón (donados por CONAFRUT) los que se marcaron con los números, del 9 al 20, y con las claves correspondientes a los fungicidas empleados, probándose únicamente, los fungicidas que tuvieron actividad "in vitro".

Se preparó la solución del fungicida en la concentración indicada: a 200 ml. de agua estéril, se agregaron 20 ml. -

de la solución o suspensión original del fungicida correspondiente, se homogeneizó y se transfirió a una bomba de - aspersión, con la que se rociaron todas las hojas.

Con objeto de que el fungicida fuese absorbido o adsorbido, se dejó reposar un período de 24 horas, y posteriormente - se efectuó la inoculación de las cepas, por contacto, con hisópos estériles, en la forma antes indicada.

	Arbol 9: Inoculación de cepas B, C, E, F
DIFOLATAN	Arbol 10: Inoculación de cepas B, C, E, F
	Arbol 11: Inoculación de cepas G, H, L <sub>2</sub> , L <sub>4</sub>
	Arbol 12: Inoculación de cepas G, H, L <sub>2</sub> , L <sub>4</sub>

Y se trasladaron los árboles al invernadero.

Con Manzate y Benlate se siguió el mismo procedimiento:

	Arbol 13: Inoculación de cepas B, C, E, F
	Arbol 14: Inoculación de cepas B, C, E, F
MANZATE	Arbol 15: Inoculación de cepas G, H, L <sub>2</sub> , L <sub>4</sub>
	Arbol 16: Inoculación de cepas G, H, L <sub>2</sub> , L <sub>4</sub>
	Arbol 17: Inoculación de cepas B, C, E, F
BENLATE	Arbol 18: Inoculación de cepas B, C, E, F
	Arbol 19: Inoculación de cepas G, H, L <sub>2</sub> , L <sub>4</sub>
	Arbol 20: Inoculación de cepas G, H, L <sub>2</sub> , L <sub>4</sub>

Las observaciones se realizaron a los cinco, diez y quince días. (Tabla Núm. 7)

### 3.6.2 Pruebas para controlar infecciones.

Se utilizaron los árboles 1, 2, 3, 4, 7 y 8, los que fueron inoculados en la etapa 3.3 y en los que se observaba una infección abundante.

Se probaron los fungicidas Difolatan y Manzate en la concentración antes indicada, y se aplicaron por aspersión.

El tratamiento con Manzate se efectuó también en las plantas de barbasco, que se encontraban en el invernadero.

	Arbol 2
DIFOLATAN	Arbol 4
	Arbol 8
	Arbol 1
	Arbol 3
MANZATE	Arbol 7
	Plantas de barbasco

El tratamiento se repitió cinco veces, haciendo aplicaciones cada 7 días.

Las observaciones se efectuaron cada dos días, después del primer tratamiento, y a partir del segundo tratamiento, se observaron cada siete días.

(Tabla Núm. 8)

RESULTADOS

TABLA No. 1 RESULTADOS PRELIMINARES (Muestreo)  
 Características de las Colonias desarrolladas en los 3 medios de Cultivo.  
 (72 horas de incubación, 28 - 30°C.)

	<u>SABOURAUD ROSA DE BENGALA - ESTREPTOMICINA.</u>
DE	Tipo 1 : Colonias pequeñas, redondas, prominentes, color verde oscuro.
FRAGMENTOS	Tipo 2 : Colonias tamaño regular, granuladas, color verde-azul.
DE HOJAS	Tipo 3 : Colonias tamaño regular, filamentosas, color café-grisáceo.
Y TALLOS	Tipo 4 : Colonias tamaño regular, de diferentes tonos verdes.
DE BARBASCO	<u>PAPA DEXTROSA AGAR</u>
	Tipo 1 : Colonias pequeñas, ligeramente elevadas, color verde oscuro.
	Tipo 2 : Colonias tamaño regular, lanosas, color verde claro.
	Tipo 3 : Colonias grandes, filamentosas, color café oscuro.
	Tipo 4 : Colonias tamaño regular, granuladas, de diferentes tonos verdes.
	<u>AGAR - JUGO VB</u>
	Tipo 1 : Colonias expandidas, más o menos granuladas, color verde oscuro.
	Tipo 2 : Colonias grandes, algodonosas, color azul-verde.
	Tipo 3 : Colonias grandes, lanosas, color verde claro, diferentes tonos.
	Tipo 4 : Colonias grandes, filamentosas, color café grisáceo.
	<u>SABOURAUD ROSA DE BENGALA - ESTREPTOMICINA.</u>
DE	Tipo 1 : Colonias tamaño regular, granuladas, color verde claro.
FRAGMENTOS	Tipo 2 : Colonias pequeñas, redondas, prominentes, color verde oscuro.
DE HOJAS	Tipo 3 : Colonias tamaño regular, en diferentes tonos verdes.
Y TALLOS	Tipo 4 : Colonias pequeñas, filamentosas, color café-gris.
DE LIMÓN	<u>PAPA DEXTROSA AGAR.</u>
	Tipo 1 : Colonias grandes, filamentosas, color verde oscuro.
	Tipo 2 : Colonias tamaño regular, granuladas, de diferentes tonos verdes.
	Tipo 3 : Colonias pequeñas, ligeramente elevadas, color verde oscuro.
	Tipo 4 : Colonias tamaño regular, lanosas, color verde claro.
	<u>AGAR - JUGO VB</u>
	Tipo 1 : Colonias grandes, algodonosas, color verde claro.
	Tipo 2 : Colonias expandidas, color verde oscuro.
	Tipo 3 : Colonias grandes, filamentosas, color café grisáceo.
	Tipo 4 : Colonias grandes, granuladas, color azul verde.

TABLA No. 2

RESULTADOS DEL AISLAMIENTO. (Medio de Sabouraud)

(48 horas de incubación, 28 - 30°C.)

CLAVE CEPA	DESARROLLO	ASPECTO SUPERIOR	ASPECTO INFERIOR
A	Escaso	con ligeras prominencias, color verde oscuro.	plano, bordeado, color casi negro.
B	Escaso	con prominencias, color verde oscuro.	plano, bordeado, color negro.
C	Abundante	granuloso, color azul-verde.	rugoso, color amarillo claro.
D	Abundante	granuloso, color azul-verde. (blanco en el contorno)	rugoso, color amarillo.
E	Medio	compacto, con bordes aterciopelados, color verde claro.	rugoso, color amarillo.
F	Medio	compacto, con prominencias, color verde-gris	plano, con bordes, color negro.
G	Abundante	aterciopelado, color verde-gris	rugoso, color amarillo claro
H	Abundante	filamentoso, color verde crisáceo	poroso, color casi negro
I	Abundante	filamentoso, color amarillo - café - gris (mezcla)	poroso, color negro
L <sub>1</sub>	Escaso	colonias compactas, separadas, color verde oscuro	plano, color verde muy oscuro
L <sub>2</sub>	Medio	compacto, con ligeras prominencias, color verde oscuro	plano, color verde muy oscuro
L <sub>3</sub>	Abundante	filamentosa, color café amarillento	poroso, color negro
L <sub>4</sub>	Abundante	lanoso, color verde musgo	rugoso, color blanco amarillento

TABLA No. 3-A

RESULTADOS DE LA IDENTIFICACION PARCIAL

-Medio de Sabouraud-

(72 horas de incubación, 28 - 30°C)

CLAVE CEPA	Tamaño de la Colonia (Díam. en cm)	ASPECTO SUPERIOR	ASPECTO INFERIOR	ESPORULACION
A	0.76	Colonia compacta, redonda, con ligeras prominencias, color verde oscuro.	Plano, color negro, contorno claro	+
B	0.75	Colonia compacta, redonda, con prominencias, color verde oscuro.	Plano, color negro, contorno claro	+
C	1.9	Colonia granulosa, color azul-verde; gránulos centrales color café y contorno blanco	Rugoso, color blanco amarillento.	+++
D	1.7	Colonia granulosa, color azul-verde gránulos centrales cafés, contorno blanco	Rugoso, color blanco amarillento.	+++
E	1.4	Aterciopelado, color blanco, centro amarillo verdoso.	Rugoso, color amarillo claro.	++
F	0.68	Colonia elevada, compacta, ligeramente aterciopelada, color verde oscuro.	Plano, color negro, contorno gris claro.	+
G	1.3	Aterciopelado, color blanco grisáceo.	Rugoso, color amarillo claro.	++
H	0.9	Colonia expandida, filamentosa, color café-gris, con centro amarillo.	Poco rugoso, color café oscuro.	+
I	1.0	Colonia expandida, filamentosa, color café grisáceo, centro amarillo.	Poco rugoso, color café oscuro.	+
L <sub>1</sub>	0.7	Colonia redonda, compacta, con ligeras prominencias color verde-gris (rugosa)	Plano, color negro, contorno claro.	+
L <sub>2</sub>	0.6	Colonia compacta, redonda, con ligeras prominencias color verde-gris (rugosa)	Plano, color negro, contorno claro.	+
L <sub>3</sub>	0.9	Colonia expandida, filamentosa, color café-gris, con centro amarillo.	Más o menos rugoso, color café oscuro.	+
L <sub>4</sub>	2.2	Lanoso color verde, contorno blanco.	Rugoso, color amarillo claro.	++

+ = Esporulación escasa; ++ = Esporulación media; +++ = Esporulación abundante; 4-5 = Esporulación muy abundante

TABLA No. 3-B

MEDIO PAPA DEXTROSA AGAR

(72 horas de incubación, 28 - 30°C.)

CLAVE CEPA	Tamaño de la Colonia (Diám. en cm.)	ASPECTO SUPERIOR	ASPECTO INFERIOR	ESPORULACION
A	0.7	Aterciopelado, más o menos elevado, color verde-gris.	Plano, bordeado, color negro.	+
B	0.5	Aterciopelado, más o menos elevado, color verde-gris.	Plano, bordeado, color negro.	+
C	1.6	Granuloso, rugoso, color azul-verde.	Rugoso, color verde amarillento.	++
D	1.5	Granuloso, rugoso, color azul-verde.	Rugoso, color verde amarillento.	++
E	1.4	Lanoso, color verde.	Rugoso, color amarillo verdoso.	+
F	0.5	Aterciopelado, más o menos elevado, color verde oscuro.	Plano, más o menos bordeado, color negro.	+
G	1.3	Aterciopelado, color azul-verde.	Rugoso, color amarillo.	+
H	2.1	Filamentoso, expandido, color café-verdoso-amarillento.	Plano, centro rugoso, contorno claro.	+
I	2	Filamentoso, expandido, color café-verdoso - amarillento.	Plano, centro rugoso, contorno claro.	+
L <sub>1</sub>	0.6	Compacto, más o menos rugoso color verde oscuro.	Plano, más o menos bordeado, color negro.	+
L <sub>2</sub>	0.5	Compacto, más o menos rugoso, color verde oscuro.	Plano, más o menos bordeado, color negro.	+
L <sub>3</sub>	2.2	Filamentoso, expandido, color café-verdoso, amarillento.	Plano, centro rugoso, contorno claro.	+
L <sub>4</sub>	1.8	Lanoso, expandido, contorno claro, color azul turquesa.	Rugoso, color verde amarillento.	++

CLAVE	Tamaño de la Colonia (Diám. en cm)	ASPECTO SUPERIOR	ASPECTO INFERIOR	ESPORULACION
A	1	Aterciopelado, con ligeras prominencias, color verde-gris.	Plano, contorno bordeado, color negro	+++
B	0.9	Aterciopelado, con pequeñas prominencias, color verde-gris.	Plano, contorno bordeado, color negro.	+++
C	1.6	Granuloso, con puntos centrales con brillo metálico, color verde-azul, oscuro.	Rugoso, color amarillo-café.	++++
D	1.7	Granuloso, con puntos centrales con brillo metálico, color verde-azul, oscuro.	Rugoso, color amarillo-café.	+ + + + +
E	1.7	Lanoso, más o menos elevado, color verde.	Rugoso, color amarillo-café.	++++
F	1	Aterciopelado, con prominencias, color verde oscuro.	Plano, contorno bordeado, color oscuro.	+++
G	1.3	Aterciopelado, color verde-azul, claro.	Rugoso, color amarillo café.	+++
H	3	Colonia expandida, muy filamentosa, color gris oscuro, contorno claro.	Escasamente rugoso, color negro, contorno claro.	+++
I	2.8	Colonia expandida, muy filamentosa, color gris oscuro, contorno claro.	Escasamente rugoso, color negro, contorno claro.	+++
L <sub>1</sub>	1.2	Con algunas prominencias, bordeado, color verde gris.	Plano, color negro, contorno bordeado.	++
L <sub>2</sub>	1	Con algunas elevaciones, bordeado, color verde-gris.	Plano, color negro, contorno bordeado.	++
L <sub>3</sub>	3.1	Colonia expandida, muy filamentosa, color gris oscuro, contorno claro.	Escasamente rugoso, color negro, contorno claro.	+++
L <sub>4</sub>	1.6	Lanoso, color azul turquesa, contorno blanco.	Rugoso, color café amarillento.	++++

TABLA No. 4

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE PATOGENICIDAD.

ARBOLES	C E P A	3 Días	5 Días	7 Días	10 Días	15 Días
1 y 2	B	-	-	-	+ -	++
" "	C	-	-	-	-	-
3 y 4	E	-	-	-	-	-
" "	F	-	-	+ -	++	+++
5 y 6	G	-	-	-	-	-
" "	H	-	-	-	-	-
7 y 8	L <sub>2</sub>	-	-	+ -	++	+++
" "	L <sub>4</sub>	-	-	-	-	-

- = No hubo desarrollo.

+ - = Desarrollo muy escaso.

+ = Desarrollo medio.

++ = Desarrollo abundante.

+++ = Desarrollo muy abundante.

TABLA No. 5-A RESULTADOS DE LA IDENTIFICACION.

CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS DE LAS CEPAS AISLADAS DE HOJAS DE LIMON Y BARBASCO.

Medio Sabouraud, 72 horas, de incubación, 28 - 30°C

CLAVE CEPA	Tamaño de la Col. Diámetro en cm.	ASPECTO SUPERIOR	ASPECTO INFERIOR
** C	1.9	Granuloso, poco rugoso, color azul-verde.	Rugoso, color blanco amarillento.
** E	1.4	Aterciopelado, color blanco, con centro amarillo	Rugoso, color amarillo claro.
** G	1.3	Aterciopelado, color blanco, con centro verde.	Rugoso, color amarillo claro.
** L <sub>4</sub>	2.2	Polvoso o granular, color verde.	Rugoso, color amarillo claro.
***H	1.2	Expandido, con elevación central. color café grisáceo oscuro.	Rugoso, color café oscuro.

Medio de Agar - Malta (72 horas de incubación, 28 - 30°C)

B *	1.2	Aterciopelado, expandido, color verde-olivo.	Plano, color verde negruzco.
F *	1.3	Aterciopelado, expandido, color verde-olivo.	Plano, color verde negruzco.
L <sub>2</sub> *	1.3	Aterciopelado, expandido, color verde-olivo.	Plano, color verde negruzco.

CARACTERISTICAS REGISTRADAS EN LA LITERATURA:

* <u>CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES</u> .-	Colonias difundidas, aterciopeladas, color verde olivo- - u oliváceo castaño; reverso verdoso negro, en Malta - Agar.
* * <u>PENICILLIUM</u> .-	Colonias de aspecto aterciopelado, velludo o lanoso, funiculoso, fasciculado o coremiforme, "polvoso". Color azul-verde, amarillo-verde, verde, blanco, - etc. en Medio de Sabouraud
* * * <u>ALTERNARIA</u> .-	Colonias expandidas, micelio completamente inmerso, o parcialmente superficial. Color generalmente gris oscuro, café negruzco o negro, en los diversos medios de cultivo.

TABLA No. 5-8

RESULTADOS DE LA IDENTIFICACION.

MICROCULTIVOS

CEPA	GENERO	ESPECIE
B	CLADOSPORIUM	CLADOSPORIODES
C	PENICILLIUM Sp	—
E	PENICILLIUM Sp	—
F	CLADOSPORIUM	CLADOSPORIODES
G	PENICILLIUM Sp	—
H	ALTERNARIA Sp	—
L <sub>2</sub>	CLADOSPORIUM	CLADOSPORIODES
L <sub>4</sub>	PENICILLIUM Sp	—

TABLA No. 6

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE CONTROL "IN VITRO".

A las 96 horas de incubación, 28 - 30 ° C.

CEPA	MILCURB	VANODINE	SAPROL	DIFOLATAN	MANZATE	BENLATE	PARZATE	"26"	"28"
B	+++	+++	+++	-	-	±	+++	++	+
C	+++++	+++++	+++++	±	no esporulación <sup>+</sup>	±	+++	+++	+++
E	++++	++	-	±	-	-	+++ no esporul.	+++	+++
F	++++	++++	++++	-	-	±	+++	++	+
G	++++	+ -	±	±	no esporulación <sup>+</sup>	-	++ no esporul.	+++	+++
H	++++	++	++	-	-	±	+++	+++	+++
L <sub>2</sub>	++++	++++	++++	-	-	±	+++	+++	±
L <sub>4</sub>	+++++	+++++	+++++	-	-	+	+++	+++	++

- 5 + = Desarrollo muy abundante.
- 4 + = Desarrollo abundante
- 3 + = Desarrollo medio.
- 2 + = Desarrollo escaso.
- 1 + = Desarrollo muy escaso.
- ± = Desarrollo apenas visible.
- = No hubo desarrollo.

TABLA No. 7

## RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE CONTROL PREVENTIVO.

Observaciones efectuadas a los 5, 10 y 15 días.

CLAVE DE LA CEPA	Tratamientos								
	DIFOLATAN			MANZATE			BENLATE		
	5	10	15	5	10	15	5	10	15
B	-	-	-	-	-	-	-	±	+
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	±	+
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	±	+
L <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- = No hubo desarrollo.

± = Desarrollo escaso.

+ = Desarrollo medio

Los resultados proceden de la observación  
en los diferentes árboles.

TABLA No. 8

RESULTADOS DE LA APLICACION DE DOS FUNGICIDAS PARA CONTROLAR LA INFECCION  
EN PLANTAS DE BARBASCO Y LIMON.

		OBSERVACIONES		DIAS		
		2	7	15*	21*	28*
DIFOLATAN	LIMON Arboles 2, 4, 8	Las manchas de infección se deshidrataron y se tomaron planas	Las manchas presentaron aspecto aún más seco.			
MANZATE	LIMON Arboles 1, 3, 7  y Plantas de Barbasco			Desprendimiento de las colonias tanto de las hojas, como de los tallos.		

\* Corresponde a la 2a. 3a. y 4a. aplicación de los fungicidas empleados.



CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES

Conidioforos en cultivo, aislado de Dioscorea composita  
y Citrus aurantifolia.

Foto.- Cortesía del DR. MIGUEL ULLDA

## 5. DISCUSION

Los resultados del aislamiento efectuado de hojas y tallos de limón y barbasco indican que en los tres medios de cultivo empleados fueron comunes los hongos de color verde - oscuro, claro y azulado así como un hongo de color café - grisáceo y con un micelio laxo. (Tabla Núm. 1).

Del aislamiento efectuado a partir de la suspensión de esporas de las diferentes colonias obtenidas de barbasco y limón y para lo que se tomó en cuenta el desarrollo de varios cultivos obtenidos de cada una de las suspensiones, - se lograron caracterizar trece tipos de cepas aparentemente diferentes; aunque en algunos casos las características son muy similares como se nota en las cepas A y B, C y D, - H e I, L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub>, observándose también similitud entre las colonias obtenidas del barbasco con las colonias obtenidas del limón.

(Tabla Núm. 2)

Esto hizo suponer que se podrían eliminar algunas cepas - por corresponder al mismo hongo, procediéndose a repetir - la observación de las características macroscópicas de las trece cepas inoculándolas en tres medios de cultivo diferentes.

En este caso se tomó en cuenta, además, el grado de esporulación de los hongos, observando que es mayor el grado de esporulación de todos los hongos en el medio de Agar - jugo V8, así mismo, el tamaño de las colonias es mayor en este medio aunque su desarrollo es más expandido pero menos-

elevado que en los otros 2 medios de cultivo.

En las tablas Núm. 3a, b y c, se aprecia claramente que en los tres medios hay colonias que corresponden a un mismo hongo y se tiene que la cepa A es igual a la cepa B, C = D, H = I = L<sub>3</sub> y L<sub>1</sub> = L<sub>2</sub> lo que permitió reducir a 8 el número de cepas aisladas que corresponden a: B, C, E, F, G, H, L<sub>2</sub> y L<sub>4</sub>.

Puede notarse la variación en el color e incluso en el aspecto de la mayoría de cepas en cada uno de los medios de cultivo, debido a que en diferentes sustratos, son diferentes las reacciones bioquímicas efectuadas por los hongos, ejemplo: en las cepas C y D hay una diferencia marcada en el medio agar - jugo V8 respecto a los otros 2 medios, sin embargo continúan siendo iguales entre sí.

Las pruebas de patogenicidad efectuadas para cumplir con los postulados de Koch, solamente fueron aplicadas en árboles de limón, ya que no fue posible conseguir plantas sanas de barbasco.

Los resultados (Tabla Núm. 4) indican que, de las 8 cepas inoculadas en las hojas de limonero sólo se logró la implantación de las cepas B, F y L<sub>2</sub>, las que desarrollaron las características de las hojas de los limoneros enfermos de los que fueron aislados previamente y que corresponden a hojas con manchas con aspecto de polvo negro o tizne y que en los cultivos "in vitro" se observan de color verde-oscuro en su parte superior y negro en la parte inferior.

Según lo observado, en las hojas inoculadas con la cepa B,

el desarrollo fue visible un poco después que en el caso - de las cepas F y L<sub>2</sub>, esto pudo deberse al estado fisiológico de las hojas o a variaciones en la concentración del - inóculo. Sin embargo, a los 15 días posteriores a la inoculación se observó una infección abundante con las 3 cepas. De las otras cepas probadas no hubo desarrollo y en determinaciones efectuadas después de los 15 días, las hojas inoculadas se observaron totalmente limpias y sanas.

Aun cuando estos resultados indican que los hongos patógenos corresponden a las cepas B, F y L<sub>2</sub>, se procedió a efectuar la identificación de todas las cepas aisladas, ya que durante la primera siembra los hongos de color verde claro resultaron los más abundantes por lo que se supone que, si bien no son los fitopatógenos deben tener un papel importante como contaminantes secundarios.

Con el fin de comparar los resultados obtenidos en la identificación de los microorganismos, en la tabla # 5a se exponen las características coloniales desarrolladas por los hongos pertenecientes a los géneros Cladosporium, Alternaria y Penicillium, y se observa que las características macroscópicas reportadas en la literatura, de esos 3 géneros coinciden con las de los respectivos hongos aislados. Esta aseveración fue confirmada a través de la observación de las características microscópicas determinadas en microcultivo. (Tabla Núm. 5b) encontrándose que las cepas C, E, G y L<sub>4</sub> corresponden a diferentes especies del género Penicillium.

La cepa H corresponde a Alternaria y las cepas B, F y L<sub>2</sub>, que resultaron patógenos, corresponden a Cladosporium cla-

dosporioides.

Es interesante hacer notar que aun cuando se sospechaba -- que las cepas B, F, y L<sub>2</sub> correspondían al mismo hongo, al observar la morfología microscópica se comprobó y se identificaron a las cepas B y F como Cladosporium sp.

Sin embargo, hubo dificultad en la identificación de la cepa L<sub>2</sub>, ya que presentaba ciertas diferencias en la morfología colonial (en los medios de Sabouraud, P. D. A. y Agarjugo V8) e igualmente sus características microscópicas no estaban bien definidas, por lo que se solicitó la colaboración del Dr. Miguel Ulloa del Instituto de Biología de la UNAM, el que identificó a las 3 cepas (B F y L<sub>2</sub>) como Cladosporium cladosporioides (Fresen) de Vries 1952.

Este hongo ha sido reportado como saprófito con tendencia parasitaria. (14)

Tanto Cladosporium como Alternaria son contaminantes comunes del barbasco y del limonero y en el caso de Penicillium hubo especies que fueron aisladas de barbasco y no se encontraban en limón y una especie que fue aislada del limón y que no existía en el barbasco.

En la Tabla # 6 se muestran los resultados de las pruebas de actividad "in vitro" de los 9 fungicidas empleados y se observa claramente que los fungicidas que tienen mayor actividad con todas las cepas son: Difolatan con el cual hubo desarrollo apenas visible de únicamente las cepas C, E y G.

Con Manzate solamente las cepas C y G se desarrollaron en formas insignificante y además se inhibió la esporulación.

Lo importante es que ambos fungicidas son efectivos sobre las cepas consideradas patógenas (B, F y L<sub>2</sub>). El siguiente en actividad fue el Benlate aunque éste no inhibe totalmente el desarrollo de las cepas patógenas.

De los compuestos "26" y "28" en los cuales se había determinado anteriormente su capacidad fungicida, se observó que únicamente el compuesto "28" mostró cierta actividad inhibitoria con las cepas patógenas.

En base a estos resultados se seleccionaron el Difolatan, el manzate y el Benlate para la siguiente etapa del experimento.

En la tabla # 7 se tienen los resultados de la determinación del efecto de los fungicidas como control preventivo y se observa que a los 5 días posteriores a la inoculación no se registró desarrollo de ninguna de las cepas en los árboles. En tanto que a los 10 días ya se observó desarrollo, aunque escaso, en los árboles tratados con Benlate, en las hojas inoculadas con las cepas B, F y L<sub>2</sub>, que son de las que se esperaba desarrollo ya que de las demás cepas no hubo implantación incluso sin el tratamiento con fungicida.

En los árboles tratados con Difolatan y Manzate el desarrollo continuó siendo negativo. A los 15 días, en los árboles tratados con Benlate, en las hojas inoculadas con las cepas B, F y L<sub>2</sub> se detectó desarrollo medio; si se compara

este resultado con el de las Pruebas de Patogenicidad en el cual a los 15 días ya había bastante desarrollo de estas cepas se puede determinar que el fungicida inhibe parcialmente el desarrollo.

En el caso de los árboles tratados con Difolatan y Manzate no se detectaron indicios de desarrollo en ninguna de las hojas inoculadas ni a los 15 días ni posteriormente

Esto comprueba la acción preventiva de estos dos fungicidas y la inactividad del Benlate respecto a las cepas B, F y L<sub>2</sub> que ya había sido demostrada en las pruebas "in vitro".

Posteriormente se probó la efectividad de los fungicidas Difolatan y Manzate para controlar las infecciones ya establecidas en las plantas de limón. Las plantas de barbasco fueron tratadas con Manzate por ser el fungicida del que se disponía en mayor cantidad y por ser éste más económico que el Difolatan.

La actividad de estos 2 fungicidas se detectó desde los 2 días posteriores a la primera aplicación, esta actividad se fue haciendo progresiva en cada tratamiento hasta terminar con el desprendimiento de las colonias de hongos presentadas en formas de manchas o de tizne en las hojas y tallos de las plantas. Con estos resultados queda comprobada la actividad del Difolatan y el Manzate, no solamente para evitar la infección de estos hongos aislados, sino además para eliminar infecciones ya establecidas de los mismos.

## 6.- RESUMEN

La importancia económica del barbasco y limón, ha determinado un estudio exhaustivo de los mismos, ya que, en la División de Estudios de Postgrado de la Facultad de Química, se están realizando las siguientes investigaciones:

En barbasco se realizan experimentos con aminas terciarias, para incrementar el contenido de diosgenina. (lográndose un incremento del 50%).

En limón se planea estudiar el efecto de aminas terciarias sobre la variación en la composición de carotenos en los limones.

Estos experimentos se llevan a cabo a nivel de invernadero, y dado que las condiciones de temperatura y humedad de un invernadero son óptimas para el desarrollo y la diseminación de hongos, se presentó el problema de infecciones fungales, localizadas en los tallos y hojas, manifestándose como manchas negras y cafés en el barbasco; y en la planta del limón, las hojas estaban totalmente cubiertas en el haz, por un hongo de color negro, que daba el aspecto de tizne; y en los tallos se observó, como pequeñas prominencias color verde olivo.

En virtud de la importancia de los estudios que se están realizando, y para lo que es necesario mantener a los cultivos en condiciones óptimas, se procedió al aislamiento, identificación, y control de estos hongos, observándose que el hongo causal de estas alteraciones, corresponde a C. cladosporioides, y asociados a éste, se encuentran - -

Alternaria sp. y Penicillium sp. y que de los nueve fungicidas empleados, los de mayor efectividad en las pruebas - realizadas "in vitro", corresponden al Manzate y Difolatan, con los que se logró controlar la infección "in vivo".

## 7.- CONCLUSIONES

1.- Las manchas características en las hojas y tallos de barbasco y limonero enfermos, son ocasionadas por el hongo Cladosporium cladosporioides.

2.- Alternaria sp que es un fitopatógeno infectante, en este caso particular, se considera como contaminante secundario, al igual que Penicillium sp.

3.- Un mismo hongo puede mostrar variación en su forma de desarrollo "in vitro", dependiendo del sustrato del cual fue aislado; como fue el caso de las cepas B y F (aisladas del barbasco) con la cepa L<sub>2</sub> (aislada del limón), ya que -- las tres cepas corresponden al mismo hongo.

4.- El establecimiento de una infección está condicionado por diversos factores, y es de gran importancia la susceptibilidad de la planta a un determinado hongo; esto fue claramente observado, ya que, en el mismo invernadero, había otras plantas diferentes al barbasco y limonero, que no presentaron infección, aún cuando estaban en contacto con las plantas enfermas.

5.- Los fungicidas con mayor efectividad sobre los hongos aislados, son Difolatan y Manzate, tanto "in vitro" como "in vivo", en las dos pruebas: como control preventivo, y como control en infecciones ya establecidas.

6.- Se recomienda efectuar una fumigación total de inverna

dero y hacer aplicaciones periódicas, (aproximadamente cada treinta días) sobre las plantas y sobre las macetas, para evitar la reinfección, utilizando preferentemente el Difolatan, por sus propiedades erradicantes.

## 8.- BIBLIOGRAFIA

- 1 Alexopoulos C. J.  
Introductory Mycology, 3th. edition  
John Wiley Sons, New York 1979
- 2 Ajello L. y Col.  
Laboratory Manual for Medical Micology  
Public. Health Service, Washington 1963
- 3 Barnett. H.L.  
Illustrated Genera of Imperfect Fungi, 3th edition  
Burgess Publishing Company, U. S. A. 1972
- 4 Barberá C.  
Pesticidas Agrícolas, 3a. Edición  
Ediciones Omega, Barcelona 1976
- 5 Burger A.  
Química, Bioquímica y Acción Terapéutica y Farmacoló-  
gica de las Drogas Naturales. Tomo II  
Editorial Aguilar, S. A. Madrid 1955
- 6 Bayer de México, S. A.  
Folletos informativos sobre Benlate, Manzate y Parzate  
División Agrícola 1977
- 7 Ciencia Forestal  
Revista de la Dirección General de Investigación  
y Capacitación Forestales. Vol. 3 Núm. 13  
México, D. F. Mayo - Junio 1978

8. CONAFRUT  
Información: Departamento de Unidad de Planeación.
9. Corbett W.  
The Biochemical mode of action of Pesticides.  
Academic Press - London  
New York 1970.
10. Ciba - Geigy Mexicana, S. A.  
Hojas de información sobre Saprool.  
División Agropecuaria 1976.
11. Delgado S. S. y Velázquez M. F.  
Enfermedades de las Plantas  
Dirección General de Sanidad Vegetal - SARH -  
Talleres Gráficos de la Nación, México, 1979
12. Delgado S. S. y Velázquez M. F.  
Guía para el diagnóstico y Combate de Enfermedades  
Dirección General de Sanidad Vegetal - SARH -  
Talleres Gráficos de la Nación, México, 1979
13. Echandi E.  
Manual de Laboratorio para Fitopatología General  
Editorial Herrero Hnos. S. A.  
México, 1971
14. Ellis M. B.  
Dematiaceous Hyphomycetes  
Published by the Commonwealth Mycological Institute  
England 1971

15. Finch M. C. Finch A. N  
Los Hongos comunes que atacan cultivos  
en América Latina.  
Editorial Trillas, México, 1974
16. Farm Chemicals Handbook  
Meister Publishing Co.  
U. S. A. 1977
17. Frear D. E. H.  
Chemistry of insecticides, fungicides  
and herbicides. 2th Edition  
D. Van Nostrand Co. Inc. New York 1948
18. Gilman C. Joseph  
A manual of soil fungi, Second Edition  
The Iowa State University Press  
Ames Iowa U. S. A. 1957
19. Marsh R. W.  
Systemic Fungicides 1th. Edition  
Longman group limited, London 1972
20. Moreno Alfaro A.  
Plaguicidas agrícolas y su aplicación  
Editorial Aguilar, S. A. 3a. Edición  
Madrid 1968
21. Martin H. Worthing Ch. R.  
Insecticide and Fungicide Handbook  
for crop protection. 5th. Edition  
Ed. Arnold, London 1964

22. Martin P. J.  
"Use of Acid, Rose Bengal and Streptomycin in  
the plate Method for estimating Soil fungi"  
Soil Science, 69: 215, 1950
23. Pfizer, S. A. de C. V.  
Folleto informativo sobre Vanodine  
División Agrícola 1976
24. Primer Simposio Internacional sobre Dioscoreas  
INIF, Publicación especial # 8  
Agosto 1972
25. Raper K. B. and Thom C.  
Manual of the Penicillia  
The Williams Wilkins C.  
Baltimore 1949
26. Shurtleff Malcolm C.  
How to control Plant Diseases in home and garden  
Second Edition  
Iowa State University Press  
Ames, Iowa 1966
27. Sarasola Abel A.  
Fitopatología, Curso moderno Tomo IV 1a. Ed.  
Editorial Hemisferio Sur  
Buenos Aires, Argentina 1975
28. Sharvelle E. C.  
The nature and uses of modern fungicides  
Burgess Publishing Co. N. Y. 1970

29. Verna L. C.  
Micología  
Editorial El Ateneo  
Buenos Aires 1952
  
30. Webster J.  
Introduction to fungi. Second Edition  
Cambridge University Press  
Cambridge 1980
  
31. Walker J. C.  
Patología Vegetal 2a. Edición  
Ediciones Omega, S. A.  
Barcelona 1973