



ISSN0186-8063

Agraria

Nueva Epoca

Año 6, Vol. VI Números 1, 2, y 3 Enero-Diciembre de 2009 · Buenavista, Saltillo, Coah., México

Editorial

Efecto del Patrón de Siembra en la Producción de Materia Seca en Girasol (*Helianthus annuus* L.) para Forraje

Pág. 5

Morfología y Diferenciación de Colonias de Tres Tipos de Bacterias Lácticas

Pág. 14

Eficiencia de la Inexperiencia Sexual de los Machos Cabríos para Estimular la Actividad Estral en Cabras Anéstricas ...

Pág. 31

Comité Editorial

Dr. Miguel A. Capó Arteaga
Editor en Jefe

Dr. Jesús Valdés Reyna
Editor Ejecutivo

Editores Técnicos

Dr. José L. Puente Manríquez
Fitomejoramiento, Unidad Laguna

Dr. Raúl Rodríguez García
Riego y Drenaje

Dr. Jesús M. Fuentes Rodríguez
Producción Animal

DIRECTORIO

Dr. Eladio Heriberto Cornejo Oviedo
Rector

Ing. Lorenzo Castro Gómez
Secretario General

Raul Villegas Vizcaíno
Director General Académico

M. C. Alfredo Sánchez López
Director de Investigación

Dr. Alfredo de la Rosa Loera
Subdirector de Programación y Evaluación

M. C. José A. Nájera Castro
Subdirector de Operación de Proyectos

UNIDAD LAGUNA

Dr. Armando Espinoza Banda
Subdirector de Investigación

M. C. Francisca Sánchez Bernal
Area de Programación, Operación y Evaluación Científica

Ing. Enrique L. Hernández Torres
Area de Operación Programas y Proyectos de Investigación

Diseño y Formación

Miguel A. Estrada Villarreal

Colaboradores

M. C. Ricardo Cuéllar Flores

M. C. José H Rancaño Arrioja

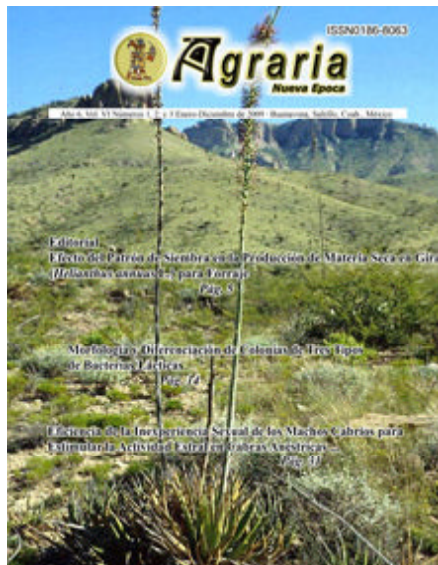
Agraria -Nueva Epoca- es una publicación científica, cuatrimestral, de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, con domicilio conocido en Buenavista, Saltillo, Coah., México y se imprime en sus Talleres Gráficos.

Tiraje digital (PDF) para su distribución en medios múltiples.

http://www.uaaan.mx/DirInv/portal_agraria/portal.htm · email: agraria_ne@uaaan.mx

Tel (844) 411-02-00, Ext. 2404 · Fax 411-02-11

Agraria -Nueva Epoca- está indexada en Latindex (Directorio de publicaciones Científicas seriadas de América Latina, el Caribe, España y Portugal), <http://www.latindex.org/larga.php?opcion=1&folio=15150> según folio 1550 de fecha 07-03-2006.



Centéotl, deidad azteca de la agricultura, es una advocación de Chicomecóatl, diosa del maíz. La Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en su afán de rescatar los valores del pasado histórico de México, la ha adoptado como logotipo de su revista científica, como símbolo que evoca y reafirma nuestras raíces culturales

Nuestra Portada

Planta silvestre de lechuguilla.

Normas Editoriales

Tipo de materiales para publicación

La revista *Agraria -Nueva Epoca-* acepta, para su publicación, materiales en español e inglés, sobre temas relacionados con las ciencias agrícolas, pecuarias y forestales, incluyendo las áreas de ingeniería, agroindustria y socioeconómicas. Todo material deberá venir acompañado de la solicitud correspondiente.

Estos materiales pueden ser artículos científicos, notas de investigación o ensayos.

Los materiales que se envíen para su publicación deberán ceñirse a las normas que, para tal efecto establezca *Agraria -Nueva Epoca-* y estarán sujetos a revisión y arbitraje por el Comité Editorial de la revista -o por quienes éste designe-, como requisito previo a su publicación.

No se aceptan trabajos ya publicados, o que estén sometidos a consideración en otros medios científicos de difusión.

Es de desear que la realización de la investigación, cuyos materiales sean enviados para su publicación, no exceda de 4 años anteriores a la fecha de su remisión.

Formato

El respeto a las siguientes indicaciones respecto al formato solicitado facilitará grandemente nuestro trabajo de edición.

Textos

Los textos, con todos sus anexos, deberán enviarse empaquetados (nosotros preferimos WinZip), sin contraseñas de seguridad, por correo electrónico, escritos en un procesador de textos de uso común (preferimos Word), en formato tamaño carta (21.57 x 27.94 cm), sin sangría, y a renglón seguido, con márgenes de 2.5 cm por lado. Agradeceremos evitar nombres de archivo excesivamente largos o con espacios en blanco. Los textos se redactarán en un tipo formal conocido ttf (True Type Font) tales como Arial, Times New Roman o similares, de 12 puntos. Las notas se escribirán en 9 puntos.

Todos los renglones, incluidos los encabezados, se iniciarán, invariablemente, a partir del margen izquierdo, sin sangría.

Todos los encabezados, independientemente de su orden, se escribirán en altas y bajas, y negrillas.

Los párrafos se escribirán sin pasar renglón entre ellos; para separarlos, a fin de hacer el texto fácil de leer y corregir, se utilizará el formato automático de párrafo del procesador, para darles un espaciado posterior de 6 puntos.

Las palabras no se separarán, en ningún caso, por sílabas. Es conveniente desactivar el comando automático de inserción de guiones (*hyphenation*) de su procesador.

El material no deberá exceder de 520 líneas para artículos científicos y ensayos, y de 200 líneas para una nota científica, incluidos cuadros y figuras.

Las unidades que se empleen serán las del Sistema Internacional de Unidades (<http://www.sc.ehu.es/sbweb/fisica/unidades/unidades/unidades.htm>)

Las páginas, al igual que los cuadros y las figuras, se numerarán progresivamente con números arábigos.

Cuadros y figuras. Los cuadros y las figuras contendrán sólo la información esencial y en ningún caso repetirán los datos que se presenten en el texto, o en otra forma. Cuadros y figuras deben ser claros, simples, concisos e ilustrativos.

Los cuadros no excederán, en ningún caso, los márgenes de impresión arriba mencionados y deberán presentarse en el cuerpo del texto, con el formato correspondiente, con las columnas separadas por tabulaciones, sin espacios a mano, y en la posición en que se espera que aparezcan, con el número de orden correspondiente.

En los cuadros se empleará sólo el número de cifras significativas necesarias para destacar el punto que se desee.

Los cuadros se realizarán en formato básico con tres líneas horizontales continuas: al inicio del cuadro, al inicio del cuerpo del cuadro (no en el encabezamiento) y al final. El campo y el encabezamiento de las columnas se pueden dividir a conveniencia del autor. No se deben añadir líneas verticales. Los encabezamientos, de columnas y líneas, se escribirán con minúsculas, excepto la primera letra de la oración. Las unidades se colocan debajo de la segunda línea horizontal, como en el ejemplo que se proporciona.

Las figuras tampoco excederán, en ningún caso, los márgenes de impresión establecidos. La posición que vaya a ocupar cada figura, deberá estar indicada en el texto con negrillas, en renglón aparte, con el número correspondiente.

Cada figura se enviará en archivo por separado, en formato tif (compresión LZW), o jpg, con el tamaño exacto en que se pretende que aparezca en la publicación, en una resolución no inferior a 150 pxeles por pulgada, con el número que le corresponda (p. ej: fig 01.jpg).

Los puntos experimentales deberán marcarse visiblemente. Para dividir los ejes, se escogerán intervalos constantes para cada uno. Los mosaicos fotográficos deberán entregarse montados en un solo archivo gráfico (tif, o jpg), totalmente terminados. El aumento de las microfotografías debe indicarse en la leyenda.

En archivo por separado se enviará un listado de las figuras incluidas en el material enviado, con el número de orden y el pie de grabado correspondientes (p. ej.: listafigs.doc)

Las figuras pueden ser fotos a color o en tonos de gris -según sea su original-, gráficas (de preferencia a color), ilustraciones, dibujos, o grabados (de preferencia a color).

Los cuadros deberán redactarse en el mismo procesador de textos y formato señalado arriba.

Las ecuaciones, si las hubiera, se insertarán en el texto con un editor de ecuaciones compatible con su procesador.

Notas de pie de página

Sólo se podrán utilizar, cuando sean absolutamente indispensables, para identificar información adicional y se numerarán progresivamente en el texto. Los asteriscos se reservarán para indicar significancia a 5% (*) y 1% (**), respectivamente. En el pie de grabado -o de cuadro- se incluirán las notas o llamadas que sean pertinentes, y serán señaladas con números arábigos.

Citas bibliográficas

Las citas bibliográficas deberán ser de literatura reciente, relevante y sólo las exclusivamente necesarias para sustentar los planteamientos hechos.

Más detalles en http://www.uaaan.mx/DirInv/Convoc/conv_web/normas.htm, o http://www.uaaan.mx/DirInv/portal_agraria/portal.htm

Contenido

Normas Editoriales / <i>Instructions for authors</i>	2
Convocatoria/ <i>Paper call</i>	4
Editorial / <i>Editorial</i>	
Nuevos Nichos para los Plaguicidas Orgánicos	5
Artículos / <i>Articles</i>	
Efecto del Patrón de Siembra en la Producción de Materia Seca en Girasol (<i>Helianthus annuus</i> L.) para Forraje	6
Planting Pattern Effect in the Dry Matter Production of Sunflower (<i>Helianthus annuus</i> L.) for Forage <i>José Francisco Aguilera Vega, Armando Espinoza Banda, Arturo Palomo Gil, Emiliano Gutiérrez del Río, José Jaime Lozano García</i>	
Consumo de Agua y Nitrógeno en Espárrago (<i>Asparragus officinalis</i> L.) de Baja Población de Plantas con Riego por Cinta	10
Water and Nitrogen Consumption in Low Density Asparagus Plants (<i>Asparragus officinalis</i> L.) under Tape Irrigation <i>Adán Fimbres Fontes y José Lizárraga Navarrete</i>	
Morfología y Diferenciación de Colonias de Tres Tipos de Bacterias Lácticas	14
Morphology and Colonial Differentiation of Three types of Lactic Bacteria <i>Ramírez-Baca, P., B. García-Cansino, E. Moreno-Hernández, J. M. Ríos-Carmona, C. Rodríguez-Cisneros, J. Vásquez-Arroyo, R. Rodríguez-Martínez, S. Esparza-González, G. V. Nevárez-Morrillón</i>	
Susceptibilidad <i>in vitro</i> de una Cepa Resistente de <i>Staphylococcus aureus</i> a Diferentes Extractos Vegetales	19
<i>In vitro</i> Susceptibility of a <i>Staphylococcus aureus</i> Strain Resistant to Different Plant Extracts <i>Concepción García Luján, Sara E. Alonso Rojo, Rafael Rodríguez Martínez, Aurora Martínez Romero, Patricia Ramírez Baca, Alejandro Moreno Reséndez</i>	
Actividad Biológica <i>in vitro</i> de Extractos de Plantas del Sureste de Coahuila, México, Contra <i>Sitophilus oryzae</i> (L.) (Coleoptera: Curculionidae)	25
Biological Activity <i>in vitro</i> of Botanical Extracts of Plants of Southeast of Coahuila, Mexico, Against <i>Sitophilus oryzae</i> (L.) (Coleoptera: Curculionidae) <i>Carlos Orozco González, Eugenio Guerrero Rodríguez, Jerónimo Landeros Flores, Miguel Ángel García Martínez, Rosalinda Mendoza Villarreal, Ricardo Hugo Lira Saldivar</i>	
Eficiencia de la Inexperiencia Sexual de los Machos Cabríos para Estimular la Actividad Estral en Cabras Anéstricas mediante el Efecto Macho	31
Efficiency of Sexual Inexperience of Male Goats to Stimulate Estrous Behavior in Anestrous Female Goats through the Male Effect <i>Mauricio Alexander Valera, Alejandra Ramos Castillo, José Alberto Delgadillo Sánchez</i>	

CONVOCATORIA

La Dirección de Investigación de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

CONVOCA

a los investigadores, nacionales y extranjeros, interesados en publicar artículos científicos, a enviar sus contribuciones a la revista **Agraria -Nueva Epoca-**, bajo las siguientes bases:

Los trabajos recibidos se someterán al proceso de revisión descrito en las *Normas Editoriales* de la Revista.

Se recibirán contribuciones inéditas de todos los interesados, nacionales o extranjeros, en español o inglés.

Los artículos deberán versar sobre temas de contenido agrícola, pecuario, forestal, y socioeconómico del entorno regional, nacional e internacional.

Las modalidades de publicación son las siguientes:

Artículo científico

Es el resultado de un trabajo de investigación en el cual se aplicó, de forma rigurosa, el método científico, estudiando el efecto que tienen diferentes tratamientos sobre la respuesta medible de un sistema, como metodología para comprobar o rechazar una hipótesis claramente establecida en el trabajo.

Los artículos científicos que se envíen deberán constar de las siguientes partes: Título, Título en inglés, Autor(es), Institución(es) de adscripción y datos de localización del autor responsable (domicilio, teléfono, fax, e-mail), Abstract, que es la traducción al inglés del Resumen, incluidas las palabras clave; Resumen, que incluirá al pie las palabras clave hasta un máximo de seis, Introducción, Materiales y métodos, Resultados y discusión, Conclusiones, Literatura citada, Agradecimientos.

Ensayo científico

Consiste en el análisis crítico de una recopilación actualizada de artículos científicos, informes de investigación, o materiales similares, en los que el autor o autores aportan su opinión personal sobre un tema, estableciendo conclusiones respecto al estado actual del conocimiento sobre el mismo.

Partes de que consta el Ensayo: Título, Título en inglés, Autor(es), Institución(es) de adscripción y datos de localización del autor responsable (domicilio, teléfono, fax, e-mail), Abstract, que es la versión al inglés del Resumen, incluye las palabras clave, Resumen, incluidas las palabras clave hasta un máximo de siete, Introducción, Desarrollo del tema, con los subtítulos que se estimen convenientes, Discusión, cuando proceda, Conclusiones, Literatura citada.

Nota de investigación

Son materiales basados en trabajos experimentales que, sin perjuicio del método y rigor científicos, presentan aspectos metodológicos innovadores o resultados que, por su carácter novedoso, el autor considera de interés publicar antes de finalizar su investigación.

La nota, aunque de menor extensión, cubre todos los aspectos relevantes del proceso de investigación. Su estructura es similar a la del artículo científico, y trata cada uno de sus apartados, con menor profundidad y detalle, aunque no tiene que incluir los encabezados.

La excepción a lo anterior son el Abstract, que se omite, y la Literatura citada, apartado que deberá incluirse expresamente.

De ser necesario, podrán incluirse -también- algún cuadro o ilustración, cuando resulten relevantes para la mejor comprensión de la nota.

Los trabajos a publicar deberán hacerse llegar en versión electrónica, acompañados de una solicitud, de conformidad con las especificaciones marcadas en las Normas Editoriales arriba mencionadas, a la siguiente dirección electrónica: agraria_ne@uaaan.mx, con atención a:

Editor en Jefe de la Revista Agraria -Nueva Epoca-

Dirección de Investigación, UAAAN, Domicilio conocido, Buenavista,

Saltillo, Coahuila, México. CP. 25315

Para mayor información respecto a esta Convocatoria visite http://www.uaaan.mx/DirInv/portal_agraria/portal.htm para consultas diríjase al Editor en Jefe: agraria_ne@uaaan.mx.

Editorial

Nuevos Nichos para los Plaguicidas Orgánicos

El temor constante de la humanidad en relación con la contaminación causada por los pesticidas químicos, en auge en décadas pasadas, ha hecho que productores e investigadores se vuelvan hacia los pesticidas orgánicos como un medio de evitar esa contaminación que ha demostrado tener un efecto acumulativo pernicioso, tanto en hombres como en animales, al grado de amenazar seriamente la vida de quienes están expuestos a éstos, o se alimentan con los productos agrícolas tratados químicamente.

El interés por la agricultura orgánica en los países en vías de desarrollo ha ido creciendo rápidamente en los últimos años al grado de que la FAO (Organización para la Agricultura y Alimentación de la ONU por sus siglas en inglés), en el 2007 reconoció formalmente este modelo de producción como una alternativa viable, y significativa a la agricultura tradicional, basada en el uso de productos químicos. Esto en función de las características que hacen de la agricultura orgánica un modelo ecológico, con un fuerte potencial para contribuir a la conservación de la biodiversidad y, con ello, al aseguramiento de un mejor futuro para la humanidad al ofrecer una alternativa sostenible para la agricultura.

Sin embargo no debe asumirse -a priori- que un pesticida orgánico es bueno, sólo por el hecho de ser ecológico; un estudio realizado por dos investigadoras de la universidad canadiense de Guelph el año anterior (Rebecca Hallett y Christine Bahla), consistente en comparar la eficacia de plaguicidas de orígenes diversos, en relación con su impacto ambiental, tales como productos tradicionales, productos orgánicos y productos químicos nuevos de bajo impacto ambiental, revela algunos datos interesantes como es el hecho de que algunos plaguicidas orgánicos deben ser aplicados en cantidades ingentes lo que causa daños colaterales al eliminar otros organismos vivos que cumple otra función no siempre relacionada con el cultivo al que se aplica.

Otro aspecto a considerar es que en esta relación patógeno-plaguicida es que, las plagas, en tanto que organismos vivos, irán generando en su evolución, variedades resistentes a los productos que se utilicen para combatirlos, ya sean químicos u orgánicos. Esto lleva a entrar en la carrera contra el tiempo para seguir desarrollando nuevos pesticidas orgánicos, o ir adicionando características a los ya existentes, que permitan irle haciendo frente a las nuevas generaciones de patógenos resistentes a los productos orgánicos originarios.

Actualmente, México se sitúa entre los primeros lugares por el número de productores dedicados a la agricultura orgánica, aunque no puede decirse lo mismo con respecto al volumen de sus exportaciones de productos orgánicos.

Las posibilidades de los productos orgánicos como plaguicidas han ido generando una dinámica en la que se abren nuevos nichos para los productos ecológicos como son la agricultura por ambientes, llamada también de precisión y la siembra directa. Asimismo comienza a consolidarse la idea de mezclas de productos orgánicos, y otros que no lo son pero que tienen un bajo impacto, para extender un concepto de agricultura más accesible para mas productores.

Efecto del Patrón de Siembra en la Producción de Materia Seca en Girasol (*Helianthus annuus* L.) para Forraje

José Francisco Aguilera Vega, Armando Espinoza Banda*, Arturo Palomo Gil, Emiliano Gutiérrez del Río, José Jaime Lozano García

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, Periférico y carretera a Santa Fe s/n, Torreón Coah. CP: 27000, Teléfono 01(871) 7297610. E-mail: abanda@mixmail.com (*Autor responsable).

Abstract

Sunflower is an alternative culture for forage production at the Comarca Lagunera (La Laguna Region) in México. The objective of this assay was to evaluate the effect of the planting pattern in sunflower dry matter production of (*Helianthus annuus* L.) for forage. Three planting patterns (arrangements) were designed: A1=0,76m, A2= 0,38m and A3= separated twin furrows from 0,20 m to 0,76 m, and genotypes SAN and SANE, of normal and dwarf bearing respectively. The experimental design was in randomized blocks with four replications in a split plot arrangement. The main plots were the planting patterns, and the sub-plots were the genotypes. Total dry matter (MS) was quantified in five samplings, with 15 day intervals as of the planting date (June 30) in three plants in full competition. The arrangements were significantly different in the production of dry matter in all the five samplings. A2 arrangement statistically surpassed arrangements A1 and A3 in the samplings with an oscillating average of 45 and 27 percent respectively. The genotype SAN surpassed the SANE one by 33 percent.

Key Words: Row spacing, dry matter, *Helianthus annuus*

Resumen

El girasol es un cultivo alternativo en la producción de forraje en la Comarca Lagunera. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del patrón de siembra en la producción de materia seca en girasol (*Helianthus annuus* L.) para Forraje. Se diseñaron tres patrones de siembra o arreglos: A1=0.76m, A2= 0.38m y A3= surcos gemelos de 0.20m separados a 0.76m, y los genotipos SAN y SANE, de porte normal y enano respectivamente. El diseño experimental fue en bloques al azar con cuatro repeticiones en un arreglo en parcelas divididas. Las parcelas principales fueron los patrones de siembra y las subparcelas los genotipos. La materia seca total (MS) se cuantificó en cinco muestreos, con intervalos de 15 días a partir de la fecha de siembra (Junio 30) en tres plantas en competencia completa. Los arreglos fueron significativamente diferentes en la producción de materia seca en los cinco muestreos. El arreglo A2 superó estadísticamente a los arreglos A1 y A3 en los muestreos oscilando en promedio de 45 y 27 % respectivamente. El genotipo SAN superó en un 33 % a SANE.

Palabras clave: Distancia entre surcos, materia seca, *Helianthus annuus*,

Introducción

En la Comarca Lagunera, en el norte de México, el maíz y el sorgo ocupan después de la alfalfa un lugar importante del patrón forrajero, ya que se estima que se siembran un promedio de 10,500 ha por año. Una parte importante de la producción de estos cultivos se destina para ensilaje, con el propósito de disponer de alimento durante el periodo invernal, que es cuando la producción

de alfalfa disminuye. Los cultivos alternativos representan una opción en la producción de forraje; el girasol (*Heliantus annus* L.) ha demostrado ser una alternativa viable en la producción de forraje (Espinoza 1990, 1996), pues además de que tiene rendimientos similares al maíz y el sorgo, y tiene la virtud de utilizar menos agua, que ambos cultivos (Robles 1978, 1980).

Existen diferentes formas de buscar el incremento de la producción, una es, sin duda, generar genotipos con alto potencial de rendimiento, y la otra, modificar las prácticas

de siembra y manejo de cultivo (Zaffaroni y Schneiter 1989). Los patrones de siembra representan una opción para incrementar el rendimiento de materia seca por unidad de superficie pues permiten aumentar la demanda de población con un diseño adecuado de siembra, y permite aprovechar al máximo los recursos suelo-fertilizante y principalmente, el recurso agua (Carlson, 1990). Los arreglos de las plantas en los surcos y el arquetipo de planta tienen una marcada influencia en la eficiencia de la captación de la energía solar por las hojas y por consiguiente en la producción de materia seca. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del patrón de siembra en la producción de materia seca en girasol (*Helianthus annuus* L.) para forraje.

Materiales y Métodos

Esta investigación se realizó en el verano del 2003 en el Campo Experimental de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna UAAAN-UL), localizada a 25° 33' 26" LN y 103° 22' 07" LO en la Comarca Lagunera. Los materiales que se utilizaron fueron: SAN, de ciclo tardío, y SANE, de ciclo precoz. El genotipo SAN es de altura normal y el genotipo SANE es de porte bajo, las diferencias contrastantes, son para determinar la capacidad de producción de materia seca. El trabajo consistió en tres patrones de siembra ó arreglos. El primero, se estableció en el sistema tradicional a 0.76 m (A1), el segundo arreglo (A2) fue con distancias entre surcos a 0.38 m y el tercer arreglo (A3) constó de surcos gemelos a 0.20 m y separados a 0.76 m entre cada par, a una distancia entre plantas fue de 0.18 m y densidades de 73, 146 y 115 mil plantas por hectárea para A1, A2 y A3

respectivamente. Considerando cultivares y arreglos resultaron 6 tratamientos. Se utilizó un diseño en bloques al azar con arreglo en parcelas divididas, y cuatro repeticiones, con un total de 24 unidades experimentales. Cada arreglo constó de 4 hileras, o 2 pares de surcos de amplitud, y 10 m de largo.

La siembra se realizó, manualmente, el 30 de Junio de 2003, fertilizándose con la fórmula 100-80-00; se aplicó Thiodan 35 (Endosulfan), contra la mosca blanca (*Trialeurodes* sp) y gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*). Se aplicó un riego de presiembra (Junio 20) y 3 riegos de auxilio con intervalos de 18 días entre ellos. Se cuantificó la materia seca total (MS) en 5 muestreos, con intervalos de 15 días a partir de la fecha de siembra (Junio 30) y hasta 90 días después en etapa de madurez fisiológica. Para tal efecto se tomaron 3 plantas por parcela en competencia completa. Las 3 plantas se pesaron en verde, se trituraron, y se etiquetaron por separado en bolsas de papel, y se llevaron a secado en una estufa de aire forzado (FELISA) a una temperatura de 80 °C hasta lograr un seco constante aproximadamente de 3 a 4 días. Una vez secado, se registró el peso por separado, y se estimó la materia seca. Los datos se analizaron utilizando el programa SAS (1988), y la comparación de medias para efectos individuales e interacción A x G, se utilizó la diferencia mínima significativa (DMS).

Resultados y Discusión

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas para los arreglos (A), en los cinco muestreos realizados (Cuadro 1). Lo anterior indica que el patrón de siembra tiene efectos significativos en la producción de

Cuadro 1. Cuadrados medios para peso de materia seca total (ton ha⁻¹) para los muestreos a 15, 30, 45, 60 y 75 días después de siembra, en un estudio para evaluar el efecto del patrón de siembra en la producción de materia seca en Girasol (*Helianthus annuus* L.) para Forraje.

Fuentes de variación	GL	Cuadrados medios (Días)				
		15	30	45	60	75
Repeticiones	3	0.000003	0.012	0.295	0.212	0.558
Arreglos (A)	2	0.000121 **	1.420 **	4.432 **	19.491 **	41.372 **
Error (a)	6	0.000002	0.013	0.082	0.069	0.579
Genotipos (G)	1	0.000000	0.055	2.739 **	30.399 **	55.321 **
AxG	2	0.000003	0.228 *	1.567 **	1.292 *	1.012 **
Error (b)	9	0.000002	0.031	0.078	0.169	0.455
Total	23					
C.V. %		10.93	18.33	6.50	7.84	8.82

*, ** Diferencia significativa al 0.05 y 0.01 de probabilidad. Días = días después de la siembra; CV = Coeficiente de variación.

materia seca, lo cual discrepa con lo encontrado por Putt y Fehr (1951), aun cuando reconocen que, en tres años de estudio, existe una tendencia hacia un incremento de los arreglos estrechos sobre los amplios. En contraste Allesi *et al.* (1977) y Radford (1978) reportan incrementos en la producción de girasol en función de la reducción del ancho de surco, de 0.90m a 0.30m y de 1.08m a 0.36m respectivamente, en tanto Robinson (1978) opina que el girasol producirá mayor rendimiento cuando la distancia entre surcos y plantas sea más bien equidistante.

A excepción del muestreo a los 15 días, donde los arreglos a 0.38m (A2) y a 0.20m (A3), fueron estadísticamente iguales, (Cuadro 2), en el resto de los muestreos (30, 45, 60 y 75 días), el arreglo A2 superó estadísticamente a los arreglos A1 y A3, en los muestreos oscilando, en promedio de 45 y 27 % respectivamente, lo cual coincide con Ardell (1998) que reporta un incremento del 13 % con surcos separados a menos de 0.50 m comparados con los de 0.75 m. Además a los 75 días, fue donde se observó mayor producción con el arreglo A2 con 10 ton ha⁻¹ (Cuadro 2).

Respecto a los genotipos, solo se observaron diferencias

altamente significativas en los muestreos a 45, 60 y 75 días, (Cuadro 1), diferencias atribuidas en principio a su arquitectura (Zaffaroni y Schneiter, 1991) lo cual influye en la intercepción de radiación solar y la subsecuente producción de materia seca, pues SAN es un genotipo de porte normal, y SANE lo es de porte enano. En promedio SAN produjo estadísticamente mayor cantidad de MS que SANE en los muestreos a 45, 60 y 75 días, ampliándose las diferencias a través de los muestreos. A los 75 días, se expresó la mayor producción de MS, donde el genotipo SAN produjo 9.2 ton ha⁻¹ contra 6.1 ton ha⁻¹ del genotipo SANE, es decir 33 % superior (Cuadro 4). En términos de eficiencia SAN produjo 123 Kg día⁻¹ contra 81.3 Kg día⁻¹ de SANE.

El efecto de interacción de arreglos x genotipo (AxG) se observó desde los 30 hasta los 75 días; al 0.05 significativa para los 30 y 60 días, y altamente significativa para 45 y 75 días (Cuadro 1). A 30 días, ambos genotipos se comportaron, estadísticamente, de manera similar en los arreglos A1 y A2, en tanto que en A3 fueron diferentes estadísticamente, donde el genotipo SAN produjo un 41 % sobre SANE, (Cuadro 2).

Cuadro 2. Comparación de medias para efectos independientes y su interacción de materia seca total en ton ha⁻¹, en un estudio para evaluar el efecto del patrón de siembra en la producción de materia seca en Girasol (*Helianthus annuus* L.) para Forraje.

DÍAS†	Genotipos	Arreglos			\bar{x}	DMS
		A1	A2	A3		
15	SAN	0.007 a	0.015 a	0.015 a	0.01 a	
	SANE	0.008 a	0.015 a	0.013 a	0.01 a	
	\bar{x}	0.008 b ¹	0.015 a	0.014 a		0.002
30	SAN	0.5 a ²	1.3 a	1.2 a	1.0 a	0.3
	SANE	0.5 a	1.5 a	0.7 b	0.9 a	
	\bar{x}	0.5 c	1.4 a	0.9 b		0.1
45	SAN	3.6 a	5.9 a	4.5 a	4.6 a	0.4
	SANE	3.6 a	4.2 b	4.1 a	4.0 b	
	\bar{x}		3.6 c	5.1 a	4.3 b	0.3
60	SAN	4.7 a	8.4 a	6.0 a	6.4 a	0.7
	SANE	3.3 b	5.6 b	3.5 b	4.1 b	
	\bar{x}		4.0 c	7.0 a	4.8 b	0.3
75	SAN	6.2 a	11.0 a	10.2 a	9.2 a	1.1
	SANE	4.8 b	9.1 b	4.5 b	6.1 b	
	\bar{x}	5.5 c	10.0 a	7.4 b		0.9

G1 = SAN, G2 = SANE, 1: Medias marginales con la misma letra son estadísticamente iguales, (DMS = 0.05 P) y 2: Medias de la interacción son comparadas en sentido vertical, (DMS = 0.05 P); †DÍAS=Días después de la siembra.

En los muestreos a los 45, 60 y 75 días, se observó la mayor producción se MS en el arreglo A2, donde SAN superó estadísticamente a SANE. A los 60 y 75 días, ambos genotipos presentaron diferencias estadísticas para los tres arreglos, además de ser las etapas en las que existió la mayor producción de MS; a los 75 días en A2 se observó la máxima producción, donde SAN produjo 11 ton ha⁻¹ contra 9.1 ton ha⁻¹ de SANE. Los rendimientos coinciden con lo reportado por Farías (1984) y Espinoza (1996) con rendimientos de 10 a 14 ton ha⁻¹ de MS.

Los genotipos asociados con la mayor densidad y distribución espacial de las plantas en el arreglo A2, influyó en la producción de materia seca, pues de acuerdo a Johnson (1987), ello condiciona a una menor competencia por agua, suelo y luz. A este respecto Mohammad (2005) encontró que la mayor equidistancia favorece una alta intercepción de radiación y coeficiente de extinción.

Conclusiones

Independientemente del genotipo, el patrón de siembra determinó la producción de materia seca, donde el arreglo con surcos a 0.38 m presentó la mayor producción. El genotipo de altura normal SAN superó a SANE genotipo de porte bajo desde los 45 hasta los 75 días después de la siembra.

Literatura Citada

- Alessi, J., J.F. Power, and D.C. Zimmerman. 1977. Sunflower yield and water use as influenced by planting date, population and row spacing. *Agron. J.* 69: 465 – 469.
- Ardell, H. 1998. Row spacing effects on Sunflower production in minimum and till systems. Agricultural research service; www.nal.usda.gov/ttic/tektran.
- Carlson, P. S. 1990. Biología de la productividad de cultivos. AGT, Ed. S. A. 403 p.
- Espinoza, B. A. 1990. Evaluación del potencial forrajero del girasol (*Helianthus annuus* L.) en la Comarca Lagunera. Informe de Investigación. FAZ - UJED. Venecia, Dgo., México.
- Espinoza, B. A. 1996. Potencial forrajero en genotipos de girasol. P: 45. *In: Sahagun, C.J., P. Ramirez V. y F. Castillo G. (eds.). Memorias del XVI Congreso de Fitogenética.* SOMEFI. Chapingo, México.
- Farías, J. M. 1984. Girasol para forraje. Resumen del 8° día del forrajero. Centro de Investigación Agrícola del Norte. Campo Agrícola Experimental de la Laguna. INIA. Publicación especial. p. 1 – 3.
- Johnson, R.R. 1987. Crop management. *In: Wilcox J.R (ed.) 1987. Soybeans: Improvement, production, and uses.* Agron. Monogr. 16. 2nd, ed. ASA. CSSA. And SSSA. Madison, WI. p. 355-390.
- Mohammad J. Z., A. Ghalavand and J. Daneshian. 2005. Effect of planting patterns of sunflower on yield and extinction coefficient. *Agron. Sustain. Dev.* 25: 513-518.
- Putt, E. D and Fehr, J. A. 1951. Effect of plant spacings, row spacings and number of plant per hill on advance hybrid sunflower. *Sci. Agric.* 31: 480 – 491.
- Radford, B. F. 1978. Plant population and row arrangement for irrigated and rainfed oil seed sunflower (*Helianthus annuus* L.) the Darling Downs. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 18: 135.
- Robinson, R.G 1978. Production and culture. *In: J.F. Carter (ed). Sunflower Science and Technology.* Agronomy 19 Amer. Soc. Agron-Crop Sci. Soc. Amer-SSSA. USA. p. 89-135.
- Robles, S. R. 1978. Girasol (*Helianthus annuus* L.) TECMON-51 primera variedad para forraje formada en México. En: Boletín Bimestral 17: 2-14. División De Ciencias Agropecuarias y Marítimas. ITESM, Monterrey, N. L.
- Robles, S. R. 1980. Producción de textiles y oleaginosas. Primera edición. De. LIMUSA, México, D. F. p. 620.
- SAS (1988). Introductory Guide for personal computer, Release 6.03 Edition. Cary, NC.
- Zaffaroni, E., and A.A. Schneiter. 1989. Water-use efficiency and light interception of semidwarf and standard-height sunflower hybrids grown in different row arrangements. *Agron. J.* 81: 831-836.
- Zaffaroni, E., and A. A. Schneiter. 1991. Sunflower production as influenced by plant type, plant population, and row arrangement. *Agron. J.* 83: 113 - 118.

Consumo de Agua y Nitrógeno en Espárrago (*Asparragus officinalis* L.) de Baja Población de Plantas con Riego por Cinta

Adán Fimbres Fontes* y José Lizárraga Navarrete

Campo Experimental Caborca, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Apdo. Postal 125, Caborca, Sonora, México. 3ra. De los Jardines No. 4. Caborca, 83600, Son., México. Tel. 637 37 27069. E-mail: ifimbres@prodigy.net.mx (*Autor responsable).

Abstract

Because of its high demand in the international markets asparagus (*Asparragus officinalis* L.) is the most profitable culture in the Caborcan region of the Mexican state of Sonora, besides of the its economic revenues, and employment generation during harvest time. Nevertheless, it is a culture that demands a great amount of water -a scarce element in the region- to obtain a good production, to this must be added the high electricity charges due to water extraction from deep wells. The aim of this research was to determine the right N dose, and the best percentage of reference evapotranspiration (ET_o) for low density asparagus plants. The experiment was carried out at the INIFAP's experimental station at Caborca, during the cycle 2004-2005 with the variety Atlas, eight years old. The treatments were: 200 and 600 kg ha⁻¹ N; as well as 72, 128 and 217 % of ET_o, in a completely randomized design, with 6 treatments, and 4 replications in factorial adjustment AxB, where A = N fertilization and B = reference evapotranspiration (ET_o). The evaluated variables were height of the plant, length of turions, and yield. The results indicated that the low density asparagus plants not only require a constant humidity rate, but also N enough to obtain good quality turions. Therefore, it is recommended to apply 600 kg ha⁻¹ N and at least 128% ET_o.

Key words: Irrigation, tape irrigation, vegetables, reference evapotranspiration, turion.

Resumen

El espárrago (*Asparragus officinalis* L.) es la hortaliza más rentable de la región de Caborca, Son., en México, ya que tiene alta demanda en el mercado internacional y además ocasiona una gran derrama económica, principalmente por los empleos que genera durante la cosecha. Sin embargo, es un cultivo que demanda gran cantidad de agua para obtener buenas producciones el cual es un elemento escaso en esta región, además de costoso debido al alto consumo de energía en su extracción de pozos profundos. El objetivo de esta investigación fue determinar la dosis de N y el mejor porcentaje de la evapotranspiración de referencia (ET_o) para espárrago de baja densidad de plantas. El experimento se llevó a cabo en el Campo Experimental Caborca, del INIFAP, durante el ciclo 2004-2005 en la variedad Atlas de 8 años de edad. Los tratamientos fueron: 200 y 600 kg ha⁻¹ N; así como 72, 128 y 217 % de ET_o, en un diseño completamente al azar con seis tratamientos y cuatro repeticiones en arreglo factorial AXB, en donde A = fertilización nitrogenada y B = evapotranspiración de referencia. Las variables evaluadas fueron, altura de la planta, longitud de turiones y rendimiento. Los resultados indicaron que el espárrago de baja densidad de plantas no sólo requiere humedad constante, sino también N para obtener una buena calidad de los turiones. Por lo tanto, se recomienda aplicar 600 kg ha⁻¹ N y al menos 128 % de ET_o.

Palabras clave: Irrigación, riego por goteo, hortalizas, evapotranspiración de referencia, turión.

Introducción

El espárrago (*Asparragus officinalis* L.) es el principal cultivo de la región de Caborca, Sonora, México; ya que presenta buena rentabilidad debido a que tiene buena demanda en el mercado internacional; además, de

que ocasiona gran derrama económica y generación de empleos (280 jornales/ha) para la zona durante todo el año, pero principalmente en cosecha.

En cuanto a los requerimientos de agua Robinson *et al.* (1984) indicaron que 4.2 cm de lámina de agua aplicada

dos veces por semana durante toda la temporada, acumularon una lámina de agua de 336 cm en un suelo arenoso del sureste de California y fueron suficiente para una buena cosecha.

Sterrett *et al.* (1990) probando diferentes tratamientos y sistemas de riego presurizado sobre el rendimiento del espárrago, concluyeron que la manguera enterrada resultó con el mayor incremento en la producción, en comparación con el testigo (agua residual).

Ojeda *et al.* (1999) indican que los adelantos tecnológicos recientes en sensores y controles han promovido mejores sistemas para monitorear en forma más precisa y casi continua el tiempo atmosférico, de vital importancia en varios procesos de interés agrícola como la evapotranspiración, lo cual ha propiciado la obtención de ecuaciones más precisas, como las de tipo Penman, para estimar los requerimientos hídricos de los cultivos.

Robles (2001) señala que todos los modelos probados para estimar la evapotranspiración potencial o de referencia, presentan una buena correlación ($r=0.95-0.99$) con la evapotranspiración real observada y resultaron confiables para estimar la evapotranspiración real diaria en el cultivo de chile bell en el Valle del Yaqui, Sonora, sin embargo, los modelos de Penman, Penman-Monteith y Shuttleworth, presentaron variaciones diarias muy fuertes, debido a la forma de obtener el valor diario del déficit de presión de vapor.

Gruber *et al.* (2002) comparando algunos métodos para estimar la evapotranspiración en el cultivo de melón bajo invernadero, encontraron que la evapotranspiración medida (ETc) fue menor para Penman Monteith que con los otros métodos estudiados.

Navarro *et al.* (1997) en un estudio con espárrago en la región de Caborca concluyen que es mejor regar cuando la humedad aprovechable se encuentra en 35 %, en el periodo de postcosecha del cultivo, lo cual significa una frecuencia de riego durante primavera y otoño de 19 días y en el verano de 14 días (durante cosecha los riegos fueron más frecuentes). La lámina total aplicada a éste tratamiento fue de 278 cm y el más húmedo de 374 cm.

Fimbres *et al.* (1998) indican que la lámina aplicada al espárrago bajo riego por goteo en el tratamiento más húmedo fue de 246 cm de agua y al tratamiento más seco de 122 cm.

Fimbres (2001) trabajando con tanque evaporímetro tipo A en espárrago de alta densidad de plantas y riego con cinta, encontró que este cultivo requiere de humedad constante, que aunque resiste sequía, no es posible castigarlo en tiempo de cosecha, ya que esto pudiera traer consecuencias graves afectando el grosor y turgencia de

los turiones. El rendimiento en el tratamiento húmedo fue de 489 cajas ha⁻¹ y lámina de riego aplicada de 188.88 cm.

La región de Caborca cuenta actualmente con una superficie de espárrago aproximada de 4,200 ha. Este cultivo tradicionalmente se tiene sembrado (plantado) a dos metros de separación entre hileras, lo cual requiere gran cantidad de agua para obtener buenas producciones, agravando la problemática que se tiene en la región de escasez de agua debido al abatimiento del manto acuífero y a los altos costos de energía eléctrica por la extracción del subsuelo. Para reducir el problema, algunos productores están plantando espárrago a cuatro metros de separación entre hileras; pero se desconoce la cantidad de agua real que requiere el nuevo sistema de plantación. Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue determinar para espárrago de baja densidad de plantas, la dosis de N y el mejor porcentaje de la evapotranspiración de referencia (ETo).

Materiales y Métodos

Este trabajo se realizó en el Campo Experimental Caborca del INIFAP, ubicado en el Km 22 carretera al Desemboque, Caborca, Sonora, México, en un suelo de textura migajón arenoso (60 cm), durante el ciclo 2004-2005 en la variedad Atlas, el cual se había sembrado por semilla el 10 de febrero de 1997. Originalmente se sembró a doble hilera con una densidad de población de 40 000 plantas ha⁻¹. Sin embargo, en abril de 2003, se redujo eliminando un surco a 20,000 plantas ha⁻¹. Las dosis de N en el factor B, fueron de 200 kg ha⁻¹ N y 600 kg ha⁻¹ N. Los tratamientos de riego aplicados (A) fueron el 72, 128 y 217 % de la evapotranspiración de referencia (ETo) calculada por el método de Penman-Monteith dato obtenido de una estación meteorológica automática. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 4 repeticiones en arreglo factorial. Se usaron tres tipos de cinta con gotero de flujo turbulento de gasto de 0.566 LPH (8 mil), 1.02 LPH (10 mil) y dos cintas, una de 1.13 LPH (10 mil) y la otra de 0.566 LPH, que totalizaron 1.696 LPH. El espaciamiento entre goteros fue de 30 cm. Las líneas regantes se colocaron en medio de las hileras de plantas y a 4 m de separación. Se aplicaron riegos diarios de lunes a viernes, pero en primavera y otoño fueron cada tercer día, de acuerdo a la evapotranspiración de referencia obtenidos en la estación Los Sapos, ubicada a 18 km al noroeste del sitio experimental. El tiempo de riego se calculó con la ecuación $T = Kc \cdot ETo \cdot A \cdot Q^{-1}$. Donde T = tiempo en horas, Kc el coeficiente de cultivo, ETo = Evapotranspiración de referencia (mm), A = área (m²) y Q = gasto del gotero (LPH). Los coeficientes (Kc) fueron: 1.0 durante enero y febrero, y 0.60 de marzo a octubre. El periodo de cosecha del espárrago fue del 25 de febrero a 15 de abril y los cortes se hicieron cada tercer día (20

cortes). En cuanto a calidad, los turiones se clasificaron en tres tamaños: pequeño, mediano) y grande para, de esta forma poder determinar mejor los efectos del agua sobre el cultivo. Las variables medidas fueron: altura de planta, rendimiento por tamaño así como el rendimiento total.

Resultados y Discusión

En el Cuadro 1 se muestra la altura de planta y la lámina de riego aplicada, se observó una diferencia significativa entre tratamientos: el tratamiento de 217 % de ETo fue el que provocó mayor altura de planta (200 cm); pero también, el de mayor cantidad de agua aplicada (189 cm). El tratamiento de 72 % de ETo fue el de menor altura con 124 cm y lámina de agua aplicada de 63 cm. Cabe señalar, que la altura de planta fue proporcional a la cantidad de agua aplicada, es decir, a mayor cantidad de agua aplicada, se obtuvo mayor altura y a menor cantidad menor altura. La mayor altura de la planta es consecuencia de una mayor acumulación de sustancias de reserva en la corona del espárrago, lo cual incrementa el número de turiones y el tamaño del mismo.

Cuadro 1. Altura de planta y lámina aplicada en espárrago de baja densidad de plantas, bajo riego por cinta; 2004-2005.

Tratamiento (% ETo)	LA (cm)	AP (cm)
217	189	200 a
128	114	171 b
72	63	124 c

LA = Lámina aplicada; AP = Altura de planta. Cifras con la misma literal son estadísticamente iguales (Tukey 0.05).

En el Cuadro 2 se muestra la eficiencia del uso del agua y el rendimiento total de espárrago. Se observa que no hubo diferencia significativa en el rendimiento; sin embargo, si hubo diferencias en eficiencia en el uso del agua, siendo 72 % ETo el de mayor eficiencia con 0.39 kg m⁻³. La misma tendencia encontraron Fimbres y Uranda (2003) en espárrago de alta densidad de plantas con este mismo porcentaje de evapotranspiración de referencia. Los tratamientos de 217 % ETo y 128 ETo, fueron iguales en rendimiento, pero diferentes en eficiencia en el uso del agua. Tampoco hubo diferencia significativa en rendimiento con respecto a las dosis de N (Cuadro 3). Lo mismo encontró Navarro *et al.* (2005) en una plantación joven de espárrago al probar una combinación de niveles de humedad aprovechable y dosis de N.

Cuadro 2. Eficiencia y rendimiento total en espárrago de baja densidad de plantas, bajo riego por cinta. 2004-2005.

ETo (%)	Eficiencia Kg m ⁻³	Rendimiento (Kg ha ⁻¹)
217	0.13	2437.87 a
128	0.24	2707.62 a
72	0.39	2473.87 a

Cifras con la misma literal son estadísticamente iguales (Tukey 0.05).

Cuadro 3. Rendimiento en espárrago con dos tratamientos de N de baja densidad de plantas, bajo riego por cinta. 2004-2005.

N (Kg ha ⁻¹)	Rendimiento (Kg ha ⁻¹)
200	2504.42 a
600	2575.16 a

Cifras con la misma literal son estadísticamente iguales (Tukey 0.05).

En el Cuadro 4 se observa que no hubo diferencia significativa entre tratamientos para clasificación de espárrago (sólo mayor peso en el grande), en donde los tres porcentajes de evapotranspiración fueron iguales.

Sin embargo, en la interacción agua y N (600 kg ha⁻¹ N) para la clasificación grande, sí se encontró diferencia significativa, siendo el tratamiento de 72 % de ETo con lámina aplicada de 63 cm, el de menor clasificación grande (1009.62 kg ha⁻¹), mientras que los tratamiento con mayor humedad (128 y 217 %), con lámina de agua aplicada de 114 y 189 cm, produjeron mayor cantidad de turiones de clasificación del tipo grande, por lo que se observa, que la lámina de agua aplicada y el N influyeron positivamente en la clasificación grande del espárrago aún bajo este sistema de plantación (Cuadro 5).

Con respecto al N y al agua Roth y Gardner (1989) indicaron que se requieren aplicaciones de 400 a 500 kg ha⁻¹ N con una lámina de agua que varía de 270 a 310 cm. Los mismos autores (Roth y Gardner, 1990) mencionaron que, aplicaciones reducidas de N no sólo disminuyen el rendimiento total, sino también afectan la distribución del tamaño de los turiones (mayor porcentaje de tamaños chicos y medianos).

Cuadro 4. Clasificación en espárrago de baja densidad de plantas bajo riego por cinta. 2004-2005.

ETo (%)	CH	M (Kg ha⁻¹)	G
217	420.75 a	767.37 a	1221.12 a
128	493.75 a	961.12 a	1254.75 a
72	527.87 a	907.13 a	1009.62 a

CH = Chico; M = Mediano; G = Grande. Cifras con la misma literal son estadísticamente iguales (Tukey 0.05).

Cuadro 5. Clasificación Grande para la interacción agua y N (600 kg ha⁻¹ N) en espárrago de baja densidad de plantas bajo riego por cinta. 2004-2005.

ETo (%)	Grande (Kg ha⁻¹)
217	1172.00 ab
128	1463.75 a
72	778.25 b

Cifras con la misma literal son estadísticamente iguales (Tukey 0.05).

Conclusiones

Con base en lo anterior se concluye que el cultivo de espárrago de baja densidad de plantas no sólo requiere humedad constante, sino también N para obtener una buena calidad de turiones. Por lo tanto, se recomienda aplicar 600 kg ha⁻¹ N y al menos 128 % de ETo.

Agradecimiento

Al Sr. Juan Manuel Torres Aceves por su valiosa ayuda en la disponibilidad de los recursos.

Literatura Citada

Fimbres, F. A. 2001. Optimización del riego con cinta superficial y enterrada en espárrago. *Terra*. 19: 191-195.
 Fimbres, F. A., y A. Uranda, A. 2003. Programación del

riego en espárrago usando una estación meteorológica automatizada. *Biotecnia*. (2): 3-9.

Fimbres, F. A., R. L. Grijalva, C., y M. J. Valenzuela, R. 1998. Study of the regular and high application of water with drip irrigation in asparagus. *Hort. Sci.* 33(3):455.
 Gruber, L. L., L. Tijerina, R. Acosta, y G. Carrillo. 2002. Comparación de algunos métodos micrometeorológicos para estimar la evapotranspiración en el cultivo de melón, en condiciones de invernadero. Resúmenes del XXXI Congreso de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Torreón, Coahuila, México.
 Navarro, A. J. A., F. Robles, C., A. Fimbres, F., y R. L. Grijalva, C. 1997. Necesidades de agua y fertilización en espárrago. VII Congreso Nacional de Horticultura. Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas, A. C. p. 93.
 Navarro, A. J. A., A. Fimbres, F., y A. López, C. 2005. Productividad del espárrago en condiciones de riego y fertilización nitrogenada. *Terra*. 23: 121-127.
 Ojeda, B. W., E. Sifuentes, I., J. M. González, C., J. A. Guillen, G., y H. Unland, W. 1999. Pronóstico del riego en tiempo real. Manual de capacitación técnica. Instituto Mexicano de la Tecnología del Agua. Jiutepec, Morelos. México. 224 pp.
 Robinson, F. E., W. L. Berry., D. J. Scherer and T. R. Thomas. 1984. Yield potential of asparagus irrigated with geothermal and ground water on Imperial East Mesa Desert, California. *Hort. Sci.* 19(3):407-408.
 Robles, C. F. 2001. Comparación de cinco modelos para la estimación de evapotranspiración diaria en chile bell en el valle del Yaqui, Sonora. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON). Cd. Obregón, Sonora.
 Roth, R. L., and B. R. Gardner. 1989. Asparagus yield response to water and nitrogen. *Transactions of the ASAE* 32:105-112.
 Roth, R. L., and B. R. Gardner. 1990. Asparagus spear size distribution and earliness as affected by water and nitrogen applications. *Transactions of the ASAE* 33: 480-486.
 Sterrett, S. B., B.B. Ross, and Jr. C. P. Savage. 1990. Establishment and yield of asparagus as influenced by planting and irrigation method. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115(1):29-33.

Morfología y Diferenciación de Colonias de Tres Tipos de Bacterias Lácticas

P. Ramírez-Baca*¹, B. García-Cansino², E. Moreno-Hernández², J. M. Ríos-Carmona², C. Rodríguez-Cisneros, J. Vásquez-Arroyo^{1,2}, R. Rodríguez-Martínez¹, S. Esparza-González², G. V. Nevárez-Morrillón³

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna. Periférico y Carr. Santa Fe, 27054, Torreón, Coah. México. Tel (871) 715-8810, Fax (871) 715-2964. E-mail: ramirezbp2000@hotmail.com (*Autor responsable). ²Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Químicas. Av. Artículo 123 s/n Fracc. Filadelfia, Gómez Palacio, Dgo. México. ³Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas, Apdo. Postal 1542-C, Chihuahua, Chih. México.

Abstract

Yogurt is a milky product fermented with lactic cultures that include *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* as mixed cultures. Probiotic bacteria, like *L. acidophilus*, are believed to have therapeutic properties, that is the reason why they may be added to yogurt in order to provide it with additional properties. Yogurt must contain, at least, 10^6 UFC ml⁻¹ of viable bacteria at the time of its consumption, this is why it is important to state the differentiation of this type of bacteria in fermented products. The aim of this work was to state the difference, with a combination of culture means, of the bacterial groups present in a sample of fermented milk inoculated with *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* and *L. acidophilus*. Six different means of culture were assayed: 1) agar with skimmed milk at 20%, 2) agar with skimmed milk at 10%, 3) MRS, 4) MRS with sorbitol at 5%, 5) MRS with sorbitol at 5%, and controlled pH at 5,4, 6) M17 with controlled pH at 7,2; and growth, and the differentiation in the morphology of each one of the three studied bacteria were evaluated. The means used for the differentiation of the colonies were MRS with sorbitol, and pH fit to 5,4 for the *L. bulgaricus* and *L. acidophilus*, where a different morphology for each of these microorganisms is observed. *L. bulgaricus* colonies had, approximately, 1,0 mm in diameter, with a morphology with indefinite edges, flat, and with a translucent white, and opaque color. The colonies of *L. acidophilus* were convex, circular, punctiform and smaller than the previous ones. The *S. thermophilus* grew in the M17 Agar, and the observed colonies were round, white, smooth and shining; in this mean, growth of the lactobacillus was not observed. The use of MRS with sorbitol at 5% with a controlled pH of 5,4 and M17 is a recommended mean for the differentiation of the studied bacteria.

Key words: lactic bacteria, differentiation, *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, yogurt

Resumen

El yogurt es un producto lácteo fermentado con cultivos lácticos que incluyen *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* como cultivos mixtos. A las bacterias probióticas como el *L. acidophilus* se les atribuyen propiedades terapéuticas, por lo que se pueden adicionar al yogurt con objeto de proporcionarle propiedades adicionales. El yogurt debe contener al menos 10^6 UFC ml⁻¹ de bacterias viables al momento de su consumo, por lo cual, se considera importante la diferenciación de este tipo de bacterias en productos fermentados. El objetivo de este trabajo fue diferenciar con una combinación de medios de cultivo, los grupos bacterianos presentes en una leche fermentada inoculada con *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *L. acidophilus*. Se probaron seis diferentes medios de cultivo: 1) agar con leche descremada al 20 %, 2) agar con leche descremada al 10 %, 3) MRS, 4) MRS con sorbitol al 5 %, 5) MRS con sorbitol al 5 % y pH controlado a 5.4, 6) M17 con pH controlado a 7.2, y se evaluaron el crecimiento y la diferenciación en la morfología de cada una de las tres bacterias estudiadas. Los medios útiles para la diferenciación de las colonias fueron el MRS con sorbitol y pH ajustado a 5.4 para el *L. bulgaricus* y *L. acidophilus*, en donde se observa una morfología diferente de cada uno de estos microorganismos. Las colonias del *L. bulgaricus* tuvieron aproximadamente 1.0 mm de diámetro, una morfología con bordes indefinidos, planas, color blanco translúcido y opacas. Las colonias de *L. acidophilus*

fueron convexas, de forma circular, puntiformes y más pequeñas que las anteriores. El *S. thermophilus* se desarrolló en el Agar M17, y se observaron colonias redondas, blancas, lisas y brillantes; en este medio, no se observó crecimiento de los lactobacilos. Se recomienda la utilización de los medios MRS con sorbitol al 5 % y pH controlado a 5.4 y M17 para la diferenciación de las bacterias estudiadas.

Palabras clave: bacterias lácticas, diferenciación, *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, yogurt

Introducción

El yogurt es un producto fermentado por la acción de los cultivos lácticos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* (Djouzi *et al.*, 1997; DeNoni *et al.*, 2004) que en general refleja la composición de la leche de la cual fue elaborado. Es una buena fuente de proteína, riboflavina y vitamina B12, así como de P, Mn y Ca (Borchers *et al.*, 2002), apreciado particularmente por sus características benéficas sobre la salud, y por sus propiedades sensoriales (Corich *et al.*, 2004). En años recientes se ha vuelto una práctica común adicionar, además de las dos indispensables, algunas bacterias probióticas (*Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*) (Vinderola *et al.*, 2000a; Vinderola *et al.*, 2000b; Chick *et al.*, 2001; Borchers *et al.*, 2002), principalmente a causa de los efectos benéficos que se les atribuyen (Dave y Shah, 1996; Dave y Shah, 1998; Davidson *et al.*, 2000). Aunque *S. thermophilus* es muy estable bajo condiciones normales de refrigeración por al menos 6 semanas, *L. bulgaricus* inicialmente incrementa su cuenta, pero después disminuye en el mismo período de tiempo, mientras que las especies de *L. acidophilus* y *B. bifidum* son aún menos estables cuando se adicionan al yogurt, y su número declina en algunos yogurt casos, especialmente en aquellos en que el pH disminuye rápidamente (Borchers *et al.*, 2002), aunque, por otra parte, su viabilidad se incrementa cuando la concentración de O disuelto es baja (Dave y Shah, 1998). La relación simbiótica entre *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, ha sido utilizada por muchos años en la elaboración del yogurt (Radke-Mitchell y Sandine, 1986; Nogueira *et al.*, 1998; Corich *et al.*, 2004). El número de bacterias vivas debe permanecer alto durante toda su vida de anaquel (Corich *et al.*, 2004) y el éxito de la fermentación descansa en la sinergia entre ambas bacterias (Courtin y Rul, 2003). El yogurt, generalmente, debe contener al menos 106 bacterias viables por gramo a la hora de su consumo, aunque estos límites no se observan en todos los países ya que en Francia y España, el mínimo requerido es de 5 x 10⁸ UFC ml⁻¹, mientras que en Suiza

se ha establecido como norma 106 UFC ml⁻¹, en Japón 107 UFC g⁻¹ y en Portugal 108 UFC g⁻¹ (Biorollo *et al.*, 2000; Corich *et al.*, 2004).

Considerando que ambas bacterias, tanto *S. thermophilus* como *L. bulgaricus* son capaces de crecer por sí mismas en leche, ésta interacción indirecta y positiva se llama proto-cooperación y, frecuentemente, tiene un efecto benéfico en el crecimiento bacteriano, en la producción de ácido láctico, y de compuestos aromáticos (Vinderola *et al.*, 2002). Se han identificado algunos de los efectos resultantes de las actividades metabólicas de los patrones de ambas bacterias, tales como la producción de ácido pirúvico, fórmico y CO₂ por *S. thermophilus*, que estimulan el crecimiento del *L. bulgaricus*, y la producción de péptidos y aminoácidos por *L. bulgaricus* que estimulan el crecimiento del *S. thermophilus* (Davis *et al.*, 1971; Courtin y Rul, 2003).

La actividad de los cultivos lácticos es de gran importancia en los procesos de producción de alimentos lácteos fermentados (Cachon *et al.*, 2002), por lo que debe tenerse un control sobre el tipo y número de bacterias viables en los productos que llegan al consumidor a fin de que contengan las características alimenticias y terapéuticas que se le atribuyen. Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue describir la morfología y diferenciar las bacterias comerciales en una leche fermentada inoculada con *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *L. acidophilus*.

Materiales y Métodos

Se trabajó con leche entera en polvo (Nido ® Nestlé de México, S.A. de C.V), reconstituida al 12 % m/v, y esterilizada a 121°C durante 15 minutos y con bacterias lácticas comerciales de *S. salivarius* spp *thermophilus*, *L. delbrueckii* spp *bulgaricus* y *L. acidophilus* (Rhodia Inc®, Dairy Business, Madison, WI 53701, USA). Todos los cultivos fueron pre-cultivados aeróbicamente, adicionando un 1.0% del cultivo a 15 ml de leche en polvo reconstituida y previamente esterilizada en un tubo de ensayo con rosca. Posteriormente, se prepararon 50 mL de leche, se esterilizaron bajo las mismas condiciones e inocularon para cada uno de los tratamientos al 0.8% (v/v) a partir del inóculo inicial. Se prepararon muestras de leches fermentadas, elaboradas con cultivos puros y con asociaciones de microorganismos *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*. Cuando el tratamiento involucró combinaciones, los microorganismos se sembraron en forma equivalente de manera que el contenido total fuera de 0.8%.

Se preparó la muestra acorde con la NOM-110-SSA1-

1994, preparando una dilución primaria en solución peptonada (1.0 g peptona, 8.5 g cloruro de sodio, agua 1.0 l, pH 7.0± 0.1) (Diario Oficial de la Federación 1995). Posteriormente, se hicieron diluciones decimales seriadas para cada una de las bacterias para su siembra en placa. Se prepararon diferentes medios de cultivo: 1) Agar con Leche descremada al 20 %, 2) Agar con Leche descremada al 10 %, 3) Agar Mann-Rogosa y Sharpe (MRS), 4) MRS con sorbitol al 0.5 %, 5) MRS con sorbitol al 5% y pH controlado a 5.4, 6) Agar M17 con pH controlado a 7.2. Todos los medios de cultivo usados fueron DIFCO® (Becton Dickinson and Co. Sparks, MD 21152 USA). El medio de cultivo MRS-sorbitol se preparó adicionando una solución al 5 % de sorbitol estéril filtrándolo a través de una membrana Millipore de 0.45 µm al agar MRS estéril, justo antes de vaciarse. Los medios se inocularon de cada una de las diluciones por extensión en superficie, y se incubaron a 37 °C por 72 h en una atmósfera de CO₂ para los medios de leche descremada y MRS. El Agar M17 se incubó en forma aeróbica a 37 °C por 72 h (International IDF Standard 117 1983, International IDF Standard 117A 1988, Marshall 1992).

En cada uno de los medios de cultivo, se evaluó la morfología de las colonias de cada uno de los microorganismos, y de sus combinaciones, así como la posibilidad de diferenciarlos por su crecimiento o morfología en los diferentes medios.

Resultados y Discusión

Debido a la importancia que tiene el conocer el tipo y número de bacterias viables en productos fermentados al momento de su consumo, se evaluaron diferentes medios de cultivo para diferenciar tres tipos de bacterias lácticas (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *L. acidophilus*) a partir de cultivos mixtos.

Agar con leche descremada

El medio de cultivo Leche descremada al 20 % coaguló al momento de esterilizarlo, lo cual no permitió la realización de las pruebas. En las pruebas en las que se utilizó el Agar leche descremada al 10 % se sembraron las bacterias puras, sin embargo, su morfología y diferenciación fue difícil, dado que el medio de cultivo es blanco, y las bacterias crecieron de ese mismo color, planas, opacas, además de que todas crecieron con la misma forma por lo que no fue posible diferenciarlas. Estos resultados muestran que no es posible diferenciar ni cuantificar ninguna de las bacterias analizadas, aunque Birollo *et al.* (2000) lo reporta como un excelente medio de diferenciación de colonias de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, también en cultivos comerciales, observando que las colonias del *S. thermophilus* son blancas, circulares y con bordes bien definidos, mientras que las del *L. bulgaricus*, fueron irregulares, planas y translúcidas.

MRS, MRS con sorbitol, y MRS con sorbitol y pH controlado

Los medios MRS y el MRS con sorbitol permitieron el crecimiento de todos los microorganismos y con morfología similar, lo que no favoreció su cuantificación por separado y lo único que se obtuvo con estos medios fue tener una cuenta total de las bacterias lácticas (Cuadro 1). Cuando el medio MRS con sorbitol al 5% se preparó controlando el pH final a un valor de 5.4, se observó crecimiento de *L. bulgaricus* y *L. acidophilus* y sus colonias fueron diferentes lo cual hace posible su diferenciación y cuantificación. Las colonias del *L. bulgaricus* crecieron con un tamaño de aproximadamente 1.0 mm de diámetro, planas, con bordes indefinidos, color blanco translúcido y opacas. Las colonias de *L. acidophilus* fueron convexas, de forma circular, puntiformes, y mas pequeñas que las anteriores (Cuadro 1). En este medio no se logró crecimiento de bacterias *S. thermophilus*, aunque Birollo *et al.* (2000), reporta que se pueden distinguir con alguna dificultad bajo condiciones anaeróbicas colonias de *S.*

Cuadro 1. Crecimiento bacteriano en diferentes medios de cultivo y descripción del tipo de colonias presentes.

Medio de cultivo	Especie bacteriana			Descripción de las colonias
	<i>S. t.</i>	<i>L. b.</i>	<i>L. a.</i>	
Leche descremada 20 %	-	-	-	Medio no apto para crecimiento
Leche descremada 10 %	+	+	+	Blancas, planas y opacas en todos los casos.
MRS	+	+	+	Blancas, brillantes, redondas en todos los casos
MRS + sorbitol	+	+	+	Blancas, brillantes, redondas en todos los casos
MRS + sorbitol + pH 5.4	-	+	+	<i>L. bulgaricus</i> : Planas, bordes indefinidos, blancas translúcidas y opacas <i>L. acidophilus</i> : Convexas, circulares, puntiformes
M17	+	-	-	Redondas, blancas, lisas y brillantes,

S.t. = *S. thermophilus*; *L.b.* = *L. bulgaricus*; *L.a.* = *L. acidophilus*

thermophilus y de *L. bulgaricus*. Un estudio sobre la calidad microbiológica de yogurts portugueses, cuantifica las bacterias del *L. bulgaricus* con este mismo medio y bajo las mismas condiciones (Nogueira *et al.*, 1998).

Por otra parte, en este mismo medio aunque con el pH ajustado a 4.58, en condiciones anaeróbicas y a 45 °C por 72 h se reportan colonias del mismo tamaño, blancas, irregulares y esponjosas para el *L. bulgaricus* y colonias opacas, pequeñas (0.1 a 0.5 mm) y parduscas para el *S. thermophilus* a 37 °C por 72 h (Tharmaraj y Shah, 2003).

M17

Este medio resultó excelente con un pH controlado a 7.2 y bajo condiciones anaeróbicas para la reproducción de *S. thermophilus*, siendo el único microorganismo capaz de crecer en este medio. Las colonias de *S. thermophilus* fueron redondas, blancas, lisas y brillantes, por lo que este medio se utilizó para diferenciar las bacterias cuando crecen puras o en cualquiera de las asociaciones. Los datos obtenidos (Cuadro 1) concuerdan con los reportados por Birollo *et al.* (2000), aunque en su caso, obtuvo colonias blancas opalescentes, circulares y con bordes bien definidos, mientras que Tharmaraj y Shah (2003), reportan colonias redondas y amarillentas en condiciones aeróbicas a 37 °C por 24 h. Otros estudios han demostrado la especificidad de este medio para la cuantificación y diferenciación del *S. thermophilus* (Shah, 2000).

Dave and Shah (1996), reportan que para la diferenciación del *S. thermophilus*, el Agar *Streptococcus thermophilus* muestra mejores resultados con presencia de colonias bien desarrolladas y amarillas y que el *L. bulgaricus*, o bien no crece, o forma colonias delgadas, blancas, y esponjosas.

Aunque estos resultados aclaran el papel de los medios de cultivo para la caracterización e identificación de las bacterias lácticas en leche fermentada, es preciso evaluar la viabilidad de estas bacterias en productos fermentados comerciales, con la finalidad de determinar si los productos fermentados cumplen con las normas internacionales sobre el número y viabilidad de colonias bacterianas.

Conclusiones

El desarrollo de productos lácteos conteniendo bacterias probióticas es un tema de consecuencias industriales y comerciales importantes para la industria alimentaria. La incorporación de estas bacterias a los productos hace difícil su identificación y cuantificación.

Cuando crecen en cultivos mixtos *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *L. acidophilus*, el M17 es el medio de cultivo indicado para cuantificar y diferenciar *S. thermophilus*

de los lactobacilos, presentando colonias redondas, blancas, lisas y brillantes. El medio MRS con sorbitol y pH de 5.4, permite diferenciar las colonias de *L. bulgaricus* y *L. acidophilus* puesto que *L. bulgaricus* crecen en colonias de aproximadamente 1.0 mm de diámetro, planas, con bordes indefinidos, de color blanco translúcido y opacas, mientras que las colonias de *L. acidophilus* son convexas, de forma circular, puntiformes y mas pequeñas que las anteriores.

Estos datos aportan evidencia sobre los tipos de medios recomendados para la cuantificación y caracterización de las bacterias *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *L. acidophilus*, utilizadas como cultivos mixtos en leches fermentadas.

Literatura Citada

- Birollo, G. A., J. A. Reinheimer y C. G. Vinderola. 2000. Viability of lactic acid microflora in different types of yogurt. *Food Res. Int.* 33: 799-805.
- Borchers, A. T., C. L. Keen y M. E. Gershwin. 2002. The influence of yogurt/*Lactobacillus* on the innate and acquired immune response. *Clin. Rev. Allerg. Immunol.* 22: 207-230.
- Cachon, R., S. Jeanson, M. Aldarf y C. Divies. 2002. Characterisation of lactic starters based on acidification and reduction activities. *Lait.* 82: 281-288.
- Chick, H., H. S. Shin y Z. Ustunol. 2001. Growth and acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria grown in skim milk containing honey. *J. Food Sci.* 66: 478-481.
- Corich, V., A. Mattiazzi, E. Soldati, A. Carraro y A. Giacomini. 2004. Relationship between chemical and microbiological composition of commercial plain yogurts. *Ital. J. Food Sci.* 16: 221-233.
- Courtin, P. y F. Rul. 2003. Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. *Lait.* 84: 125-134.
- Dave, R. I. y N. P. Shah. 1996. Evaluation of Media for Selective Enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacteria*. *J. Dairy Sci.* 79: 1529-1536.
- Dave, R. I. y N. P. Shah. 1998. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *J. Dairy Sci.* 81: 2804-2816.
- Davidson, R. H., S. E. Duncan, C. R. Hackney, W. N. Eigel y J. W. Boling. 2000. Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. *J. Dairy Sci.* 83: 666-673.

- Davis, J. G., T. R. Ashton y M. McCaskill. 1971. Enumeration and viability of *L. bulgaricus* and *St. thermophilus* in yogurts. *Dairy Ind.* 36: 569-573.
- DeNoni, I., L. Pellegrino y F. Masotti. 2004. Survey of selected chemical and microbiological characteristics of (plain or sweetened) natural yoghurts from the Italian market. *Lait.* 84: 421-433.
- Diario Oficial de la Federación. 1995. Norma Oficial Mexicana de Bienes y Servicios. Preparación y Dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. NOM-110-SSA1-1994.
- Djouzi, Z., C. Andrieux, M. Degovry, C. Bouley y O. Szylit. 1997. The association of yogurt starters with *Lactobacillus casei* DN 114.001 in fermented milk alters the composition and metabolism of intestinal microflora in germ-free rats and in human flora-associated rats. *Am. Soc. Nutr. Sci.* 2260-2266.
- International IDF Standard 117. 1983. Yogurt. Enumeration of Characteristic Microorganisms colony count technique at 37 °C. International Dairy Federation. 117.
- International IDF Standard 117A. 1988. Yogurt. Enumeration of Characteristic Microorganisms colony count technique at 37 °C. International Dairy Federation. 117A.
- Marshall, R. T. 1992. Standard Methods for the examination of Dairy Products. Washington, D. C., American Public Health Association.
- Nogueira, C., H. Albano, P. Gibbs y P. Teixeira. 1998. Microbiological quality of portuguese yogurts. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 21: 19-21.
- Radke-Mitchell, L. C. y W. E. Sandine. 1986. Influence of temperature on associative growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Dairy Sci.* 69: 2558-2568.
- Shah, N. P. 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *J. Dairy Sci.* 83: 894-907.
- Tharmaraj, N. y N. P. Shah. 2003. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacteria*. *J. Dairy Sci.* 86: 2288-2296.
- Vinderola, C. G., N. Bailo y J. A. Reinheimer. 2000. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Res. Int.* 33: 97-102.
- Vinderola, C. G., P. Mocchiutti y J. A. Reinheimer. 2002. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *J. Dairy Sci.* 85: 721-729.
- Vinderola, C. G., W. Rosello, D. Ghilberto y J. A. Reinheimer. 2000. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus Acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in argentinian fresco cheese. *J. Dairy Sci.* 83: 1905-1911.
-

Susceptibilidad *in vitro* de una Cepa de *Staphylococcus aureus* Resistente a Diferentes Extractos Vegetales

Concepción García Luján¹, Sara E. Alonso Rojo², Rafael Rodríguez Martínez³, Aurora Martínez Romero¹, Patricia Ramírez Baca¹, Alejandro Moreno Reséndez³

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango. Av. Artículo 123 s/n, Fraccionamiento Filadelfia, Gómez Palacio, Dgo., México. E-mail: conygarcialujan@hotmail.com. (*Autor responsable). ²Laboratorio de Microbiología de la Clínica de Especialidades No. 71, IMSS, Torreón, Coah., México. ³Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna. Periférico Raúl López Sánchez y Carretera a Santa Fe, 27054, Torreón, Coah., México.

Abstract

The emergence of resistant strains of *Staphylococcus aureus*, and its ability to cause diseases, is related to the widespread use of antibiotics and their potential to develop resistance and multiresistance. Therapeutic options for the treatment of infections caused by this pathogen tend to be limited, therefore the aim of this work was to evaluate the susceptibility of two strains of *S. Aureus*: a hospital one, and the other one for reference (ATCC 25923), to 10 vegetal extracts, and 2 essential oils. Alcoholic and hidroalcoholic extracts of parsley (*Petroselinum sativum*), ruda (*Ruta graveolens*), thyme (*Thymus vulgaris*), and gobernadora (*Larrea tridentata*) were evaluated, as well as the essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*), and oregano (*Lippia graveolens*), in order to assay the minimum inhibitory concentrations (CMI), by means of the macrodilution method. The results showed that there was no difference in the CMI (2,77 mgs mL⁻¹), in the vegetal extracts, alcoholic, as well as hidroalcoholic, for both strains, but the essential oils inhibited the bacterial growth to a CMI lower than those of the alcoholic, and hidroalcoholic, extracts of clove (1,38 mgs mL⁻¹) and oregano (0,17 mg mL⁻¹) for the hospital strain, and clove (0,34 mg mL⁻¹) and oregano (0,17 mg mL⁻¹) for the reference strain. The assayed compounds have a potential anti-bacterial application, and that is why it is suggested to assay their pharmaceutical properties in order to establish his usage as therapeutic agents.

Key words: Bacterial multiresistance, infectious diseases, new antimicrobials

Resumen

El surgimiento de cepas resistentes, y la capacidad de producir enfermedad por *Staphylococcus aureus* están relacionados con el amplio uso de antibióticos y su potencial para desarrollar resistencia y multirresistencia. Las opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones causadas por este patógeno tienden a ser limitadas, por lo tanto el objetivo de este trabajo fue evaluar la susceptibilidad de dos cepas de *S. Aureus*, una hospitalaria, y la otra de referencia (ATCC 25923), a 10 extractos vegetales y dos aceites esenciales. Se evaluaron extractos alcohólicos e hidroalcohólicos de: perejil (*Petroselinum sativum*), ruda (*Ruta graveolens*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y gobernadora (*Larrea tridentata*); y los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y orégano (*Lippia graveolens*), determinando las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) mediante el método de macrodilución. Los resultados mostraron que no existió diferencia en las CMI (2.77 mg mL⁻¹) en los extractos vegetales, tanto alcohólicos como hidroalcohólicos en las dos cepas, mientras que los aceites esenciales inhibieron el crecimiento bacteriano a CMI inferiores a las de los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos de clavo (1.38 mg mL⁻¹) y orégano (0.17 mg mL⁻¹) para la cepa hospitalaria, y clavo (0.34 mg mL⁻¹) y orégano (0.17 mg mL⁻¹) para la cepa de referencia. Los compuestos estudiados tienen una aplicación potencial como antibacterianos por lo que se sugiere medir sus propiedades farmacéuticas para establecer su uso como agentes terapéuticos.

Palabras clave: Multirresistencia bacteriana, enfermedad infecciosa, nuevos antimicrobianos

Introducción

Todos los seres vivos, incluyendo los patógenos bacterianos y sus hospederos, participan en una evolución constante, en una batalla de ataque, defensa y contraataque. Se plantea que los patógenos bacterianos a través de la evolución, han obtenido una importante ventaja sobre sus hospederos, ya que los mecanismos de defensa de éstos conducen a la generación de nuevas formas virulentas a través de cambios en el genoma bacteriano de los patógenos (Holden *et al.*, 2004; O'Connell, 2006). La evolución de las especies bacterianas resistentes se debe a una variedad de factores que incluyen la diseminación y el uso inadecuado de agentes antimicrobianos, el uso extensivo de estos agentes como promotores del crecimiento en la alimentación animal, y el incremento de los viajes regionales e internacionales, a través de los cuales se facilita que las bacterias resistentes a los antimicrobianos crucen las barreras geográficas (Lowy, 2003).

Se entiende por resistencia la capacidad de un organismo de tolerar la acción de agentes químicos, físicos y biológicos. Donde quiera que exista un cambio de susceptibilidad provocado por un agente inefectivo en contra de cierto organismo, este organismo será considerado como resistente. Muchos organismos carecen de susceptibilidad a un agente particular, y por lo tanto son intrínsecamente resistentes por su naturaleza fisiológica o bioquímica; los organismos susceptibles pueden volverse insensibles ante los antimicrobianos, esto puede deberse a mutaciones, o a la incorporación de información genética que codifica la resistencia (Kummerer, 2004), sin embargo la resistencia, a menudo, no se restringe a un solo agente o grupo antimicrobiano, sino que involucra a múltiples agentes pertenecientes a diferentes grupos de antimicrobianos, empleándose entonces el término de multirresistencia a drogas, resistencia múltiple, o multirresistencia. La idea, tan difundida, de que, en la carrera por la supremacía entre el hombre y los microorganismos, son éstos los que van siempre a la cabeza, y que la resistencia microbiana a los tratamientos actuales puede llevarnos a regresar a la era anterior a los antibióticos. Lo anterior subraya la seriedad de uno de los problemas de salud global de hoy: la lucha en contra de las enfermedades infecciosas causadas por gérmenes multirresistentes (Witte, 1999; Crisóstomo *et al.*, 2001; Critchley *et al.*, 2003; Schmidt, 2004). En la actualidad, el incremento de la resistencia de los patógenos limita el uso de los agentes antimicrobianos disponibles, lo cual ha favorecido la búsqueda de nuevos agentes, con nuevas formas de acción, que sean capaces de burlar los mecanismos de resistencia actuales (Critchley *et al.* 2003; Dartois *et al.*, 2005; Dryla *et al.*, 2005). Una opción -tan

antigua como la civilización misma- es el uso de productos naturales de origen mineral, vegetal y animal, con propiedades terapéuticas que, por mucho tiempo, fueron las principales fuentes de fármacos. Con la revolución industrial y el desarrollo de la química orgánica se provocó la preferencia de los productos sintéticos para el tratamiento farmacológico, ya que los compuestos puros se obtienen fácilmente, y las modificaciones estructurales para producir drogas potencialmente más activas y seguras favorece el incremento del poder económico de las compañías farmacéuticas. Sin embargo, el impacto en la terapia anti-infecciosa, con el descubrimiento de la penicilina (obtenida de microorganismos) resaltó la importancia de los productos naturales. Otro hecho que destaca esta importancia, es el de que cerca del 25 % de las drogas prescritas a nivel mundial provienen de las plantas, y que 121 de sus compuestos activos se convierten en drogas de uso común, además de que de las 252 drogas consideradas como básicas y esenciales por la OMS, el 11% son de origen vegetal, y que un gran número son drogas sintéticas que se obtienen de precursores naturales (Rates, 2001).

El surgimiento de la resistencia múltiple en las bacterias patógenas de humanos ha creado un grave problema clínico para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. De manera permanente, las compañías farmacéuticas están buscando drogas alternativas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas provocadas por patógenos resistentes. Las plantas medicinales se consideran una fuente potencial de drogas quimioterapéuticas debido a su contenido de fitoquímicos, y al poco o nulo efecto tóxico (Holden *et al.*, 2004), por lo que se ha sugerido que el uso de los agentes antimicrobianos naturales puede ser una alternativa efectiva, o suplementaria para el control de microorganismos patógenos (Knowles *et al.*, 2005).

La evaluación de la sensibilidad de las bacterias a los diferentes agentes antibacterianos se basa en el enfrentamiento *in vitro* de la bacteria a diferentes concentraciones del agente. La sensibilidad de una bacteria a un determinado antibiótico es determinada por la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual se define como la menor concentración del agente antimicrobiano, capaz de inhibir el desarrollo de una cepa bacteriana (Prescott, 2000) y es considerada como el estándar de oro para la determinación de la susceptibilidad de los organismos a los antimicrobianos y, por lo tanto, es usada para juzgar la interpretación de otros métodos para probar la susceptibilidad a los antibióticos (Andrews, 2001).

En ciertas bacterias, como el *S. aureus*, los procesos evolutivos que pueden limitar o aumentar su potencial de invasividad, en diferentes hospederos, están poco definidos, aunque por ejemplo, el tipo y las combinaciones de ciertos

genes de virulencia pueden contribuir de manera importante a su potencial patogénico (Van Leeuwen *et al.*, 2005).

Uno de los mecanismos para la inducción de la resistencia es la presión de selección a la que se someten las bacterias con el uso de antibióticos. A la fecha los extractos vegetales han sido poco utilizados como terapia antibacteriana, por lo cual se supone que las bacterias no han desarrollado mecanismos de resistencia en su contra (Haddadin *et al.*, 2002; Lowy 2003; Begun *et al.*, 2005), entonces, es posible que éstos puedan inhibir el crecimiento de cepas bacterianas resistentes, y multirresistentes. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue valorar la actividad antimicrobiana *in vitro* de ocho extractos vegetales y de dos aceites esenciales en contra de dos cepas de *S. aureus* (una hospitalaria y una cepa de referencia).

Materiales y Métodos

Colección y adquisición de plantas

Durante agosto de 2005, se colectaron plantas de gobernadora (*L. tridentata*) y de orégano (*L. graveolens*) en Gómez Palacio, Dgo., México (103° 40'00" LN y 25° 34'15" LO), y de ruda (*R. graveolens*), tomillo (*T. vulgaris*), y perejil (*P. sativum*) en huertos de Juárez, Dgo., México (103°35'42" LN 25°29'43" LO), cortando las dos terceras partes de la planta para asegurar su regeneración. El clavo (*S. aromaticum*), del cual se utilizan los botones florales, se compró en un mercado de la localidad. Todas las plantas fueron identificadas taxonómicamente en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN).

Preparación de extractos

Se prepararon los extractos alcohólicos, e hidroalcohólicos de gobernadora (*L. tridentata*), ruda (*R. graveolens*), tomillo (*T. vulgaris*) y perejil (*P. sativum*), y se extrajo el aceite esencial del orégano (*L. graveolens*) y del clavo (*S. aromaticum*), mediante arrastre de vapor en un aparato de destilación. Para la obtención de los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos (governadora, ruda, tomillo y perejil) las plantas se lavaron con agua para quitar impurezas; el material limpio se dividió en dos partes, la primera se secó al sol, y se molió en mortero, se adicionó solución de agua-alcohol (50-50;v:v) y se colocó en frasco ámbar para protegerlas de la luz del sol (extracto hidroalcohólico). La otra mitad se sometió a un proceso de maceración en fresco con una solución de etanol al 70% (extracto alcohólico) (Kuklinsky, 1993).

Para obtener los aceites esenciales de las especies de orégano y clavo, se sometieron éstos a una extracción por arrastre de vapor en un aparato de destilación, para obtener

sus aceites esenciales; el proceso de extracción se basa en la diferente volatilidad de los componentes de la droga vegetal, el cual permite la separación de los componentes volátiles de otros que son menos o nada volátiles (Kuklinsky, 1993).

Microorganismos y medios

Los materiales y el equipo empleados en el proceso se esterilizaron previamente en autoclave (FELISA, USA) y las pruebas de susceptibilidad se realizaron por triplicado en una campana de flujo laminar (Listed Man MTR CNTLR 572^a, U.S.A.). Para medir la susceptibilidad a los extractos vegetales, se utilizó una cepa hospitalaria de *S. aureus*, que se obtuvo de la Clínica N° 71 del IMSS en Torreón, Coah., México; cepa resistente a los siguientes antibióticos: Trimetropin con sulfametoxazol, Ampicilina, Levofloxacin, Cefuroxima, Meropenem, Carbenicilina, Amikacina, Piperacilina con tazobactam. La cepa de referencia ENCB *S. aureus* ATCC 25923, se obtuvo del Laboratorio de Bacteriología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Para estandarizar el tamaño del inóculo bacteriano, las colonias se inocularon en caldo infusión de cerebro corazón (CC) (OXOID, LTD) y se ajustó la turbidez con caldo de cultivo CC estéril hasta alcanzar un equivalente al estándar 0.5 en la escala de MacFarland, de aproximadamente 1.5×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) mL⁻¹ (Kalemba y Kunicka, 2003).

Método de macrodilución

Se preparó una solución madre con los extractos de gobernadora, de ruda, de tomillo, de perejil, de orégano, y de clavo, con una concentración al 5% (22.22 mg mL⁻¹) mezclando 5 mL del extracto más 95 mL de etanol. Se preparó una serie de 10 tubos con 2 mL de caldo CC, se añadieron 2 mL del extracto a evaluar (solución madre) al primer tubo y se mezcló; a partir de este tubo se prepararon diluciones seriadas. Las concentraciones (mg mL⁻¹) de los extractos fueron entonces de 22.22 en el primer tubo y de 11.11, 5.5, 2.77, 1.38, 0.69, 0.34, 0.17, 0.086 y de 0.043 mg mL⁻¹ en los tubos subsecuentes hasta el 10. A cada tubo con el extracto se le añadieron 0.5 mL del inóculo previamente preparado que contenía aproximadamente 1.5×10^8 UFC mL⁻¹. Se incluyó un testigo negativo con 2 mL del caldo CC adicionado con 2 mL del extracto. Todos los tubos se incubaron a 37 °C por 24 h, transcurrido este tiempo se determinó la concentración mínima inhibitoria en el tubo con la menor concentración de extracto donde se observó desarrollo bacteriano por medio de turbidez visible a simple vista. Las pruebas se realizaron por triplicado y se empleó un testigo (Andrews, 2001; NCCLS, 2005).

Resultados y Discusión

Para determinar la susceptibilidad de la cepa bacteriana, se midieron las CMI de los diferentes extractos vegetales evaluados (Cuadro 1), los resultados muestran que todos ellos tienen propiedades antibacterianas, y que las CMI de los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos son similares (2.77 mg mL^{-1}) para las dos cepas, sin importar el tipo de especie vegetal, lo que permite señalar que los componentes inhibitorios de los extractos vegetales no se modificaron con el tratamiento de extracción utilizado, ya que ensayos previos mostraron que el etanol no inhibe el crecimiento de la cepa.

En el caso de los aceites esenciales la CMI para la cepa hospitalaria de *S. aureus* fue de 1.38 mg mL^{-1} en el aceite esencial de clavo y de 0.17 mg mL^{-1} en el aceite esencial de orégano; para la cepa de referencia, las CMI fueron de 0.34 mg mL^{-1} en el clavo y de 0.17 mg mL^{-1} en el orégano (Cuadro 1).

Cuadro 1. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los extractos vegetales evaluados en dos cepas de *S. aureus*.

Especie vegetal	Tipo de extracto	CMI (mg mL^{-1})	
		CH	CR
Gobernadora	alcohólico	2.77	2.77
Ruda	alcohólico	2.77	2.77
Tomillo	alcohólico	2.77	2.77
Perejil	alcohólico	2.77	2.77
Gobernadora	hidroalcohólico	2.77	2.77
Ruda	hidroalcohólico	2.77	2.77
Tomillo	hidroalcohólico	2.77	2.77
Perejil	hidroalcohólico	2.77	2.77
Clavo ^{AE}	aceite esencial	1.38	0.34
Orégano ^{AE}	aceite esencial	0.17	0.17

CH = Cepa hospitalaria; CR = Cepa de referencia

Los extractos de diversas especies vegetales, son una alternativa para el tratamiento de enfermedades y, debido a la baja presión de selección, las bacterias no han desarrollado mecanismos de defensa en su contra, por lo que es de suponer que puedan inhibir el crecimiento de algunas cepas resistentes a los antibióticos de uso común. Los resultados obtenidos en este trabajo, apoyan la hipótesis de la capacidad antibacteriana de los extractos vegetales, inclusive ante una cepa resistente, ya que todos los extractos utilizados inhibieron el crecimiento de las cepas evaluadas. Los resultados de este experimento indican que tanto los extractos alcohólicos como los hidroalcohólicos

de gobernadora, ruda, tomillo y perejil, así como los aceites esenciales de clavo y orégano tienen actividad antibacteriana *in vitro* en contra de *S. aureus*, observándose que la CMI para todos los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos fue similar (2.77 mg mL^{-1}), mientras que en los aceites esenciales las CMI fueron menores a las de los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos y diferentes entre sí (clavo 1.38 , orégano 0.17 mg mL^{-1} para la cepa hospitalaria; y de 0.34 mg mL^{-1} en el clavo y de 0.17 mg mL^{-1} en el orégano para la cepa de referencia).

Los resultados concuerdan en todos los casos, con reportes previos (Cowan, 1999; Dorman y Deans, 2000; Burt, 2004), quienes registraron actividad bactericida en contra de diversos patógenos importantes en la gobernadora, en el clavo, y en el tomillo. Sin embargo, las CMI de 0 a 25 [%v/v] para los aceites esenciales de orégano, de tomillo y de clavo en contra de *S. aureus*, reportadas por Hammer (1999), difieren de las que se obtuvieron en este experimento. En relación a los extractos alcohólicos y acuosos de tomillo, Thuillé (2003), reportó una CMI de 2.5 mg mL^{-1} para el primero y mayor de 5.0 mg mL^{-1} para el segundo, en contra de *S. aureus*. Las discrepancias que se presentan en los resultados de los análisis de la susceptibilidad bacteriana a los extractos de especies evaluadas podrían ser consecuencia, en primer término, del mecanismo de acción de los agentes antimicrobianos que tiene que ver, con el tipo de microorganismo y de la constitución de la estructura de su pared celular y del arreglo de su membrana celular. En segundo lugar y con referencia a los extractos, los factores que influyen pueden ser la fuente botánica, la precedencia de la planta, la época de cosecha, la etapa de desarrollo, la técnica de extracción, el tratamiento de la planta (seca o fresca), y por último, también la metodología utilizada en las pruebas de susceptibilidad bacteriana (Vuorelaa *et al.*, 2004).

Los resultados mostraron la capacidad antibacteriana de los extractos vegetales evaluados, y la diferencia de acuerdo a tipo de extracto, ya que los aceites esenciales requirieron de una menor concentración para lograr la inhibición bacteriana que los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos. Las pruebas *in vitro* constituyen un buen aporte para el conocimiento de las propiedades de los extractos, sin embargo para continuar con la búsqueda de nuevos agentes antibacterianos hace falta probar la gran variedad de plantas disponibles que son fuente potencial de agentes bioactivos y evaluar, además, sus propiedades farmacéuticas, tales como su farmacodinamia, su farmacocinética, y su toxicidad entre otras.

Conclusiones

Las cepas de *Staphylococcus aureus* fueron susceptibles a todos los extractos de las especies vegetales evaluadas, aunque en diferentes concentraciones: los extractos alcohólicos (planta fresca) y los hidroalcohólicos (planta seca) no presentan diferencias en su acción bactericida resaltando así que los componentes bactericidas tienen el mismo peso molecular y su acción no se ve afectada por el método de extracción utilizado. En el caso de los aceites esenciales, el orégano mostró el mejor poder bactericida, le sigue el aceite esencial de clavo y por último los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos de la gobernadora, el perejil, la ruda y, finalmente, el tomillo. Los resultados muestran el potencial de bioactividad que tienen todos los extractos vegetales evaluados y, por lo tanto, la gran importancia de las plantas como fuente de nuevos agentes antibacterianos.

Agradecimientos

A la MC. María de Jesús Cedillo Gómez, Directora de la Fac. de Ciencias Químicas-UJED, a la QFB Bertha Rosas Campos, a la Dra. Virginia Nevárez Moorillón, por su apoyo incondicional para la realización de este trabajo.

Literatura Citada

- Andrews, J. M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* 48 Suppl 1: 5-16.
- Begun, J., Costi D. Sifri, S. Goldman, S. B. Calderwood, and F. M. Ausubel. 2005. *Staphylococcus aureus* virulence factors identified by using a high-throughput *Caenorhabditis elegans*-killing model. *Infect. Immun.* 73(2): 872-7.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94(3): 223-53.
- Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(4): 564-82.
- Crisóstomo, M.I., H. Westh, A. Tomasz, M. Chung, D. C. Oliveira, H. de Lencastre. 2001. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98(17): 9865-9870.
- Critchley, I. A., R. S. Blosser-Middleton, M. E. Jones, C. Thornsberry, D. F. Sahm, and J. A. Karlowsky. 2003. Baseline study to determine in vitro activities of Daptomycin against gram-positive pathogens isolated in the United States in 2000-2001. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47(5): 1689-93.
- Dartois, V., J. Sanchez-Quesada, E. Cabezas, E. Chi, C. Dubbelde, C. Dunn, J. Granja, § C. Gritzen, D. Weinberger, M. Reza Ghadiri, and T. R. Parr, Jr. 2005. Systemic antibacterial activity of novel synthetic cyclic peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(8): 3302-10.
- Dorman, H. J. and S. G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88(2): 308-16.
- Dryla, A., S. Prustomersky, D. Gelbmann, M. Hanner, E. Bettinger, B. Kocsis, T. Kustos, T. Henics, A. Meinke, and E. Nagy. 2005. Comparison of antibody repertoires against *Staphylococcus aureus* in healthy individuals and in acutely infected patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12(3): 387-98.
- Haddadin, A. S., S. A. Fappiano, P. A. Lipsett. 2002. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the intensive care unit. *Postgrad. Med. J.* 78(921): 385-92.
- Holden, M.T., Feil, E.J., Lindsay, J.A., Peacock, S.J., Day, N.P., Enright, M.C., Foster, T.J., Moore, C.E., Hurst, L., Atkin, R., Barron, A., Bason, N., Bentley, S.D., Chillingworth, C., Chillingworth, T., Churcher, C., Clark, L., Corton, C., Cronin, A., Doggett, J., Dowd, L., Feltwell, T., Hance, Z., Harris, B., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., James, K.D., Lennard, N., Line, A., Mayes, R., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Sanders, M., Sharp, S., Simmonds, M., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., Spratt, B.G., Parkhill, J. 2004. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101(26): 9786-91.
- Kalembe, D. and A. Kunicka. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10(10): 813-29.
- Knowles, J. R., S. Roller, D. B. Murray and A. S. Naidu. 2005. Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(2): 797-803.
- Kuklinsky, C. 1993. *Farmacognosia*. Barcelona España, Editorial Omega.
- Kummerer, K. 2004. Resistance in the environment. *J. Antimicrob. Chemother.* 54(2): 311-20.
- Lowy, F. D. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* 111(9): 1265-73.
- NCCLS. 2005. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement.

Clinical and Laboratory Standards Institute 25.

O'Connell, D. 2006. Bacterial evolution. Evolving virulence. *Nature reviews* 4: 83.

Prescott. 2000. *Microbiología. Cuarta Edición*, McGraw-Hill- Interamericana. Madrid, España. pp 493-495.

Rates, S. M. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon* 39(5): 603-13.

Schmidt, F. R. 2004. The challenge of multidrug resistance: actual strategies in the development of novel antibacterials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63(4): 335-43.

Thuillé, N. 2003. Bactericidal activity of herbal extracts. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 206: 1-5.

Van Leeuwen, W. B., D. C. Melles, A. Alaidan, M. Al-Ahdal, H. A. M. Boelens, S. V. Snijders, H. Wertheim, E. van Duijkeren, J. K. Peeters, P. J. van der Spek, R. Gorkink, G. Simons, H. A. Verbrugh, and A. van Belkum. 2005. Host- and tissue-specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 187(13): 4584-91.

Vuorelaa P., Leinonenb, M., Saikkuc, P., Tammela, P., Rauhad, J.P., Wennberge, T., Vuorela, H. 2004. Natural products in the process of finding new drug candidates. *Curr. Med. Chem.* 11(11): 1375-89.

Witte, W. 1999. Antibiotic resistance in gram-positive bacteria: epidemiological aspects. *J Antimicrob. Chemother.* 44 Suppl A: 1-9.

Actividad Biológica *in vitro* de Extractos de Plantas del Sureste de Coahuila, México, Contra *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae)

Carlos Orozco González^{1*}, Eugenio Guerrero Rodríguez¹, Jerónimo Landeros Flores¹, Miguel Ángel García Martínez¹, Rosalinda Mendoza Villarreal², Ricardo Hugo Lira Saldivar³

¹Departamento de Parasitología, ²Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro No. 1923, Colonia Buenavista, 25315, Saltillo, Coahuila, México. Tel. (844) 4 11 02 26. E-mail: corozco75@hotmail.com (*Autor responsable). ³Centro de Investigación en Química Aplicada. Blvd. Enrique Reyna No. 140. Saltillo, Coahuila, 25100, México.

Abstract

Control of insect pests of stored grains and seed, is made through the intensive use of synthetic pesticides; this has brought about resistance, accumulation of toxics in the atmosphere, and poisoning in human beings and animals. That is why the aim of this assay was to evaluate the biological effectiveness of 10 crude plant extracts from the South-eastern region of the Mexican state of Coahuila, and a conventional witness (*Azadirachta indica*) on *Sitophilus oryzae* L. A set of biotests was carried out with the techniques of: residual film in bottles; residual film on maize grains, and residual film on sacks. The extracts were sprinkled on the surface of the sacks that were stored up to 180 days under simulated warehouse conditions. A completely randomized experimental design, with three replications, was used. The extract of *A. indica* (neem) showed the higher insecticide effect with a mortality rate of 62 % in 48 h, using the residual film technique in glass bottles. A *Sitophilus* adult rejection effect was observed with *A. indica*, y *L. japonicum* in the residual film test in maize grains. The extracts of *A. indica* and *A. lechuguilla* in jute sacks showed more attraction to *S. oryzae*, and an effect of no preference or rejection with *Prosopis juliflora*, *Ligustrum japonicum*, and *Schinus molle*. When using raffia sacks *Argemone Mexicana* showed the highest effect of attraction while the extracts of *P. juliflora*, *A. indica*, *L. japonicum*, *Pinus cembroides* and *A. lechuguilla* showed a rejection effect.

Key words: raw extracts, botanic insecticide, rice weevil.

Resumen

El control de insectos de granos y semillas en almacén, se realiza con el uso intensivo de plaguicidas sintéticos, lo cual ha provocado resistencia, acumulación de tóxicos en el ambiente e intoxicaciones en humanos y animales, por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar la efectividad biológica, para ese efecto, de 10 extractos crudos de plantas del Sureste de Coahuila, México y un testigo convencional (*Azadirachta indica*) sobre *Sitophilus oryzae* L. Se realizaron bioensayos con las técnicas de: película residual en frascos; película residual en granos de maíz y película residual sobre sacos. Los extractos se asperjaron sobre la superficie de los sacos y se almacenaron hasta 180 días, simulando las condiciones de una bodega. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones. El extracto de *A. indica* (nim) mostró el mayor efecto insecticida con mortalidad de 62 % a las 48 h, al utilizar la técnica de película residual en frascos de vidrio. Se observó un efecto de rechazo de adultos de *Sitophilus oryzae* con *A. indica*, *Ligustrum japonicum* en el estudio con película residual de extractos en granos de maíz. Los extractos de *A. indica* y *Agave lechuguilla* en sacos de yute mostraron más atracción a *S. oryzae* y un efecto de no preferencia o rechazo con *Prosopis juliflora*, *Ligustrum japonicum* y *Schinus molle*. Al utilizar sacos de rafia *Argemone mexicana* mostró el mayor efecto de atracción mientras que los extractos de *P. juliflora*, *A. indica*, *L. japonicum*, *Pinus cembroides* y *A. lechuguilla* mostraron un efecto de rechazo.

Palabras clave: Extractos crudos, insecticidas botánicos, gorgojo del arroz.

Introducción

La conservación y protección de los granos en postcosecha constituye una necesidad alimenticia, social y económica, ya que la producción se ve amenazada por el ataque de insectos que causan la pérdida de la calidad del grano tanto para consumo humano como para semilla durante su almacenamiento (D'Antonio, 1997). El gorgojo del arroz (*Sitophilus oryzae* L.), es una plaga que ocasiona daños a los granos almacenados de trigo, arroz, cebada, sorgo, avena, maíz, pastas, etc. (Salas, 1984).

Para el control de estos insectos, se han utilizado plaguicidas sintéticos en forma intensiva, lo cual ha derivado en el surgimiento de resistencia, acumulación de tóxicos en el ambiente e intoxicaciones en humanos y animales (Silva *et al.*, 2003). Lo anterior ha obligado a la búsqueda de alternativas de combate. Algunos métodos alternativos para el control de plagas se caracterizan por ser de bajo costo, alta efectividad y factibles de realizar por pequeños agricultores (Braccini y Picanco, 1995).

El uso de plaguicidas naturales es cada vez más aceptado debido a la necesidad de emplear con compuestos eficaces que no provoquen daños al medio ambiente; así las plantas aromáticas son usadas empíricamente en intercultivo o en aplicaciones foliares para proteger los cultivos de los insectos plaga (Clemente, 2000). Existen antecedentes de algunas plantas con propiedades insecticidas contra coleópteros (Faroni *et al.*, 1995; Mazzone y Vendramin, 2003; Silva *et al.*, 2003 y Procopio *et al.*, 2003), los que señalan promisorias perspectivas del uso de extractos para la protección de granos en almacenamiento.

En algunos países de América Latina como Brasil, México, Ecuador y Chile, se han desarrollado líneas de

investigación que buscan, en las plantas, compuestos químicos con potencial para el control de plagas agrícolas y menor impacto ambiental (Rodríguez, 2000). Las plantas de las zonas desérticas de México tienen una gran importancia debido al uso industrial que podría hacerse de ellas, tales como, el aprovechamiento de sus fibras, su potencial alimenticio, o forrajero, y sus propiedades medicinales y toxicológicas (Villarreal, 1983).

Por tal motivo y considerando el potencial que existe en las plantas de zonas áridas, el objetivo de este estudio fue evaluar la efectividad biológica de 10 extractos crudos de plantas de distribución regional en el Sureste de Coahuila, México y un testigo convencional (*Azadirachta indica*) sobre *Sitophilus oryzae* L..

Materiales y Métodos

Plantas utilizadas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Entomología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), de abril a diciembre de 2004. Se colectaron hojas y frutos de once especies de plantas (Cuadro 1) en Saltillo, Buenavista, Parras y Arteaga, localidades del sur y sureste del estado de Coahuila, en el norte de México. Las colectas se hicieron durante los meses de abril a septiembre, colectando fruto para *Melia azedarach* y *Ligustrum japonicum*; para las otras plantas se colectaron hojas, tomando las dos terceras partes de la planta. Las hojas y los frutos se colocaron en bolsas de plástico que se guardaron en un contenedor térmico con hielo, para preservación durante su traslado al laboratorio y posterior obtención de extractos.

Cuadro 1. Nombre científico de plantas de distribución regional en el Sureste de Coahuila México, parte de la planta y solvente utilizado para la obtención de extractos crudos.

Nombre científico	Familia	NC	MV	Solvente
<i>Agave lechuguilla</i> Torr.	Agavaceae	Lechuguilla	Hoja	Etanol
<i>Argemone mexicana</i> L.	Papaveraceae	Chicalote	Hoja	Etanol
<i>Cynodon dactylon</i> (L) Pers.	Gramineae	Gramma	Hoja	Etanol
<i>Larrea tridentata</i> (Ex DC)	Zygophyllaceae	Gobernadora	Hoja	Metanol
<i>Ligustrum japonicum</i> Thunb.	Oleaceae	Trueno	Fruto	Hexano
<i>Lippia graveolens</i> HBK	Verbenaceae	Orégano	Hoja	Etanol
<i>Melia azedarach</i> L.	Meliaceae	Lila	Fruto	Metanol
<i>Nicotiana glauca</i> Grah.	Solanaceae	Tabaquillo	Hoja	Etanol
<i>Pinus cembroides</i> Zucc.	Pinaceae	Pino	Hoja	Etanol
<i>Prosopis juliflora</i> (Swartz) DC	Leguminoceae	Mezquite	Hoja	Etanol
<i>Schinus molle</i> L.	Anacardiaceae	Pirul	Hoja	Etanol

NC = Nombre común; MV = Material vegetal.

Obtención de extractos

Las hojas y los frutos se maceraron mecánicamente en recipientes de plástico de 18 L. Se utilizó 1 kg de material vegetal para *A. lechuguilla*, *M. azedarach* y *L. japonicum* con 2 L de solvente; y para las otras plantas se utilizó 1kg de material vegetal por 4 L de solvente. Previamente a la maceración, la mezcla se agitó constantemente durante 3 días para lograr una mejor separación de los componentes. El Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) proporcionó una muestra de aceite de *A. indica* que se utilizó como testigo convencional.

Los materiales obtenidos, se pasaron a través de papel filtro Whatman No. 1. El líquido filtrado de cada planta se colectó en un matraz bola de 1 L para separar el solvente de los sólidos presentes por medio de un rotavapor (Buchi Heating Bath B-490) (Kahan *et al.*, 2004). El matraz se mantuvo a una temperatura de 70-80 °C, para facilitar la evaporación y se retiró del rotavapor cuando el extracto presentó una concentración densa pero aun acuosa para evitar la solidificación del extracto. Posteriormente los extractos se colocaron en recipientes de plástico de 0.5 L de capacidad y se cubrieron con papel aluminio y se conservaron en refrigeración a una temperatura de 4 °C para evitar degradación de moléculas por efecto de luz y temperatura.

La concentración de los extractos se estimó por diferencia de peso de la concentración de cada extracto conservado en refrigeración; se tomó 1 g de muestra líquida, la cual se colocó en papel aluminio previamente pesado en una balanza analítica y se llevó a una estufa de secado a una temperatura de 30 °C por 6, 12 y 24 h, hasta peso constante.

Incremento y Conservación de la Colonia

La colonia de gorgojos de *S. oryzae*, se obtuvo de un pie de cría establecido en la UAAAN, la cual se mantuvo a una temperatura constante de 25 ± 2 °C, y una humedad relativa de 70 - 80 %. Los insectos se colocaron en recipientes de plástico de 5L, con 3 kg de maíz cacahuazintle con una humedad del grano de 12 %. Esta dieta se cambió cada 30 días, lapso en el cual el gorgojo completó su ciclo biológico. De cada recipiente se obtuvieron al menos 6,000 individuos para realizar los bioensayos.

Preparación de las Concentraciones

Se pesó la cantidad requerida de extracto, en base a la concentración de sólidos totales, posteriormente se agregó 1 mL de solvente. Posteriormente, el extracto se colocó en una estufa a una temperatura de 30 ± 2 °C por 30 min

para facilitar su manejo, a excepción de los extractos de *M. Azedarach*, *A. lechuguilla*. Enseguida se prepararon soluciones madre de los diferentes extractos agregando 1 mL de Tween 20 para las concentraciones de: 20,000; 10,000; 5,000; 1,000 y 500 $\mu\text{L L}^{-1}$, y un testigo con agua destilada. Las concentraciones de los diversos extractos crudos, se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Concentración de los extractos crudos de plantas de distribución regional en el Sureste de Coahuila, México y un testigo convencional (*Azadirachta indica*).

Planta	Concentración (%)
<i>Agave lechuguilla</i>	66.3
<i>Argemone mexicana</i>	66.7
<i>Azadirachta indica</i>	100.0
<i>Cynodon dactylon</i>	56.4
<i>Ligustrum japonicum</i>	98.9
<i>Lippia graveolens</i>	52.7
<i>Melia azedarach</i>	76.3
<i>Nicotiana glauca</i>	54.5
<i>Pinus cembroides</i>	56.4
<i>Prosopis juliflora</i>	58.8
<i>Schinus molle</i>	68.6

Bioensayos

Técnica de película residual en frascos. Para la realización de esta técnica se utilizaron frascos de vidrio de 100 mL, los cuales se lavaron con agua y detergente en polvo, y después se trataron con una solución de KOH al 5 %, por último, se enjuagaron con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente.

Para preparar los tratamientos, se vertió en los frascos 1 mL de cada extracto, procurando impregnar las paredes hasta la evaporación del solvente. Posteriormente se colocaron 15 gorgojos por repetición teniendo un total de 45 individuos por concentración. Los frascos se taparon con tela sujeta con una banda de caucho. Los recipientes se mantuvieron en laboratorio a una temperatura de 25 ± 2 °C. Se evaluó el efecto de los extractos a las 24 y 48 h, contando el número de insectos muertos por repetición.

Técnica de película residual en granos de maíz. Para observar efectos de repelencia-atracción se asperjaron los extractos sobre 20 g de granos de maíz cacahuazintle. Para tratar de formar una película residual, se utilizó una concentración de 20,000 $\mu\text{L L}^{-1}$ de cada extracto, por ser esta concentración, la que mostró un efecto de rechazo para algunos extractos en el estudio anterior, se incluyeron los extractos de las diez plantas, el testigo convencional *A. indica*, y un testigo absoluto. Los granos de maíz de los

doce tratamientos se colocaron equidistantemente en charolas de plástico de 40 x 60 x 15 cm; se utilizaron tres repeticiones cada charola se consideró como una repetición. Se colocaron 40 gorgojos en el centro y a los cuatro puntos cardinales de cada charola, para obtener un total de 200 adultos por charola. A las 24 h se contó el número de individuos encontrados en cada uno de los grupos de granos de maíz cacahuazintle tratados.

Técnica de película residual sobre sacos. Este bioensayo se realizó para corroborar el efecto de repelencia-atracción, para ello se utilizaron sacos de rafia y de yute de 12 X 18 cm. Los sacos se llenaron con 250 g de granos de maíz cacahuazinte y se cerraron herméticamente. Se utilizó la concentración de 20,000 $\mu\text{l L}^{-1}$, debido a que en el primer y segundo estudio presentó efecto de repelencia. Los extractos se asperjaron sobre la superficie de los sacos para formar una película residual; cuando los sacos se secaron, se colocaron en forma de estiba simulando de esta manera una bodega. Cada estiba se consideró como una repetición, estas se colocaron en una jaula de madera de 50X50X50 cm, cubierta con tela de organza y plástico, para evitar el escape de los insectos. Una vez estibados todos los sacos, se introdujeron 200 gorgojos en el centro y los cuatro puntos cardinales para un total de 1000 gorgojos por jaula. A los 10 días se evaluó el efecto de atracción-rechazo de los extractos sobre los adultos, contando el número de insectos encontrados dentro de cada costal.

Análisis de datos

Para la técnica de película residual en frascos de vidrio se utilizó el programa computarizado PC Probit. En las otras pruebas se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones, los datos se

transformaron previamente por la fórmula $\text{arc sen } \sqrt{x/100}$, para reducir el coeficiente de variación y lograr una mejor diferenciación de los tratamientos. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza con el software Statistical Analysis System (SAS) y, posteriormente, se realizó una comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($P=0.05$).

Resultados y Discusión

Película residual en frascos de vidrio

La mortalidad sobre adultos de *S. oryzae* obtenida a 48 h por efecto de los diferentes extractos se observa en el Cuadro 3; solamente el testigo convencional *A. indica* presentó la mortalidad más alta con un 61.36 % de los individuos a la dosis más alta (20,000 $\mu\text{l L}^{-1}$), lo cual coincide con los resultados obtenidos por Irbijaro (1983), Soto *et al.* (2000) y Procopio *et al.* (2003), quienes en sus estudios realizados con extractos de *A. indica* contra *S. oryzae* y *S. zeamais* reportaron una protección en granos de maíz, hasta por seis meses, con efectos insecticidas de 18 a 68 % de mortalidad. El extracto de *A. mexicana* presentó un 28.89 % de mortalidad a 20,000 $\mu\text{l L}^{-1}$; el extracto de *L. graveolens* manifestó un 17.78 % de mortalidad a 10 y 20,000 $\mu\text{l L}^{-1}$, por lo que solo se realizó análisis en PC Probit para el extracto de *A. Indica*, donde se aprecia que la CL_{50} fue de 15,272 $\mu\text{l L}^{-1}$ y sus límites fiduciales fueron de 13,353-18,161 aunque la CL_{95} estimada (58,504 $\mu\text{l L}^{-1}$) fue muy alta. Esto coincide con Silva *et al.* (2003), que trabajó con otras plantas pertenecientes a la misma familia con *S. zeamais* y reportan efectos del 1.8 al 65 % de mortalidad. Lo anterior muestra que ninguno de los extractos presentó propiedades insecticidas a las concentraciones evaluadas. Sin embargo, se observó que los insectos tendían a escapar del contacto de la película

Cuadro 3. Mortalidad de adultos de *Sitophilus oryzae* L. a 48 h por efecto de extractos crudos de plantas de distribución regional en el Sureste de Coahuila, México, evaluada con la técnica de película residual en frascos.

Extractos	Concentración ($\mu\text{l L}^{-1}$)					
	0	500	1,000	5,000	10,000	20,000
<i>Agave lechuguilla</i>	0.00	0.00	0.00	2.22	4.44	6.67
<i>Argemone mexicana</i>	0.00	0.00	2.22	2.22	13.33	28.89
<i>Azadirachta indica</i>	0.00	0.00	2.27	6.82	34.09	61.36
<i>Cynodon dactylon</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Ligustrum japonicum</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	2.22	2.22
<i>Lippia graveolens</i>	0.00	0.00	0.00	11.11	17.78	17.78
<i>Melia azedarach</i>	0.00	0.00	2.22	6.67	8.89	11.11
<i>Nicotiana glauca</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Pinus cembroides</i>	0.00	0.00	0.00	2.22	2.22	4.44
<i>Prosopis juliflora</i>	0.00	0.00	0.00	4.44	4.44	6.67
<i>Schinus molle</i>	0.00	0.00	0.00	2.22	6.67	6.67

residual de los extractos y a posarse en la parte superior del frasco donde se encontraba la tela. Esto fue más notorio con las concentraciones más altas, lo cual indica un posible efecto de repelencia, lo que condujo a realizar bioensayos posteriores.

Técnica de película residual en granos de maíz. No se observó diferencia estadística entre los tratamientos (Cuadro 4); sin embargo, se apreció que algunos extractos mostraron un mayor efecto de repelencia, con respecto al número de individuos presentes en los granos de maíz. El extracto de *A. indica* mostró el mayor efecto de repelencia con un promedio de 1.66 individuos por repetición lo cual coincide con lo reportado por Jacobson (1975), Rout (1986), Procopio *et al.* (2003) y Silva *et al.* (2003) quienes al trabajar con extractos de esta planta encontraron un efecto de rechazo o repelencia de hasta 60 días. Por otra parte el extracto de *L. japonicum* mostró un promedio de 3.66 individuos por repetición; Sin embargo, los extractos que mostraron un efecto de atracción fueron los de *S. molle*, *C. dactylon* y *N. glauca*, con un promedio de 19, 15, y 13.66 individuos por tratamiento respectivamente, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Procopio *et al.* (2003) y Silva *et al.* (2003), quienes trabajaron con *S. zeamais* y extractos de *Acacia dealbata* Link, reportando un efecto de atracción del 100 %.

Cuadro 4. Promedio de adultos de *Sitophilus oryzae* presentes en granos de maíz cacahuazintle, 24 h después de la aplicación de extractos vegetales de plantas del Sur de Coahuila, México, mediante la técnica de película residual a 20,000 µl L⁻¹.

Extractos	\bar{x} (a)
<i>Agave lechuguilla</i>	6.33 A *
<i>Argemone mexicana</i>	5.33 A
<i>Azadirachta indica</i>	1.66 A
<i>Cynodon dactylon</i>	15.00 A
<i>Ligustrum japonicum</i>	3.66 A
<i>Lippia graveolens</i>	11.66 A
<i>Melia azedarach</i>	4.66 A
<i>Nicotiana glauca</i>	13.66 A
<i>Pinus cembroides</i>	8.66 A
<i>Prosopis juliflora</i>	6.66 A
<i>Schinus molle</i>	19.00 A
Testigo absoluto	9.00 A

a= 200 gorgojos por repetición; * DMS al 0.05%

Técnica de película residual en sacos de yute y rafia. En este bioensayo se observó un efecto de repelencia-atracción de los diferentes extractos (Cuadro 5). A los 10 días de la aplicación; se observó un efecto diferencial

dependiendo del material del costal: se encontró que en sacos de yute el extracto de *A. indica*, y el de *A. lechuguilla*, presentaron mayor atracción de los individuos, con 53.67 y 47.64 adultos por repetición. Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Quadri (1973), Rout (1986), e Ivbijaro (1983), para el caso del *A. indica*, aunque estos autores utilizaron diferentes concentraciones que fluctuaron del 1 al 5 %. Por otro lado, un grupo de extractos se comportó igual que el testigo que presentó un efecto de rechazo. En este grupo se encontraron los extractos de *P. juliflora*, *L. japonicum* y *S. molle*, lo que coincide con lo obtenido por Steinbauer (1995) para extracto de *S. molle* sobre *Tribolium confusum* y Silva *et al.* (2003) que trabajaron con *S. zeamais*.

Para los tratamientos con sacos de rafia se encontró que el extracto de *A. mexicana* fue el que atrajo mayor número de individuos, mostrando un efecto de atracción de *S. oryzae* con 248.67 adultos por repetición, lo cual no concuerda con los resultados obtenidos por Jacobson (1975), quién reportó un efecto de repelencia con este extracto. Esto pudiera deberse a la diferencia de técnica utilizada. El análisis estadístico mostró que los demás extractos fueron diferentes, aunque se observó una diferencia en el número de individuos presentes por tratamiento. Se observó un efecto de rechazo con los extractos de *A. indica*, *P. juliflora*, *L. japonicum*, y *P. cembroides*, lo que coincide con los resultados obtenidos por Quadri (1973), Steinbauer (1995) y Procopio *et al.* (2003), quienes encontraron efectos de atracción del 45–100 % para algunos extractos y efectos de rechazo de un 66 % para otros.

Cuadro 5. Promedio de adultos de *Sitophilus oryzae* L. encontrados en sacos de yute y rafia a 10 días de ser tratados con extractos vegetales de plantas del Sureste de Coahuila, México a 20,000 µl L⁻¹.

Extractos	de individuos	
	Yute	Rafia
<i>Azadirachta indica</i>	53.67 A*	0.0 B
<i>Agave lechuguilla</i>	47.64 AB	3.0 B
<i>Melia azedarach</i>	17.33 ABC	17.33 B
<i>Argemone mexicana</i>	16.00 ABC	248.67 A
<i>Lippia graveolens</i>	14.00 ABC	10.67 B
<i>Cynodon dactylon</i>	12.33 ABC	16.00 B
<i>Pinus cembroides</i>	9.00 BC	0.67 B
<i>Nicotiana glauca</i>	8.00 BC	8.00 B
<i>Schinus molle</i>	5.33 C	9.33 B
<i>Ligustrum japonicum</i>	5.00 C	0.33 B
<i>Prosopis juliflora</i>	4.33 C	0.00 B
Testigo absoluto	4.33 C	13.00 B

* DMS al 0.05 %

Lo anterior muestra que los resultados de repelencia-atracción variaron fuertemente con el material de los sacos (yute o rafia) que se utilizaron al aplicar los extractos, afectando así el comportamiento de *S. oryzae*. El extracto de *L. japonicum* presentó un efecto constante de repelencia al igual que el extracto de *P. juliflora*.

Conclusiones

El extracto de *A. indica* mostró el mayor efecto insecticida con mortalidad de 62 % a las 48 h, al utilizar la técnica de película residual en frascos de vidrio. Se observó un efecto de rechazo de adultos de *Sitophilus oryzae* con *A. indica*, *Ligustrum japonicum* en el estudio con película residual de extractos en granos de maíz. Los extractos de *Azadirachta indica* y *Agave lechuguilla* en sacos de yute mostraron más atracción a *Sitophilus oryzae* y un efecto de no preferencia o rechazo con *Prosopis juliflora*, *Ligustrum japonicum* y *Schinus molle*. Al utilizar sacos de rafia *Argemone mexicana* mostró el mayor efecto de atracción mientras que los extractos de *Prosopis juliflora*, *Azadirachta indica*, *Ligustrum japonicum*, *Pinus cembroides* y *Agave lechuguilla* mostraron un efecto de rechazo.

Literatura Citada

- Braccini, A., Picanco M. 1995. Manejo integrado de plagas do feijoeiro no armazenamento. Rev. Bras. Armazenamento. 20: 37-43.
- Clemente, S. 2000. Evaluación de la acción biológica de extractos vegetales sobre plagas de importancia agrícola. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires Argentina. 73 p.
- D'Antonio, L. 1997. Principais pragas de graos armazenados. In: Congreso Brasileiro de energia agrícola. 26 p.
- Faroni, L., Molin L., Andrade E., Cardoso E. 1995. Utilizaçao de productos naturais no controle de *Acanthoscelides obtectus* em feijao armazenado. Rev. Bras. Armazenamiento. 20: 44-48.
- Ivbijaro, M. F. 1983. Preservation of cowpea, *Vigna unguiculata* (Linn) Walp. with neem (*Azadirachta induce* A. Juss) seed. Protection Ecol. 5 (2): 177-182.
- Jacobson, M. 1975. Insecticides from plants: A review of literature (1954-1971) USDA. Agric. Hand Book, Govt. Printing Office, Washington, D.C. 461 p. 1975.
- Kahan, A., Ricci, M., Padín, S. y Cerimele, E. 2004. Respuesta comparativa del efecto repelente de la esencia de *Laurus nobilis* L. sobre *Myzus persicae* Sulz. y *Cavariella aegopodii* Scop. (Hemiptera: Aphididae). Agro-Ciencia 20 (2): 113-117.
- Mazzonetto, F., Vendramim J. 2003. Efeito de pos de origen vegetal sobre *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Colleoptera. Bruchidae) em feijao armazenado. Neotrop. Entomol. 32: 145-149.
- Procopio, S., Vendramin J., Ribeiro, J. Santos, J. 2003. Bioactividad de diversos pos de origen vegetal em relacao a *Sitophilus zeamais* Most. Coleoptera: Curculionidae). Cien. Agrotec. 27: 1231-1236.
- Quadri, S. S. H. 1973. Some new indigenous plant repellents of storage pests. Pesticides 7 (12): 18.
- Rodríguez, H.C. 2000. Plantas contra plagas: potencial práctico de ajo, anona, nim, chile y tabaco. Texcoco, México: Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México (RAPAM). p 133.
- Rout, G. 1986. Comparative efficacy of neem seed powder and some common plant product mixtures against *Sitophilus oryzae* Linn. Neem Newsl. 3 (2): 13-14.
- Salas, J. 1984. Protección de semillas de maíz (*Zea mays*) contra el ataque de *Sitophilus oryzae* a través del uso de aceites vegetales. pp. 214.
- Silva, G., Lagunes A, Rodríguez J, Rodríguez D. 2003. Evaluación de polvos vegetales solos y en mezclas con carbonato de calcio para el control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky en maíz almacenado. Cien. Invest. Agraria. 30: 153-160.
- Soto, N. R., Juárez, B. F. y Jasso Y. P. 2000. Evaluación insecticida de *Parthenium incanum* y de *Zinnia* spp. en *Sitophilus zeamais*. Memorias de VI Simposio Nacional sobre Sustancias Vegetales y Minerales en el Control de Plagas. Acapulco, Guerrero, México. pp. 89-93.
- Steinbauer, M. J. 1995. Actividad insecticida y repelente de *Schinus molle* L. contra *Tribolium confusum* J. (Coleoptera:Tenebrionidae). Entomology General. 26:13-18.
- Villarreal, Q., J. A. 1983. Malezas de Buenavista, Ed. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coah., México. pp. 271.

Eficiencia de la Inexperiencia Sexual de los Machos Cabríos para Estimular la Actividad Estral en Cabras Anéstricas mediante el Efecto Macho

Mauricio Alexander Valera¹, Alejandra Ramos Castillo², José Alberto Delgadillo Sánchez¹

¹Centro de Investigación en Reproducción Caprina, Departamento de Ciencias Médico Veterinarias, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Periférico Raúl López Sánchez y Carretera a Santa Fe, C.P. 27054, Torreón, Coahuila, México. Teléfono: (871) 729-76 51; fax: (871) 729 76 76. E-mail: joaldesa@yahoo.com (*Autor responsable).

²Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Las Palces 1550, Montevideo, 11600, Uruguay.

Abstract

The aim of this study was to determine if sexually unexperienced male goats, exposed to an artificial long day condition, in order to stimulate its sexual behavior, may stimulates the estrous activity in anestrous female goats by sole male effect. Two male goats with sexual experience, and two other unexperienced ones were submitted to a 2.5 months long day period to stimulate their sexual activity during the non-breeding season. One group of multiparous females (n = 10) was exposed to sexually experienced males, and another group (n = 10) was exposed to unexperienced. The sexual behavior of males (ano-genital sniffing, nudging, mount attempts, mounts, self-urination and flehmen response) was recorded for 1.5 hours during the first 5 days of contact among them. Estrous behavior was detected twice a day during the whole study. The number of ano-genital sniffing was greater ($P < 0.001$) in males with sexual experience than in those without sit. The number of nudging, mount attempts, mounts, self-urination and flehmen response was not different ($P > 0.5$) between males with and without sexual experience. The number of females exposed to males with (10/10) or without (9/10) sexual experience that displayed an estrous behavior, did not differ ($P > 0.05$) between groups. These results show that sexually naive male goats, subjected to long day conditions, stimulate the estrous activity of anestrous female goats in the same the sexually experienced bucks do.

Key words: Caprine, Reproductive seasonality, Estrous behavior, Sexual experience

Resumen

Este estudio se realizó con la finalidad de determinar si los machos cabríos sin experiencia sexual, sometidos a días largos artificiales para estimular su comportamiento sexual, estimulan la actividad estral de las cabras multíparas en anestro estacional. Dos machos cabríos con experiencia, y otros dos sin experiencia sexual, se sometieron a 2.5 meses de días largos para estimular su comportamiento sexual en el periodo de reposo. Un grupo de hembras multíparas (n = 10) se expuso a los machos sin experiencia sexual, mientras que otro grupo (n = 10) se expuso a los machos con experiencia sexual. El comportamiento sexual (olfateos ano-genitales, aproximaciones, intentos de monta, montas, automarcajes y reflejo de Flehmen) de los machos se registró 1.5 horas durante los primeros 5 días de contacto con las hembras. El estro fue determinado 2 veces al día durante todo el estudio. Los machos con experiencia sexual realizaron más olfateos ano-genitales que los machos sin experiencia sexual ($P < 0.001$). El número de aproximaciones, intentos de monta, montas, automarcajes y reflejos de Flehmen no difirió ($P > 0.5$) entre los machos con, o sin, experiencia sexual. La respuesta estral entre las hembras expuestas a los machos con experiencia (10/10) o sin experiencia (9/10) sexual no fue diferente entre los grupos ($P < 0.05$). Estos resultados demuestran que los machos sin experiencia sexual, sometidos a días largos, estimulan la actividad estral de las hembras en anestro, de la misma forma que los machos con experiencia sexual.

Palabras clave: Caprinos, Estacionalidad reproductiva, Actividad estral, Experiencia sexual

Introducción

La actividad estral y ovulatoria de las hembras ovinas - y caprinas- en anestro estacional puede ser estimulada al ser expuestas a un macho. A este fenómeno se le conoce

como efecto macho (Walkden-Brown *et al.*, 1999; Delgadillo *et al.*, 2003). La experiencia sexual y la intensidad del comportamiento sexual de los machos pueden influir en la respuesta de las hembras al efecto

macho. Los machos que manifiestan un intenso comportamiento sexual son más eficientes para estimular la actividad sexual de las hembras que los machos con débil comportamiento sexual (Perkins y Fitzgerald, 1994; Flores *et al.*, 2000; Delgadillo *et al.*, 2002; Véliz *et al.*, 2006). Los machos sin experiencia sexual, es decir los que han sido privados, desde el destete, del contacto con las hembras, manifiestan un comportamiento sexual menos intenso que los machos criados de forma heterosexual en los primeros días de ser expuestos a las hembras (Katz *et al.*, 1988; Price *et al.*, 1991). Los machos sin experiencia sexual son menos eficientes para estimular la actividad sexual de las hembras que los machos con experiencia sexual (Ungerfeld *et al.*, 2007). Es probable que la baja intensidad del comportamiento sexual de los machos inexpertos sea la razón por la cual éstos son menos eficientes para estimular la actividad sexual de las hembras expuestas al efecto macho. El objetivo de esta investigación fue determinar si al estimular el comportamiento sexual de los machos sin experiencia sexual, al someterlos a 2.5 días largos durante el periodo de reposo sexual, son tan eficientes para estimular la actividad estral de las cabras anéstricas, como los machos adultos con experiencia sexual.

Materiales y Métodos

Machos

Se utilizaron 4 machos cabríos locales de la Comarca Lagunera de Coahuila (26° N). Un grupo se conformó con dos machos adultos de 3 años de edad con un peso corporal de 82 ± 3 kg, que previamente habían estado en contacto con hembras. Este fue el grupo de machos con experiencia sexual. Otro grupo se formó con dos animales jóvenes de 1 año de edad que tenían un peso corporal de 36 ± 2 kg y que desde los tres días de nacidos fueron separados de sus madres y nunca fueron expuestos a hembras antes del estudio. Este fue el grupo de machos sin experiencia sexual. Para estimular la actividad sexual de todos los machos durante el periodo de reposo, se sometieron a días largos artificiales (16 h luz/ 8 h de oscuridad al día) del 1 de noviembre de 2005 al 15 de enero de 2006 (Delgadillo *et al.*, 2002). Cada macho se alimentó con heno de alfalfa (18 %) a libre acceso y 300 g de concentrado comercial (14 % PC). El agua y las sales minerales se proporcionaron a libre acceso.

Hembras

Se utilizaron 20 cabras anéstricas multíparas de 2-4 años de edad. Todas las cabras parieron en octubre de 2005. El 16 de marzo de 2006, antes de exponerlas a los machos, las cabras se repartieron en dos grupos ($n = 10$ /

grupo) homogéneos de acuerdo a su condición corporal (1.8 ± 0.1 y 1.9 ± 0.1 , $P > 0.05$). Las hembras se alojaron en dos corrales de 4 x 4 m separados por una distancia de 100 m. Las hembras eran ordeñadas manualmente en la mañana y en la tarde, y su alimentación consistió en 1.5 kg de heno de alfalfa (18 % PC) y 200 g de grano de maíz (9.2 % PC). El agua y las sales minerales se proporcionaron a libre acceso. El 30 de marzo de 2006, un grupo de hembras fue expuesto a 2 machos con experiencia sexual, y el otro grupo a los machos sin experiencia sexual. Los machos permanecieron 15 días con las hembras.

Variables determinadas

El comportamiento sexual de todos los machos se observó de 7:30 a 9:00 h durante los primeros 5 días de ser expuestos a las hembras. Durante las observaciones se registraron los olfateos ano-genitales, las aproximaciones, los intentos de monta, las montas, los automarcajes y el flehemen, (González *et al.*, 1988; Véliz *et al.*, 2004). La actividad estral de todas las cabras se determinó a las 8:00 h y 18:00 h durante todo el estudio. Una hembra se consideró en estro cuando aceptaba ser montada por el macho (Chemineau *et al.*, 1992).

Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos del comportamiento sexual de los machos con experiencia, y sin experiencia sexual, se compararon mediante una prueba de χ^2 . La proporción de hembras que presentaron comportamiento estral se comparó mediante una prueba exacta de Fischer. Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante un paquete estadístico STSTAT 10.

Resultados y Discusión

Comportamiento sexual de los machos

En la Figura 1 se muestra el número de las conductas sexuales de los machos con, y sin experiencia sexual. El número de olfateos ano-genitales fue superior ($P < 0.001$) en los machos con experiencia sexual que en los machos sin experiencia sexual. Sin embargo, ninguna diferencia existió ($P > 0.05$) en el número de aproximaciones, intentos de monta, montas, automarcajes con orina y reflejo de Flehemen entre los machos con y sin experiencia sexual.

Respuesta de las hembras al efecto macho

Ninguna diferencia ($P > 0.05$) existió en la respuesta estral entre las hembras expuestas a los machos con o sin experiencia sexual durante los 15 días que duró el estudio (Cuadro 1). La proporción de hembras que presentaron al menos un estro durante los 15 días de contacto con los machos fue similar ($P > 0.05$) entre las hembras expuestas

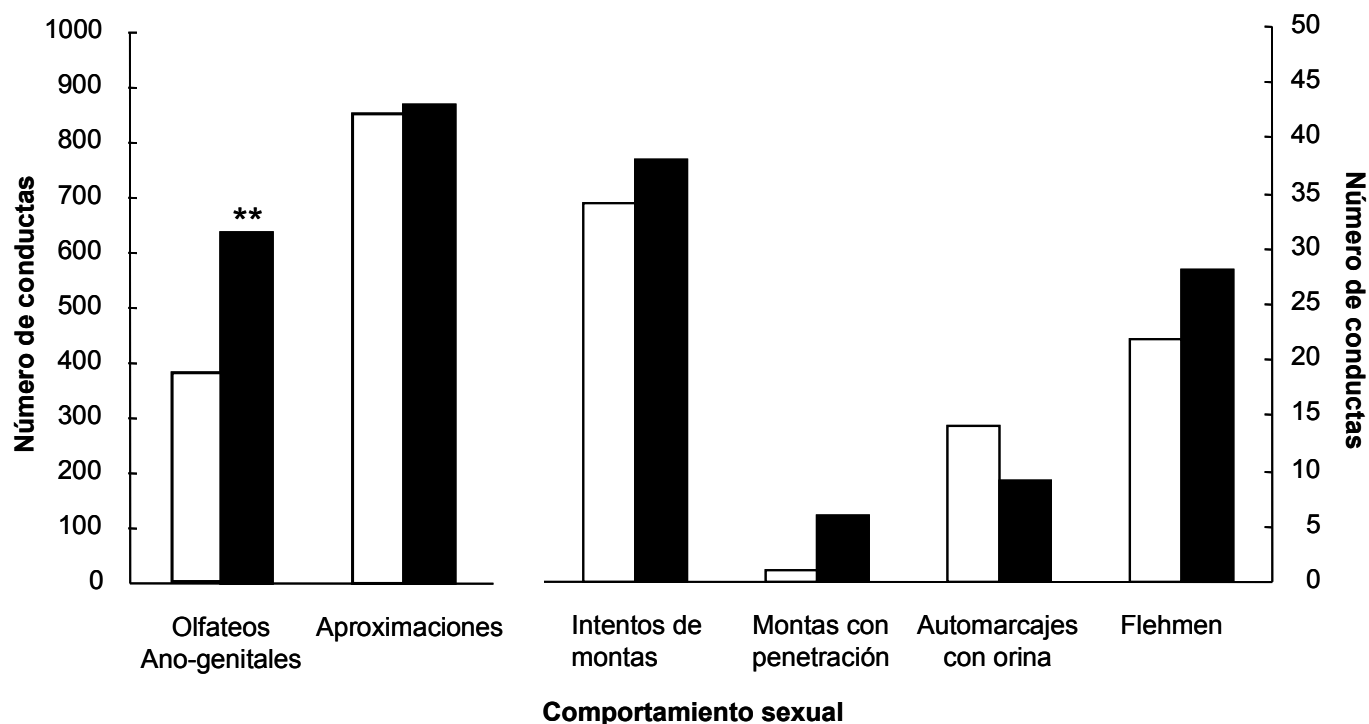


Figura 1. Comportamiento sexual de los machos con experiencia (■) y sin experiencia sexual (□), registrado en 1.5 h de observación durante los primeros 5 días después de la introducción de éstos en los 2 grupos de hembras múltiparas. Los machos fueron inducidos a un intenso comportamiento sexual al someterlos a días largos del 1 de noviembre de 2005 al 15 de enero de 2006. ** P<0.001.

a los machos con y sin experiencia sexual. Así mismo, las características de la actividad estral no difirió ($P>0.05$) entre grupos. La respuesta estral de las hembras expuestas a los machos con y sin experiencia sexual se muestra en el Cuadro 1.

Los resultados del presente estudio demuestran que los machos sin experiencia sexual, previamente inducidos a un intenso comportamiento sexual a través de días largos, son tan eficientes como los que tienen experiencia sexual para estimular la actividad estral de las cabras anéstricas. Las características de la respuesta estral de las hembras expuestas a machos con o sin experiencia sexual fueron similares a las reportadas previamente en hembras de esta

misma raza puestas en contacto con machos sexualmente activos con previa experiencia sexual (Delgadillo *et al.*, 2004; Rivas-Muñoz *et al.*, 2007). En cambio, en nuestros estudio, la proporción de hembras que respondieron al ser expuestas a los machos sin experiencia sexual fue superior a la reportada en ovejas (Ungerfeld *et al.*, 2007). En nuestro estudio, el comportamiento sexual desplegado por los machos, con o sin experiencia sexual, fue similar. El comportamiento sexual de los machos sin experiencia sexual, registrado en nuestro estudio, es superior al reportado por Price *et al.* (1991), y similar al reportado previamente en machos sometidos a 2.5 meses de días largos (Flores *et al.*, 2000; Delgadillo *et al.*, 2002). Es

Cuadro 1. Respuesta estral de un grupo de cabras hembras múltiparas de 2-4 años de edad expuestas, a machos cabríos con y sin experiencia sexual.

Comportamiento Estral	Machos	
	Sin Experiencia	Con Experiencia
Hembras que presentaron por lo menos un celo en 15 días (n)	9/10 ^a	10/10 ^a
Intervalo entre la introducción del macho y el primer estro (días)	3.1 ± 0.8 ^a	3.0 ± 0.6 ^a
Duración del primer celo (horas)	15.4 ± 3.4 ^a	18.7 ± 2.1 ^a
Duración del segundo celo (horas)	22.3 ± 3.1 ^a	20.0 ± 2.0 ^a
Hembras que presentaron ciclos cortos (n)	5/10 ^a	8/10 ^a
Duración de los ciclos cortos (días)	5.3 ± 0.1 ^a	5.3 ± 0.3 ^a

probable que el intenso comportamiento sexual de los machos sin experiencia haya sido el factor determinante para la alta respuesta de las hembras expuesta a ellos. En efecto, varios estudios han demostrado que el comportamiento sexual es un factor importante en la respuesta de las hembras sometidas al efecto macho (Walkden-Brown *et al.*, 1999; Delgadillo *et al.*, 2006).

Conclusión

Los datos de este estudio permiten concluir que los machos sin experiencia sexual, sometidos previamente a días largos, son capaces de estimular la actividad estral de cabras anéstricas, de la misma manera que los machos con experiencia sexual.

Agradecimientos

Agradecemos a los integrantes del CIRCA por su valiosa asistencia técnica durante el desarrollo del estudio; un agradecimiento especial a Francisco G. Véliz Deras y Horacio Hernández Hernández por su colaboración en los análisis estadísticos de este trabajo.

Literatura Citada

- Chemineau, P., Malpoux, B., Delgadillo, J.A., Guerin, Y., Ravault, J.P., Thimonier, J., Pelletier, J. 1992. Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *Anim. Reprod. Sci.* 30:157-184.
- Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Véliz, F.G., Hernandez, F.G., Duarte, G., Vielma, J., Poindron, P., Chemineau, P., Malpoux, B. 2002. Induction of sexual activity in lactating anovulatory female goats using male goats treated only with artificially long days. *J. Anim. Sci.* 80:2780-2786.
- Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Véliz, F.G., Duarte, G., Vielma, J., Poindron, P., Malpoux, B. 2003. Control de la reproducción de los caprinos del subtrópico mexicano utilizando tratamientos fotoperiódicos y efecto macho. *Vet. Méx.* 34:69-79.
- Delgadillo, J.A., Cortez, M.E., Duarte, G., Chemineau, P., Malpoux, B. 2004. Evidence that the photoperiod controls the annual changes in testosterone secretion, testicular and body weight in subtropical male goats. *Reprod. Nutr. Dev.* 44:183-193.
- Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Véliz, F.G., Duarte, G., Vielma, J., Hernandez, H., Fernández, I.G. 2006. Importance of the signals provided by the buck for the success of the male effect in goats. *Reprod. Nutr. Dev.* 46:391-400.
- Flores, J.A., Véliz, F.G., Pérez-Villanueva, J.A., Martínez de la Escalera, G., Chemineau, P., Poindron, P., Malpoux, B., Delgadillo, J.A. 2000. Male reproductive condition is the limiting factor of efficiency in the male effect during seasonal anestrus in female goats. *Biol. Reprod.* 62:1409-1414.
- González, R., Poindron, P., Signoret, J.P. 1988. Temporal variation in LH and testosterone responses of rams after the introduction of estrous females during the breeding season. *J. Reprod. Fertil.* 83:201-208.
- Katz, L. S., Price E. O., Wallach S. J. R., Zenchak J.J. 1988. Sexual performance of rams reared with or without females after weaning. *J. Anim. Sci.* 66:1166-1173.
- Perkins, A., Fitzgerald, J.A. 1994. The behavioral component of the ram effect : the influence of ram sexual behavior on the induction of estrus in anovulatory ewes. *J. Anim. Sci.* 72:51-55.
- Price, E.O., Estep, D.Q., Wallach, S.J.R. 1991. Sexual performance of rams as determined by maturation and sexual experience. *J. Anim. Sci.* 69:1047-1052.
- Rivas-Muñoz, R., Fitz-Rodríguez, G., Poindron, P., Malpoux, B., Delgadillo J.A. 2007. Stimulation of estrous behavior in grazing female goats by continuous or discontinuous exposure to males. *J. Anim. Sci.* 85:1257-1263.
- Ungerfeld, R., Ramos, M.A., González-Pensado, S.P. 2007. Ram effect: Adult rams induce a greater reproductive response in anestrus ewes than yearling rams. *Anim. Reprod. Sci.* 103(3-4):271-7.
- Véliz, F.G., Vélez, L.I., Flores, J.A., Duarte, G., Poindron, P., Malpoux, B., Delgadillo, J.A. 2004. La presencia del macho en un grupo de cabras anéstricas no impide su respuesta estral a la introducción de un nuevo macho. *Vet. Méx.* 35:169-178.
- Véliz, F.G., Poindron, P., Malpoux, B., Delgadillo, J.A. 2006. Maintaining contact with bucks does not induce refractoriness to the male effect in seasonally anestrus female goats. *Anim. Reprod. Sci.* 92:300-309.
- Walkden-Brown, S.W., Martin, G.B., Restall, B.J. 1999. Role of male-female interaction in regulating reproduction in sheep and goats. *J. Reprod. Fertil.* 52:243-257.

Colofón

Este ejemplar de la Revista Agraria –*Nueva Epoca*– se terminó de imprimir en formato digital (PDF) en la Dirección de Investigación de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, para su distribución en medios múltiples.

En Saltillo, Coah., México, el día 14. del mes de marzo
del año 2011



UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

www.uaaan.mx - (844) 411-02-00; Fax (844) 411-02-00, Ext. 2041

e-mail: investigacion@uaaan.mx