

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Control in vitro de *Fusarium oxysporum* Schlect f. sp. *Lycopersici* (Sacc.) Snyder
and Hans Mediante la Técnica de Biofumigación Utilizando Plantas Presentes en
el Norte Mexicano

Por:

JUAN ANTONIO ESPINOSA SOLÍS

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México.

Junio 2013.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Control in vitro de *Fusarium oxysporum* Schlect f. sp. *Lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hans Mediante la Técnica de Biofumigación Utilizando Plantas Presentes en el Norte Mexicano

Por:

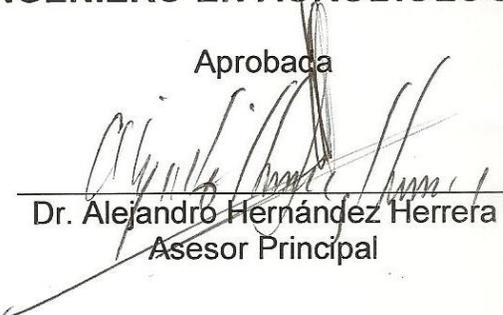
JUAN ANTONIO ESPINOSA SOLÍS

TESIS

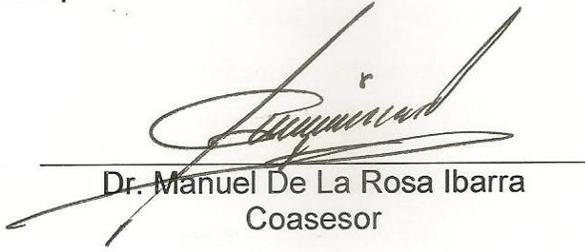
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

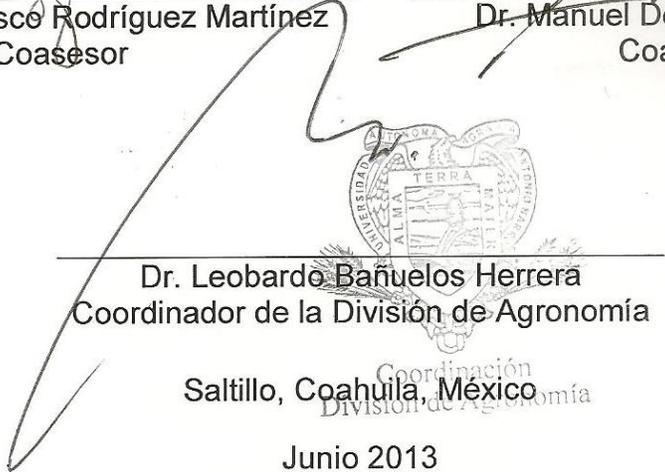
INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Aprobada


Dr. Alejandro Hernández Herrera
Asesor Principal


Dr. José Francisco Rodríguez Martínez
Coasesor


Dr. Manuel De La Rosa Ibarra
Coasesor


Dr. Leobardo Bañuelos Herrera
Coordinador de la División de Agronomía

Coordinación
División de Agronomía
Saltillo, Coahuila, México

Junio 2013

DEDICATORIA

A mí persona

Porque estoy consciente de que en mí esta toda la fuerza para seguir adelante y que yo soy el único que decide el hacer o no hacer las cosas y afortunadamente, las circunstancias y mi dedicación me han permitido alcanzar mis metas.

A mis padres

Sebastián Espinosa Aguilar y Juana Solís Moreno. Por el apoyo económico y moral que me han brindado a través de la vida y por la confianza depositada en mí, muchas gracias.

A mi familia

A la familia Espinosa y a la familia Solís, por ser parte esencial de mi formación, y por brindarme cobijo y una identidad. Dedicado también a mis abuelitos Carmelino y Esther (Q.E.P.D.) y a mis abuelitos Caralampio y Rebeca, por ser la fuente principal de la gran familia que han formado y de la cual soy parte.

AGRADECIMIENTOS.

Principalmente a la vida, y a las circunstancias que me han llevado a ser lo que soy ahora, por ayudarme a comprender que yo tengo el poder de decidir lo que quiero hacer y que nadie más excepto yo pueden evitar que salga adelante y que triunfe en la vida.

A mis padres, por ser los principales responsables de que yo este ahora en esta situación, por la confianza depositada en mi persona y por nunca darse por vencidos y apoyarme incondicionalmente.

A mi "ALMA MATER", estaré siempre agradecido por haberme brindado la oportunidad de formarme profesionalmente, ya que si no hubiera sido por la nobleza de la "Narro", no hubiera podido llevar a cabo mis metas personales y nunca hubiese conseguido tales logros, que ahora son parte de mi vida. Prometo que siempre, a donde quiera que ualle, pondré en alto el nombre de la UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

A mi novia Ana María Luna López, por el apoyo y compañía brindados desde que la conocí, por siempre estar alegre y contagiarme de entusiasmo, por ser parte fundamental de mi vida y porque gracias a ella ahora soy lo que soy. Nunca cambies chaparra.

Al Dr. Alejandro Hernández Herrera, por ser parte indispensable de mi formación profesional, por el apoyo incondicional brindado durante mi estancia en la UNAM, y por siempre encontrar en él un sustento, además de su orientación académica y moral. Indudablemente que le estaré por siempre agradecido. Gracias.

Al Dr. José Francisco Rodríguez Martínez, por ser parte fundamental de mi desarrollo profesional, por brindarme además de un apoyo como asesor una mano amiga, por sus atinadas recomendaciones y sus bromas espontáneas, y sobre todo por la confianza que se fortaleció entre nosotros.

Al Dr. Manuel de La Rosa Ibarra, porque además de ser mi tutor durante la estancia en la universidad, fue un gran amigo y un asesor muy importante, gracias por transmitir sin recelo alguno todos los conocimientos que posee.

Al MC. Oscar Eduardo Rosales Escobar, por adiestrarme en cuanto a la realización de prácticas de laboratorio para la realización de la tesis y por su amistad desinteresada.

A todos los compañeros y profesores con los que conviví, y por ser parte de mi vida y formación profesional.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| Titulo | Página. |
|---|---------|
| Dedicatoria.----- | III |
| Agradecimientos.----- | IV |
| Índice de Contenido.----- | VI |
| Índice de cuadros.----- | IX |
| Índice de Figuras.----- | X |
| Índice de gráficas.----- | XIII |
| Resumen.----- | XV |
| Palabras Clave.----- | XV |
| I. INTRODUCCIÓN._____ | 2 |
| Objetivo----- | 4 |
| Hipótesis----- | 4 |
| II.- REVISION DE LITERATURA._____ | 6 |
| II. 1.- Desinfección de suelos----- | 6 |
| II. 2.- Biodesinfección de suelos y materia orgánica | 8 |
| II.2.1. Biofumigación----- | 10 |
| II.3 Mecanismo de defensa de las plantas----- | 13 |
| II.3.1 Mecanismo de acción de las plantas Biofumigantes----- | 14 |
| II.3.2 Naturaleza química de los metabolitos antifúngicos----- | 16 |

| | |
|--|----|
| II.3.3 Efecto de las Regiones climáticas en las plantas productoras de metabolitos antifúngicos--- | 18 |
| II.3.4. Sitios de producción de metabolitos en la planta----- | 19 |
| II.3.5 Mecanismos de acción de los metabolitos antifúngicos----- | 20 |
| II.3.6. Glucosinolatos----- | 22 |
| II.4.- Taxonomía de <i>Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici</i> ---- | 24 |
| II.4.1. <i>Fusarium oxysporum</i> : Aspectos biológicos y patológicos.----- | 24 |
| II.4.2. Daños vasculares producidos por <i>Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici</i> .----- | 26 |
| II.4.3 Forma especial <i>Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici</i> ----- | 27 |
| III.-- MATERIALES Y METODOS. _____ | 29 |
| III.1.- Material vegetal----- | 29 |
| III.2.- Colecta de material biofumigante.----- | 38 |
| III.3.- Preparación del medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar).----- | 40 |
| III.4.- Siembra del hongo en el medio de cultivo.--- | 41 |
| III.5.- Preparación de material vegetal.----- | 43 |
| III.6.- Establecimiento del ensayo.----- | 44 |

| | |
|--|----|
| III.7.- Variables evaluadas.----- | 45 |
| III.7.1.- Crecimiento radial.----- | 45 |
| III.7.2.- Cinética de crecimiento.----- | 46 |
| III.7.3.- Velocidad de crecimiento (mm/día).--- | 47 |
| III.7.4.- Área de crecimiento (cm ²).----- | 47 |
| III.7.5.- Porcentaje de inhibición.----- | 47 |
| III.8.- Diseño experimental.----- | 48 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. _____ | 50 |
| IV.1.- Velocidad de crecimiento.----- | 51 |
| IV.2.- Área de crecimiento radial.----- | 54 |
| IV.3.- Porcentaje de inhibición del hongo.----- | 57 |
| IV.4.- Cinética de crecimiento.----- | 60 |
| V.- CONCLUSIONES. _____ | 65 |
| VI.- LITERATURA CITADA. _____ | 67 |

ÍNDICE DE CUADROS

| Título | Página |
|--|---------------|
| Cuadro 1. Clasificación científica <i>Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici</i> ----- | 24 |
| Cuadro 2. Análisis de Varianza y Comparación de Medias del efecto producido por la biofumigación sobre las colonias de <i>Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici</i> .----- | 50 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Titulo | Página |
|--|--------|
| Figura 1. Mecanismo de respuesta de una planta frente a un daño.----- | 14 |
| Figura 2. Mecanismos de liberación de aleloquímicos en plantas.----- | 15 |
| Figura 3. Esporas asexuales de <i>Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici</i> .----- | 27 |
| Figura 4.- Brócoli (<i>Brassica oleracea</i> Var. Itálica). Colectada en el área orgánica de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”.----- | 30 |
| Figura 5.- Calabacilla loca (<i>Cucurbita foetidissima</i>). Colectada en las parcelas de libre acceso del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”.----- | 31 |
| Figura 6.- Gobernadora (<i>Larrea tridentata</i>). Colectada en el Jardín Botánico de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”.----- | 32 |
| Figura 7. Olivo (<i>Olea Europea</i>). Colectado en los jardines de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”.----- | 33 |
| Figura 8.- Pino piñonero (<i>Pinus cembroides</i>). Colectado en el | |

| | |
|--|----|
| Jardín Botánico de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”..... | 34 |
| Figura 9.- Hojasen (<i>Flourenzia cernua</i>). Colectado en el Jardín Botánico de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”..... | 35 |
| Figura 10.- Pirul (<i>Schinus molle</i>). Colectado en el Jardín Botánico de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”..... | 36 |
| Figura 11.- Nogal (<i>Carya illinoensis</i>). Colectado en la huerta de nogales de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”..... | 37 |
| Figura 12.- Estiércol pulverizado de conejo. Colectado del criadero propio del Autor..... | 38 |
| Figura 13.- Material vegetal utilizado en esta investigación contenido en bolsas de papel..... | 40 |
| Figura 14.- Preparación del medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) en el laboratorio de Fitopatología de Postgrado del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”..... | 41 |
| Figura 15.- Siembra del hongo en el medio de cultivo en el laboratorio de Fitopatología de Postgrado del Departamento de Parasitología Agrícola de la | |

| | | |
|-------------|--|----|
| | Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”.--- | 42 |
| Figura 16.- | Preparación de material vegetal en el laboratorio de Fitopatología de Postgrado del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”.--- | 43 |
| Figura 17.- | Establecimiento del ensayo en una cámara de germinación presente en el laboratorio de Fisiología vegetal del departamento de Botánica de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”.----- | 45 |
| Figura 18.- | Medición del crecimiento radial de <i>Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici</i> con la ayuda de un Vernier.----- | 46 |
| Figura 19. | Crecimiento radial final del hongo <i>Fusarium oxysporum</i> bajo los siguientes tratamientos; 1.- Testigo, 2.- Estiércol, 3.- <i>Larrea tridentata</i> , 4.- <i>Flouencia cernua</i> , 5.- <i>Carya illinoensis</i> 6.- <i>Cucurbita foetidissima</i> , 7.- <i>Schinus molle</i> , 8.- <i>Pinus cembroides</i> , 9.- <i>Olea europea</i> , 10.- <i>Brassica oleracea</i> Var. <i>Itálica</i> .----- | 61 |

ÍNDICE DE GRAFICAS

| Titulo | Página |
|--|--------|
| Gráfica 1. Velocidad de crecimiento radial del hongo <i>Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici</i> , expuesto a distintos tratamientos de biofumigación <i>in vitro</i> . Tratamientos: 1.- <i>Brassica oleraceae Var. Italica</i> , 2.- <i>Pinus cembroides</i> , 3.- <i>Olea europea</i> , 4.- <i>Schinus molle</i> , 5.- <i>Cucurbita foetidissima</i> , 6.- <i>Carya illinoensis</i> , 7.- <i>Flourenzia cernua</i> , 8.- <i>Larrea tridentata</i> , 9.- Estiercol puro, 10.- Control.----- | 52 |
| Gráfica 2. Área de crecimiento radial del hongo <i>Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici</i> , expuesto a distintos tratamientos de biofumigación <i>in vitro</i> . Tratamientos: 1.- <i>Brassica oleraceae Var. Italica</i> , 2.- <i>Pinus cembroides</i> , 3.- <i>Olea europea</i> , 4.- <i>Schinus molle</i> , 5.- <i>Cucurbita foetidissima</i> , 6.- <i>Carya illinoensis</i> , 7.- <i>Flourenzia cernua</i> , 8.- <i>Larrea tridentata</i> , 9.- Estiercol puro, 10.- Control.----- | 56 |
| Gráfica 3. Porcentaje de inhibición del hongo <i>Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici</i> , expuesto a distintos tratamientos de biofumigación <i>in vitro</i> . Tratamientos: 1.- <i>Brassica oleraceae Var. Italica</i> , 2.- | |

Pinus cembroides, 3.- *Olea europea*, 4.- *Schinus molle*,
5.- *Cucurbita foetidissima*, 6.- *Carya illinoensis*, 7.-
Flourenxia cernua, 8.- *Larrea tridentata*, 9.- Estiercol
puro, 10.- Control.----- 58

Gráfica 4. Cinética de crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*, sometido a diferentes tratamientos de biofumigación *in vitro*.
Tratamientos: 1.-*Brassica oleraceae Var. Italica*, 2.-
Pinus cembroides, 3.- *Olea europea*, 4.- *Schinus molle*,
5.- *Cucurbita foetidissima*, 6.- *Carya illinoensis*, 7.-
Flourenxia cernua, 8.- *Larrea tridentata*, 9.- Estiércol
puro, 10.- Control.----- 62

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue controlar el desarrollo de *Fusarium oxysporum* Schlect f. sp. *Lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hans “*in vitro*” mediante su exposición a distintos gases generados en la biodescomposición de material vegetal, por lo que se estableció un ensayo “*in vitro*”, en el laboratorio de Fisiología Vegetal, del Departamento de Botánica, de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. El experimento se basó en la exposición del hongo patógeno a los gases liberados durante la descomposición de material vegetal de las siguientes especies: *Brassica oleraceae* Var. *Italica*, *Pinus cembroides*, *Olea europea*, *Schinus molle*, *Cucurbita foetidissima*, *Carya illinoensis*, *Flourenzia cernua*, y *Larrea tridentata*, a estas especies, se les adiciono estiércol de conejo para acelerar la descomposición. Se llevó a cabo un análisis completamente al azar con 10 tratamientos y 9 repeticiones para cada uno. Se midió el crecimiento radial, posteriormente se calculó la velocidad de crecimiento, el área de crecimiento, y el porcentaje de inhibición. Los resultados obtenidos demostraron que el mejor efecto fungicida lo presenta *Brassica oleraceae*, (97.72 % de inhibición) seguido de *Pinus cembroides* (96.8 %) y *Olea europea*. (96.35 %). Los resultados anteriores permiten concluir que el uso de la biofumigación como técnica de control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* es factible, ya que todos los tratamientos *in vitro* presentaron una alta capacidad inhibitoria.

Palabras clave: Biofumigación, *Fusarium oxysporum*, Biodesinfección.

“La primera gran virtud del hombre fue la duda y el primer gran defecto la fe”

Carl Sagan

I. INTRODUCCIÓN

Las pérdidas causadas en los cultivos por los patógenos del suelo, unidas a la prohibición del uso de soluciones químicas para su tratamiento han dado lugar a la búsqueda de alternativas no tóxicas y eficaces para minimizar este problema. Por lo que, las alternativas para la desinfección de suelos basadas en la incorporación de materia orgánica, se están volviendo cada vez más viables. Se ha encontrado que los gases resultantes de la biodescomposición de la materia orgánica pueden tener un efecto similar al Bromuro de Metilo en la regulación de los organismos patógenos (Hoitkink, 1988). Este proceso se ha denominado biofumigación y definido como “la acción de los gases resultantes de la biodescomposición de la materia orgánica en el control de los organismos patógenos de los vegetales” (Bello *et. al.*, 2008).

A través de múltiples ensayos y trabajos, se ha demostrado la acción de la biofumigación en el control de nematodos fitófagos, insectos, bacterias y malas hierbas, además de algunos virus, al controlar vectores de los mismos (Diénez *et. al.* 2002; Piedra-Buena 2004; López-Cepero *et al.* 2007; López-Cepero 2009; Zanón 2009; Díez-Rojo *et. al.*, 2010). Al mismo tiempo, esta técnica contribuye a mejorar la estructura y la biología del suelo, así

como la nutrición de las plantas, ya que se estimula el desarrollo de microorganismos benéficos.

En los últimos años son múltiples los trabajos dedicados al estudio del control de enfermedades transmitidas por el suelo con el manejo adecuado de restos de cultivos (Bailey y Lazarovits, 2003). Dentro de este esquema, Zhou y Everts (2004) reportaron la reducción en la incidencia de *F. oxysporum. f. sp. niveum* en sandía (54-69%) con restos de *Vicia villosa*; mientras Ramirez-Villapudua y Muneke (1988) observaron que la población de *F. oxysporum. f. sp. conglutinans* disminuyó un 20% con 8 t/ha de repollo cortado y seco.

Uno de los retos de la agroecología es el convertir y revalorizar los residuos que genera la actividad productiva (estiércol, restos de cosecha, residuos agroindustriales, etc.) en recursos que contribuyan a una mejora de los suelos, permitiendo una reducción del consumo energético en los agro-sistemas (Guzmán-Casado *et al.*, 1999). Estos residuos considerados como desperdicios sin ningún valor y que son catalogados como fuente de contaminación pueden usarse como materiales biofumigantes, una opción de menor costo e impacto ambiental. Además de que incrementa el valor de estos materiales, que ya no serían “desechos” sino “subproductos” del sistema capaces de aportar mejoras en la fertilidad del suelo y el control de patógenos (Piedra-Buena, 2004; Figueredo *et al.*, 2011)

OBJETIVO

Controlar el desarrollo de *Fusarium oxysporum* Schlect f. sp. *Lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hans “*in vitro*” mediante su exposición a distintos gases generados en la biodescomposición de material vegetal.

HIPOTESIS

Ho.- Al menos uno de los materiales vegetales aplicados, durante su proceso de degradación generará gases que inhiban significativamente el desarrollo de *Fusarium oxysporum* Schlect f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hans.

H₁.- Ninguno de los materiales aplicados, durante su proceso de degradación generará gases que inhiban significativamente el desarrollo de *Fusarium oxysporum* Schlect f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hans.

“Si no quieres perderte en el olvido tan pronto como estés muerto y corrompido, escribe cosas dignas de leerse, o haz cosas dignas de escribirse.”

Benjamin Franklin

II. REVISIÓN DE LITERATURA.

II. 1.- Desinfección de suelos.

Una de las formas de luchar contra las enfermedades es desinfectar los suelos de cultivo antes y después de la plantación (Ezziyyani, et. al., 2006). El control de organismos fitopatógenos habitantes del suelo es difícil de lograr, incluso tiene un costo elevado, ya que implica el desarrollo de nuevos pesticidas (Zavaleta-Mejía 1987). En México, la tecnología moderna de producción agrícola requiere de la utilización continua y a veces irracional de grandes volúmenes de insumos agrícolas como fertilizantes y plaguicidas, que además de incrementar los costos de producción en forma significativa, causa severos problemas de contaminación ambiental y de alimentos, con los consecuentes daños a la salud humana (López-Benítez, et. al. 2005).

La pérdida de la fertilidad natural del suelo como consecuencia de la utilización de químicos para la producción de alimentos está convirtiendo a los campos agrícolas en depósito de desechos tóxicos por la acumulación continua de agro-venenos.

Los fungicidas, nematicidas y fumigantes del suelo indudablemente causan una alteración drástica del equilibrio microbiológico, porque se aplican como agentes antimicrobianos y exhiben varios

grados de especificidad hacia patógenos de plantas residentes en el suelo. Su acción, sin embargo, rara vez se limita al patógeno.

El efecto completo es una esterilización parcial resultando en marcados cambios cualitativos y cuantitativos en la microflora del suelo, y pueden requerirse meses o años para restablecer el nuevo equilibrio. En el proceso pueden verse gravemente afectados microorganismos benéficos por largos períodos.

Así los investigadores y técnicos en agricultura se están enfrentando a uno de los mayores retos de los últimos años, el de encontrar alternativas al bromuro de metilo para controlar plagas, malas hierbas y enfermedades de las plantas. La alternativa que se proponga debe tener eficacia similar al BM, y además de no contaminar el ambiente, fundamentalmente debe ser económico y viable, características que no han sido hasta ahora exigidas a ningún otro pesticida (Ezziyani, *et. al.*, 2006)

La retirada de un producto químico del mercado puede conducir, a corto plazo, al reemplazo de éste por otro producto que no esté prohibido, lo cual puede resolver el problema temporalmente, pero a medio y largo plazo, las soluciones sostenibles no pueden basarse en productos químicos, sino que deben ser principalmente métodos físicos, biológicos o la integración de ambos. Esta situación que es real, se acompaña actualmente por las exigencias

medioambientales lideradas por la opinión pública sobre los productos químicos, que obligan a optar por estrategias más seguras y ecológicas que permitan mantener los patógenos y/o la enfermedad por debajo de un nivel aceptable. Por lo tanto, cualquier alternativa que permita el control de patógenos puede ser especialmente útil si al mismo tiempo ayuda a reducir agresiones que los productos químicos causan al medio ambiente (Ezziyani, *et. al.*, 2006).

La utilización de alternativas de control de enfermedades no contaminantes es de suma importancia para lograr una eficiente producción agrícola sin el deterioro ambiental, con productos agrícolas y alimentos más saludables, sin afectar la productividad y calidad de los mismos (López-Benítez, *et. al.* 2005).

En ese sentido, el uso de productos naturales, control biológico y control físico son algunas de las medidas en las que se está haciendo énfasis porque permite un control de la plaga con daños mínimos al ambiente.

II. 2.- BIODESINFECCION DE SUELOS Y MATERIA ORGÁNICA

La incorporación de materia orgánica en el suelo, incluyéndose estiércoles, compostas y abonos verdes, se ha venido utilizando

desde el inicio de la agricultura, principalmente para aportar nutrientes a las plantas, obteniéndose además efectos benéficos sobre los parámetros físicos, químicos y biológicos relacionados con el suelo (Hader *et al*, 1992). En la actualidad, se están utilizando compuestos de origen orgánico para manejar los patógenos de los vegetales de origen edáfico como bacterias, hongos, virus, nematodos, y también para la flora arvense (Bello *et al*, 2003; Diánez *et al*, 2003; López-Martínez *et al*, 2004; Santos *et al*, 2007; Zanón 2009)

Los métodos no químicos de desinfección del suelo, basados en la utilización de materia orgánica, se están volviendo cada vez más viables para los productores (MBTOC 2007). Además Bello *et. al.*, (2008), mencionan lo siguiente:

“la estrategia de futuro pasa por la ayuda a salvaguardar y mejorar la sostenibilidad económica y ambiental, mediante la conservación de los recursos naturales y productivos, como el agua y el suelo, reducir la utilización de agua, pesticidas y fertilizantes, mejorar el manejo de los componentes técnicos de invernaderos para reducir el uso de recursos, a través de la selección de plantas y cultivos, reducir el estrés de las plantas mediante cambios en los niveles de temperatura y humedad, uso de estiércol o subproductos para el control de

enfermedades como es el caso de la solarización y biofumigación, regular la diseminación de patógenos y potenciar los organismos antagonistas de patógenos. Ninguna estrategia es resolutive “per se”, siendo necesario un esfuerzo de integración” (Rodríguez, 2000).

II. 2.1.- Biofumigación.

Bello *et al.* (2003) definen la Biofumigación como “la acción de las sustancias volátiles producidas en la biodegradación de la materia orgánica en el manejo de los patógenos de las plantas, incrementándose su eficacia cuando se incluye en un sistema integrado de cultivos”. Estos autores resaltan la acción biofumigante de todo tipo de materia orgánica y residuos agroindustriales, recomendando aquellos que tengan una relación C/N entre 8-20.

La Biofumigación utiliza los gases y otros productos resultantes de la descomposición de las enmiendas orgánicas y residuos agroindustriales, como fumigantes para el manejo de organismos del suelo que son patógenos de vegetales, se contribuye con ello, además, a resolver problemas graves que estos productos pueden producir debido a su acumulación en el ambiente. En las publicaciones presentan resultados de su aplicación en cultivos de

cucurbitáceas, pimientos, tomate, zanahoria, otras hortalizas, fresón, platanera, cítricos, frutales, viñedos y flor cortada en diferentes ambientes de la región mediterránea, obteniendo una eficacia similar a los fumigantes convencionales, al mismo tiempo que incrementan los nematodos saprófagos, mejoran las características del suelo y la nutrición de la planta (Diez-Rojo 2010)

Se han estudiado diferentes biofumigantes, tanto en laboratorio como en campo, ya sean de origen animal, abonos verdes y residuos agroindustriales. Las dosis utilizadas en laboratorio han sido de 5, 10 y 20 g de biofumigante en 500 gramos de suelo infestado con una población elevada de hongos. La dosis de laboratorio corresponde a una aplicación en campo de 25, 50 y 100 t/ha, respectivamente. En algunos casos se ha añadido al biofumigante un 25% de un material rico en nitrógeno que actúe como activador, como es el caso de la gallinaza. Se han utilizado también diversas mezclas de diferentes materiales, para incrementar su eficacia biofumigante, principalmente la combinación de restos de gramíneas y leguminosas. (Bello, *et al* 2001)

Kirkegaard *et al.* (2008) estudiaron el potencial de la biofumigación, utilizando brassicas, para el control de *Ralstonia solanacearum* y de los nematodos formadores de nódulos del género *Meloidogyne* en

sistema de producción de cultivos bajo condiciones tropicales. Este estudio, con experimentos adicionales utilizando fuentes de carbono y de nitrógeno puros confirma que los compuestos nitrogenados de las enmiendas son los más activos en la supresión de patógenos, por lo que las fuentes de nitrógeno solas pueden reproducir los efectos supresores.

La biofumigación con restos de cultivo ha resultado eficaz para reducir las poblaciones de nematodos en condiciones controladas, siendo especialmente interesante la eficacia de los restos de tomate. (Regalado *et. al.* 2006).

Los restos de cultivos hortícolas deben integrarse dentro de una estrategia de manejo del agroecosistema, ya que con una tecnología adecuada, lejos de ser un residuo a eliminar, se convierten en un recurso que permite incrementar la fertilidad del suelo, aumentar su biodiversidad y ejercer un control eficaz sobre las poblaciones de nemátodos fitoparásitos.

La biofumigación es una ecotecnología de gran interés en el manejo integrado y ecológico de cultivos, que incrementa la calidad en la producción, eliminando efectos negativos sobre la salud y el ambiente, al mismo tiempo que permite el desarrollo de sistemas agrícolas con alta calidad social. (Bello *et. al.*, 2001).

Los costos de esta técnica pueden alcanzar valores muy bajos, especialmente con los estiércoles de origen animal, los abonos verdes o los restos de cosecha, puesto que realmente se trata de una enmienda orgánica, que es una práctica habitual en los sistemas de producción integrada y ecológica.

II.3.- MECANISMO DE DEFENSA DE LAS PLANTAS

Las propiedades antifúngicas de muchas especies de Brassicaceae son atribuidas principalmente a los compuestos aleloquímicos que presentan, los cuales al ser macerados, masticados o cortados dan lugar a una serie de compuestos nitrogenados denominados glucosinolatos, los cuales generan la formación de otros compuestos denominados isotiocianatos (Smolinska et. al., 2003).

(Figura 1)

De esta misma manera sucede con plantas de diferentes familias, las cuales al ser dañadas mecánicamente liberan una serie de gases nocivos para su agresor. Dichos gases son el producto del metabolismo secundario de estas y que normalmente son utilizadas como mecanismo de defensa.



Figura 1. Mecanismo de respuesta de una planta frente a un daño.
 Tomado de: González-Mañas (2013).

II.3.1.- Mecanismo de acción de las plantas Biofumigantes.

El ecosistema es un todo en el cual se generan innumerables reacciones químicas, físicas y biológicas. Es así como en las comunidades bióticas muchas especies se regulan unas a otras por medio de la producción y liberación de repelentes, atrayentes, estimulantes e inhibidores químicos. Generalmente esta regulación se lleva a cabo utilizando sus hormonas para evitar el ataque de las diferentes plagas y enfermedades a las que pueden ser susceptibles. (Sotero *et. al.*, 2010.)

El potencial de productos naturales que pueden ser usados por sus propiedades biológicas particulares como herbicidas, plaguicidas, fungicidas, antibióticos, inhibidores o estimulantes de crecimiento es prácticamente inagotable. Esta situación ha sido

observada durante siglos, lo que ha llevado a diversas personas en formular el término de alelopatía. Este concepto fue acuñado por el fisiólogo alemán Hans Molish, en el sentido de estudiar las relaciones entre plantas afines y las que se rechazan perturbando su desarrollo (Figura 2).

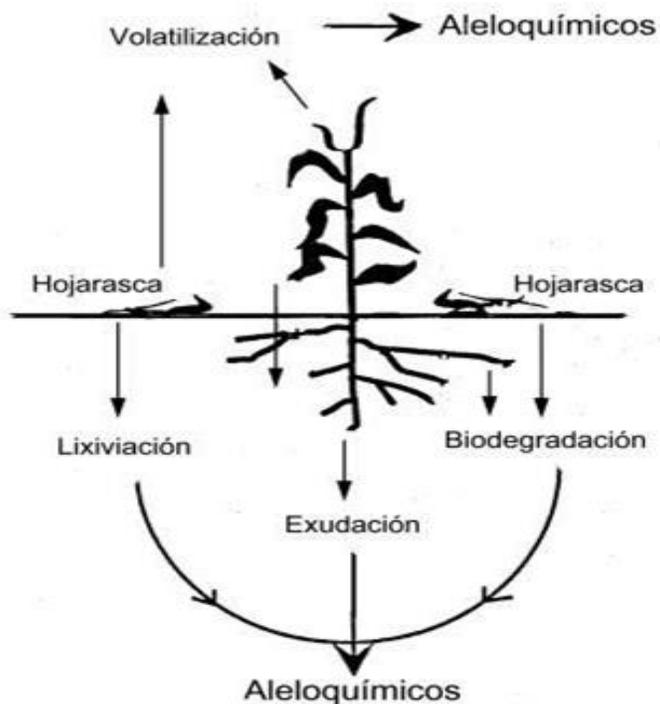


Figura 2. Mecanismos de liberación de aleloquímicos en plantas. Tomado de: Sampietro (2013).

En este proceso intervienen hormonas, llamadas "aleloquímicos alomónicos", del griego allelon que significa "el uno al otro", son compuestos moleculares que actúan como señales o como mensajeros de disuasión, produciendo efectos repulsivos, anti alimentarios, y tóxicos, además de ser alteradores de la fisiología y comportamiento sexual de insectos (Escobar, 1997).

Una planta sintetiza una o más sustancias tóxicas, con las que se auto protege de efectos externos nocivos, las almacena en vacuolas de reserva de agua o moléculas solubles provenientes de diferentes órganos. Ocasionalmente, las moléculas dentro de los tejidos, se mantienen inactivas pero al ingresar al medio ambiente sufren transformaciones moleculares, convirtiéndose en un aleloquímico agresivo (Weinert, 2005)

La estructura de agentes alelopáticos es muy compleja. Las investigaciones han establecido los siguientes grupos: compuestos alifáticos, Lactonas no saturadas, Lípidos y ácidos grasos, Terpenos, Glucósidos cianogénicos, compuestos aromáticos y Alcaloides (Weinert, 2005).

II.3.2.- Naturaleza química de los metabolitos antifúngicos.

De acuerdo a Grayer y Harborne (1994) los anti-fúngicos constitutivos pertenecen a todas las principales clases de compuestos secundarios: terpenoides, iridoides, sesquiterpenos, saponinas, compuestos azufrados o nitrogenados (alcaloides, aminas, amidas), alifáticos (especialmente alcanos de cadena larga y ácidos grasos) y aromáticos (fenoles, flavonoides, estilbenos, bibenziles, xantonas y benzoquinonas).

En el caso de los aceites esenciales cada planta puede tener hasta más de 60 componentes y de ellos puede haber varios con propiedades antifúngicas. No se conoce si la mayoría de las plantas han desarrollado metabolitos antifúngicos o si esta propiedad está restringida a determinadas especies y familias. Hasta 1988 Grainge y Ahmed reportaban alrededor de 400 plantas de 60 familias con esa propiedad contra cerca de 140 hongos y desde entonces la lista ha crecido considerablemente.

En Asia Central, se encontró que de 1730 plantas analizadas de 104 familias, el 79% contenían saponinas muchas de las cuales tienen propiedades antifúngicas. (Schlösser 1980)

En las Solanaceae y Amaryllidaceae los alcaloides son frecuentes y algunos están relacionados con la defensa contra los hongos. En las Rosaceae los fenoles son comunes y en las Asteraceae las lactonas sesquiterpénicas son muy características (Rai *et. al.*, 2003).

En las Poaceae la diversidad de compuestos antifúngicos es amplia: saponinas, alcaloides, ácidos grasos y fenoles entre otros. Igual pasa en las Leguminosas en donde hay chalconas, flavonas, difenilpropeno, isoflavonas y saponinas.

Los metabolitos secundarios generalmente están presentes como mezclas de compuestos y los parásitos y patógenos pueden ser afectados diferencialmente por los compuestos individuales o por

las mezclas en determinadas concentraciones y proporciones (Espinosa-García, 2001).

II.3.3.- Efecto de las Regiones climáticas en las plantas productoras de metabolitos antifúngicos

Las regiones climáticas pueden ser determinantes en las características cualitativas y cuantitativas de los metabolitos.

Levin y York (1978) sugieren que la concentración de alcaloides en el follaje de las plantas con alto contenido de estos compuestos puede ser mayor en regiones tropicales bajas que en regiones subtropicales y templadas.

En la selva africana se ha determinado que en los ecosistemas oligotróficos las plantas tienen una mayor cantidad de fenoles que en los sistemas eutróficos ricos en nutrientes.

Según Macias y Galindo (2001) los ecosistemas desérticos o semidesérticos son los sitios más adecuados para el desarrollo de especies vegetales aromáticas por sus altas temperaturas, bajos índices de pluviosidad y nieblas o rocíos intensos y esas plantas suelen ser árboles o arbustos con marcado aroma que se acentúa conforme las condiciones se vuelven más adversas y en general sus compuestos volátiles se encuentran en los tricomas del envés de las hojas, un sitio que facilita su liberación al aire.

II.3.4.- Sitios de producción de metabolitos en la planta

Un factor importante es el sitio de producción de los compuestos.

En algunos casos pueden producirse en toda la planta; en otras especies puede haber producción selectiva de metabolitos antifúngicos en cada órgano de la planta como ocurre con la canela (*Cinnamomum zeylanicum*) que en la corteza de su tallo produce altas concentraciones de aldehído cinámico y en sus hojas predomina el eugenol y en la corteza de sus raíces predomina el camfor (Senanayake *et. al.*, 1978); en el caso de la avena (*Avena sativa* L.) y el sorgo (*Sorghum vulgare* L.), la producción de avenacina (compuesto que actúa sobre el hongo *Gaeumannomyces graminis*) se concentra únicamente en las raíces, (Mansfield, 1983). En cuanto a los sitios dentro de la célula, los sesquiterpenos, triterpenos y esteroides se producen en el retículo endoplásmico, mientras que los monoterpenos se originan en los plástidos y las aminos y alcaloides en las mitocondrias (Sepúlveda-Jiménez *et. al.*, 2003).

Según Zangerl y Bazzaz (1992) las plantas durante su proceso evolutivo tienden a concentrar sus defensas en sus órganos reproductivos como ocurre con la mayoría de los terpenoides. La producción de metabolitos generalmente es cíclica y muchos de ellos se producen en mayor cantidad en la época de mayor actividad de los patógenos o parásitos como ocurre con el alcaloide

perlonina en la especie *Festuca arundinaceae* Schreb. (Macias y Galindo, 2001).

II.3.5.- Mecanismos de acción de los metabolitos antifúngicos

En cuanto los mecanismos de acción de los metabolitos todavía quedan muchas interrogantes. Se ha probado que los terpenos son los principales responsables de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. Su efecto antimicrobiano está basado en su habilidad para dañar las biomembranas. En función de sus características lipofílicas interactúan con las enzimas de la membrana e interfieren procesos vitales como la ósmosis, la síntesis de esteroides y fosfolípidos (Lucini *et. al.*, 2006).

Se conoce que el cineol reduce la división celular y que el limoneno, el α -pineno y el β -pineno inhiben el consumo de oxígeno (Peñuelas *et al.*, 1996); también se sabe que el 1-8 cineol inhibe la fosforilación oxidativa y la síntesis de ADN (Koitababashi *et. al.*, 1997).

Los isotiocianatos reaccionan con las proteínas de los hongos, ocasionando su inactivación mediante su unión al grupo amino del aminoácido lisina o con el grupo sulfihidrido de la cisteína (Tiznado-Hernández y Troncoso-Rojas 2006).

El principal mecanismo de actividad antifúngica de las saponinas es debido a su habilidad de formar complejos con los esteroides en las membranas de los hongos lo cual ocasiona la desintegración de la membrana (Glauert *et al.*, 1962; Morrissey y Osbourn, 1999).

Se ha demostrado que los compuestos fenólicos inhiben las enzimas reaccionando con los grupos sulfidrilos de los aminoácidos (Murphy, 1999). Las quinonas, flavonas, flavonoides, taninos y flavonoles forman complejos con los aminoácidos nucleofílicos de las proteínas lo que conduce a su inactivación (Murphy, 1999).

Muchos hongos fitopatógenos (a excepción de los biotróficos) secretan enzimas hidrolíticas que se difunden en las células del hospedero antes del avance de los microorganismos, lo cual puede ser inhibido por radicales libres de fenoles oxidados que funcionan como inhibidores no específicos, así como taninos, cianidina, delfinidina y malvidina (Schlösser, 1980).

La alicina del ajo actúa uniéndose a los grupos tiol de las proteínas (Slusarenko *et al.*, 2008). Las proteínas y los polipéptidos antifúngicos tienen mecanismos de acción muy variados, que incluyen la degradación de polímeros de la pared celular, de los canales de la membrana, la degradación de los ribosomas y la inhibición de la síntesis de ADN. Existen muchas proteínas cuyo modo de acción todavía no se conoce (Selitrennikoff, 2001).

II.3.6.- Glucosinolatos.

Aunque los glucosinolatos intactos pueden conferir resistencia a insectos herbívoros, hongos, bacterias, moluscos y microorganismos, las propiedades defensivas de éstos aumentan cuando los tejidos son fragmentados, por daño mecánico, infección o ataque de plagas, puesto que el rompimiento celular expone los glucosinolatos y los pone en contacto con la enzima mirosinasa (una β -tioglucosidasa) (Al-Gendy *et al.*, 2010; Botting, *et al.*, 2002; Li & Kushad, 2004).

Como resultado de la actividad de esta enzima se liberan glucosa, sulfato y varios compuestos tóxicos, entre los que están isotiocianatos, nitrilos, tiocianatos y oxazolidinas, dependiendo de la estructura de la cadena lateral del glucosinolato hidrolizado.

Dado que la enzima mirosinasa no solo es producida por las plantas, sino también por los insectos, los hongos y las bacterias, su actividad también se puede encontrar en el suelo (Gimsing, *et al.*, 2005), permitiendo el uso de plantas que contengan glucosinolatos como una fuente viable para el control de una amplia variedad de plagas y enfermedades de los cultivos, es decir, permite el uso de estos compuestos como biofumigantes

reduciendo de esta manera el uso de pesticidas y el potencial contaminante asociado (Brown & Morra, 1995).

Los glucosinolatos se adsorben débilmente en todos los tipos de suelo y se degradan microbiológicamente. Por lo tanto, los liberados de la planta son altamente móviles en el suelo y por ende tendrán elevada bio-disponibilidad. En contraste, los ITCs son fuertemente adsorbidos por la materia orgánica del suelo, reaccionando fuertemente con los grupos nucleofílicos presentes; sin embargo, son propensos a pérdidas por la volatilización, degradación microbiana y mineralización.

La biofumigación es, por lo tanto, una técnica promisoría que puede ser desarrollada e implementada en los programas de manejo integrado de plagas, contribuyendo a reducir el uso de plaguicidas sintéticos y minimizando el impacto ambiental (Gimsing & Kirkegaard, 2009).

II.4.-Taxonomía de *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*

Cuadro 1. Clasificación científica *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*

| | |
|------------------|--------------------|
| ▪ Reino | Fungi |
| ▪ División | Deuteromycota |
| ▪ Clase | Sordariomycetes |
| ▪ Orden | Hypocreales |
| ▪ Familia | Nectriaceae |
| ▪ Género | <i>Fusarium</i> |
| ▪ Especie | <i>Oxysporum</i> |
| ▪ Forma especial | <i>Lycopersici</i> |
| ▪ Autores | Snyder y Hansen |

Adaptado de: Smith y Smedley (2011).

II.4.1.- *Fusarium oxysporum*: Aspectos biológicos y patológicos.

Fusarium oxysporum es una de las especies de mayor importancia fitopatológica, ya que cuenta con mayor número de plantas hospederas y una de las especies que mayor daño económico ocasiona entre los patógenos de plantas. La especie tiene la capacidad de atacar un gran número de cultivos y ocasiona principalmente marchitamientos vasculares, seguidos de la muerte de la planta (Nelson, 1981). Algunas especies pueden ocasionar también pudrición de la corona y de las raíces de algunas plantas (Farr *et al.*, 1989; Jones *et al.*, 1997).

El hongo se caracteriza por producir colonias de crecimiento rápido y tres tipos de esporas: microconidias, macroconidias y clamidosporas. Las microconidias son esporas unicelulares, sin septas, hialinas, de elipsoidales a cilíndricas, rectas o curvadas. Las macroconidias, son esporas de pared delgada, fusiformes, largas, moderadamente curvadas, con varias células y de tres a cinco septas transversales, con la célula basal elongada. Las clamidosporas son esporas formadas a partir de la condensación de células de las hifas o de las macroconidias y se caracterizan por poseer paredes bastante gruesas, lo que las hace muy resistentes a condiciones ambientales desfavorables o a la ausencia de plantas hospedantes. Las clamidosporas se forman simples o en pares, son terminales o intercalares y son las principales responsables de la sobrevivencia del hongo en tejidos muertos de plantas hospedantes o en el suelo (Nelson, 1981).

Las formas especiales patogénicas de *Fusarium oxysporum* parecen haberse originado a partir de formas especiales no patogénicas o saprófitas en procesos evolutivos muy largos, principalmente en los centros de origen de las plantas hospederas (Nelson, 1990).

II.4.2.- Daños vasculares producidos por *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*.

Las enfermedades vasculares son un grupo de enfermedades que normalmente los patógenos que las causan son microorganismos que viven en el suelo, el daño que producen es a las raíces o a los tejidos conductores, de tal manera que interfieren de alguna forma en la translocación de agua, nutrimentos o sustancias elaboradas.

La enfermedad consiste en una típica marchitez, la que a nivel de campo se inicia como un amarillamiento ascendente del follaje; las hojas más viejas pueden mostrar amarillamiento en la mitad de los folíolos, y puede llegar a cubrirlos por completo, las hojas y ramas son invadidas, se deshidratan, se marchitan y mueren. Las plantas enfermas muestran pudrición de raíces, y típicamente los tejidos conductores se tornan de color café cuya necrosis interna se extiende a lo largo de los tallos hasta las ramas superiores. Bajo condiciones de campo los síntomas se inician en plena floración y se intensifican al generalizarse la producción de frutos. La enfermedad normalmente permite que haya producción, pero acorta el ciclo productivo de las plantas, la producción se reduce, y la calidad de la fruta es severamente afectada.

La enfermedad es favorecida por temperaturas entre 25 y 32°C y humedad alta del suelo. El patógeno produce principalmente 3

toxinas, el ácido fusárico, la licomarasmina, y la vasinfuscarina, las cuales son responsables del amarillamiento del follaje, necrosis vascular y muerte de la planta.

II.4.3.- Forma especial *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*

Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici, tiene 3 razas fisiológicas, morfológicamente idénticas y solo varían en su patogenicidad. El hongo es un Deuteromycete que produce 3 tipos de esporas asexuales; las microconidias, las macroconidias y las clamidosporas (Figura 3).

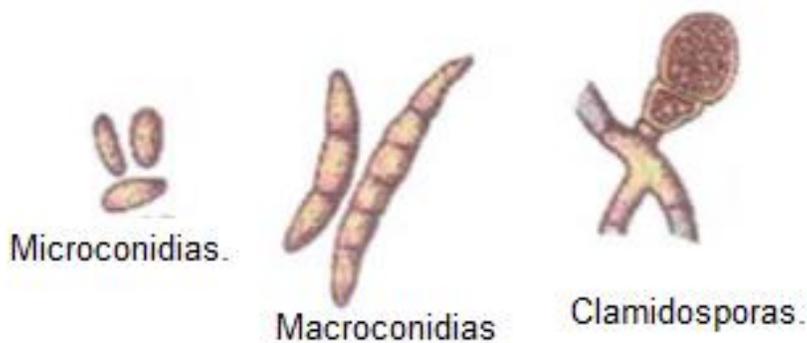


Figura 3. Esporas asexuales de *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*. Tomado de: Agrios, 2005.

Este hongo es habitante del suelo. Sus clamidosporas germinan y penetran a las raíces de la planta por heridas. El patógeno se puede diseminar en la semilla, en el suelo, adherido a implementos agrícolas, en partes de plantas infectadas y en el agua de riego.

“Vivimos en una sociedad profundamente dependiente de la ciencia y la tecnología y en la que nadie sabe nada de estos temas. Ello constituye una fórmula segura para el desastre.”

Carl Sagan

III. MATERIALES Y METODOS.

La presente investigación se llevó a cabo en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. El sitio se localiza a 25° 23´ latitud norte y 101° 01´ longitud oeste, con una altitud de 1,743 msnm.

Se realizó una evaluación “*in vitro*” de los efectos que tienen los gases liberados durante la descomposición de material vegetal, en el crecimiento del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* Schlect *f. sp. lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hans. Los materiales vegetales que se evaluaron fueron escogidos mediante una premisa de la agroecología “la utilización de los recursos locales”, esto para disminuir costos de transporte, además del conocimiento que se tiene de algunas plantas que contienen sustancias con posible actividad antifúngica, y que no tienen un uso definido, es decir, son consideradas especies silvestres e incluso malezas.

III.1.- Material vegetal.

- a) Brócoli [*Brassica oleracea* Var. *Itálica* (Fig. 4)]. Es una planta de la familia de las Brasicáceas, antes llamadas Crucíferas. Presenta Isotiocianatos, estos son empleados en el control de patógenos de las plantas. Presentan actividad frente a nemátodos, insectos del sustrato, hongos en general e incluso malezas. Los isotiocianatos reaccionan con las proteínas de

los hongos, ocasionando su inactivación mediante su unión al grupo amino del aminoácido lisina o con el grupo sulfhidrilo de la cisteína (Tiznado-Hernández y Troncoso-Rojas 2006). El material fue colectado en el área orgánica de la UAAAN, a cargo del Dr. Alejandro Hernández Herrera, perteneciente al Departamento de Ciencias del Suelo.



Figura 4.- Brócoli (*Brassica oleracea* Var. *Itálica*). Colectada en el área orgánica de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”.

b) Calabacilla loca [*Cucurbita foetidissima* Kunth (Fig. 5)]. Planta perteneciente a la familia de las Cucurbitáceas. Presenta una gran cantidad de saponinas, cuyo principal mecanismo de

actividad antifúngica es debido a su habilidad de formar complejos con los esteroides en las membranas de los hongos, lo cual ocasiona la desintegración de la membrana (Glauert *et al.*, 1962; Morrissey y Osbourn, 1999). El material fue colectado en el área de Horticultura de la UAAAN, donde se presenta como una maleza en las parcelas.



Figura 5.- Calabacilla loca (*Cucurbita foetidissima*). Colectada en las parcelas de libre acceso del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”.

- c) Gobernadora [*Larrea tridentata* (Fig. 6)]. Planta perteneciente a la familia Zygophyllaceae. Entre los principales compuestos encontrados en la resina de *L. tridentata* destacan los lignanos fenólicos, seguidos por las saponinas, flavonoides

(Sakakibara *et al.*, 1976), y principalmente ácido nordihidroguaiarético (NDGA), (Arteaga *et al.*, 2005). El efecto fúngico de la gobernadora ha sido corroborado con: *Rhizoctonia solani* Kühn, *Pythium* sp. Pringsh, *Rhizopus nigricans* Ehrenb, *Pythium aphanidermatum*, *Aspergillus flavus* Link, *Aspergillus parasiticus* Speare, *Pythium ultimum* Trow, *Tilletia indica* Mitra, *Fusarium oxysporum*, *Pytophthora infestans*, *Alternaria solani* Sorauer, *Fusarium oxysporum* f. sp. *licopersici*, *Verticillium dahliae* Kleb, *Botrytis cinérea*, *Colletotrichum coccodes* Wallr (Peñuelas *et al.*, 2011). Material colectado en el Jardín Botánico “Gustavo Aguirre Benavides” del Departamento de Botánica de la UAAAN.



Figura 6.- Gobernadora (*Larrea tridentata*). Colectada en el Jardín Botánico de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”.

d) Olivo [*Olea europea*. (Fig. 7)]. Planta perteneciente a la familia Oleaceae. Las hojas de olivo contienen sales minerales, flavonoides (rutósido y glucósidos de apigenina y luteolina), triterpenos (ácido oleanólico, ursólico y uvaol) y principalmente iridoides (secoiridoides: oleuropeósido, 11-demetiloleuropeósido, diéster metílico del oleósido, ligustrósido, oleurósido y aldehidos secoiridoídicos no heterosídicos) (Instituto Biológico, 2013.) En el extracto se han identificado además: escualeno, beta-caroteno, triglicéridos, ceras, alfa-tocoferol, betasitosterol y diferentes alcoholes. El material fue colectado en los Jardines de la UAAAN.



Figura 7. Olivo (*Olea Europea*). Colectado en los jardines de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”.

e) *Pino* [*Pinus cembroides* Zuck (Fig. 8)]. Planta perteneciente a la familia Pinaceae, en las hojas presenta Ácido ascórbico, terpenos, carotenos, glúcidos, escoparol, etc. El efecto antimicrobiano de los terpenos está basado en su habilidad para dañar las biomembranas. En función de sus características lipofílicas interactúan con las enzimas de la membrana e interfieren procesos vitales como la ósmosis, la síntesis de esteroides y fosfolípidos (Lucini et al., 2006). Material colectado en el Jardín Botánico “Gustavo Aguirre Benavides” del Departamento de Botánica de la UAAAN.



Figura 8.- Pino piñonero (*Pinus cembroides*). Colectado en el Jardín Botánico de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”.

f) Hojasen [*Flourenzia cernua* (Fig. 9)]: Planta perteneciente a la familia de las compuestas (Asteraceae). Presenta ácidos clorogénico, p-coumaroil-quinico, methyl clorogénico, glucósidos de rutina y luteolina, empleados para el control de bacterias y hongos fitopatógenos. (Tellez *et. al.*, 1997). El material fue colectado en el Jardín Botánico “Gustavo Aguirre Benavides” del Departamento de Botánica de la UAAAN.



Figura 9.- Hojasen (*Flourenzia cernua*). Colectado en el Jardín Botánico de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”.

g) Pirul [*Schinus molle* (Fig. 10)]. Planta perteneciente a la familia de las Anacardiáceas. Produce felandreno, alcohol terpenoide carbacol, los cuales se eliminan a través de las hojas y

frutos. El aceite esencial de las hojas frescas posee actividad antibacteriana, antiviral, antifúngica y antimicrobiana. Las siguientes bacterias y hongos exhiben una sensibilidad significativa al aceite. El análisis fotoquímico revela que la planta contiene taninos, alcaloides, flavonoides, saponinas, esteroides, esterol, terpenos, gomas, resinas y aceites esenciales (fuente rica de triterpenos, sesquiterpenos y monoterpenos) (Josuah 2009).

El material fue colectado en el Jardín Botánico “Gustavo Aguirre Benavides” del Departamento de Botánica de la UAAAN.



Figura 10.- Pirul (*Schinus molle*). Colectado en el Jardín Botánico de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”.

h) Nogal [*Carya illinoensis* (Fig. 11)]. Planta perteneciente a la familia Juglandaceae. Presenta taninos, juglonas, flavonoides, ácido ascórbico y aceite esencial. Se ha demostrado que los compuestos fenólicos inhiben las enzimas reaccionando con los grupos sulfidrilos de los aminoácidos (Murphy, 1999). Las quinonas, flavonas, flavonoides, taninos y flavonoles forman complejos con los aminoácidos nucleofílicos de las proteínas lo que conduce a su inactivación (Murphy, 1999). Material colectado en el huerto Nogalero de la UAAAN.



Figura 11.- Nogal (*Carya illinoensis*). Colectado en la huerta de nogales de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”.

Al material colectado y utilizado de estas especies vegetales se les agregó estiércol de conejo (Figura 12) como fuente de Nitrogeno y también como acelerador de la descomposición debido a que presenta una flora microbiana densa. Esta microflora se caracteriza por estar representada por bacterias β -pectinolíticas, β -celulolíticas, β -xilanolíticas, β -proteolítica y β -aminolítica. (Dihigo *et. al.*, 2001)



Figura 12.- Estiércol pulverizado de conejo. Colectado del criadero propio del Autor.

III.2.- Colecta de material Biofumigante.

La localización del sitio de trabajo también influyó de manera positiva en el contenido de sustancias alelopáticas de las

plantas, ya que el clima de la región es Según la clasificación climática de Köppen-Geiger, seco desértico, con régimen de lluvias en el verano, e inviernos frescos. El promedio de precipitación pluvial es de 258 mm anuales. La temperatura media anual es de 21°C, con rangos de 33.7°C como máxima y 7.5°C como mínima. La evaporación media total es de aproximadamente 2,000 mm anuales, lo que hace una relación precipitación- evaporación 1:10. Todas estas condiciones hacen que las plantas que crecen en esta zona tengan concentraciones mayores de sustancias con características aleloquímicas debido al alto nivel de estrés en el que se desarrollan. *(Ver apartado II. 3. Ecología de Las plantas productoras de metabolitos antifúngicos en el capítulo de Revisión de Literatura.)*

La colecta de material se llevó a cabo bajo el siguiente esquema:

- Las muestras de plantas a utilizar se colocaron en bolsas de papel (Figura 13) para evitar la acumulación de humedad en su interior y evitar el crecimiento de microorganismos saprofitos.



Figura 13.- Material vegetal utilizado en esta investigación contenido en bolsas de papel

III.3.- Preparación del medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar)

El protocolo de preparación del medio nutritivo se ilustra en la Figura 14, el cual consta de los siguientes pasos.

1. Se pesaron 16 gramos de Agar bacteriológico
2. Se pesaron 5 gramos de extracto de levadura
3. Se colocaron en un frasco Erlenmeyer de un litro y se rellenó hasta 400 ml con caldo de papa (200 gr de papa fresca).
4. Se rellenó hasta 600 ml con agua destilada.
5. Los frascos Erlenmeyer con el medio de cultivo PDA se esterilizaron en una olla de presión con una presión de 20

libras y una temperatura de 121 °C. bajo estas condiciones se realiza el proceso total de esterilización en 40 minutos.

6. El medio esterilizado se dejó enfriar hasta que se pudo manipular, y se vertió luego en cajas petri, a razón de 20 ml por caja.

7. Se dejó solidificar el medio por 24 horas.



Figura 14.- Preparación del medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) en el laboratorio de Fitopatología de Postgrado del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”.

III.4.- Siembra del hongo en el medio de cultivo.

El protocolo de siembra del hongo se ilustra en la Figura 15, el cual consta de los siguientes pasos.

1. Con la ayuda de un sacabocados se marcaron trozos del hongo madre en la caja petri.

2. Se retiraron los trozos de *Fusarium* con un asa bacteriológica y se sembraron en el centro de las cajas petri con medio de cultivo PDA preparadas con anterioridad.
3. Una vez sembrada, se cerró la caja sin sellar.
4. Todas las actividades se realizaron dentro de una campana de flujo laminar para evitar contaminación.

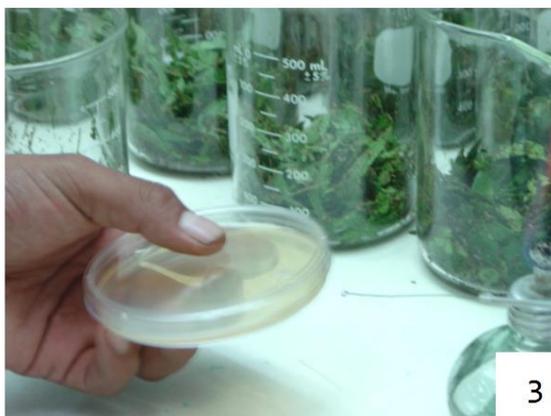


Figura 15.- Siembra del hongo en el medio de cultivo en el laboratorio de Fitopatología de Postgrado del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”.

III.5.- Preparación de material vegetal.

El procedimiento de preparación de material vegetal se ilustra en la Figura 16, el cual consta de los siguientes pasos.

1. El material vegetal se colecto durante la mañana, y dentro de las 24 horas se trituro finamente con la ayuda de un cuchillo de plástico para estimular la liberación de gases.
2. El material triturado se lavó con agua de chorro durante 10 minutos.
3. Se sumergió en alcohol puro (96% de pureza) durante un minuto, para después enjuagarlo en agua destilada.
4. Se vertieron 20 gramos del material vegetal desinfectado en un vaso de precipitados de 600 ml. A este material se le agregaron 4 gramos de estiércol pulverizado de conejo.



Figura 16.- Preparación de material vegetal en el laboratorio de Fitopatología de Postgrado del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro".

III.6.- Establecimiento del ensayo.

El protocolo para establecer el ensayo se ilustra en la Figura 17, y se realizó de la siguiente manera.

1. La caja petri con el inóculo del hongo, se colocó de forma invertida en la boca del vaso de precipitados que contenía el material biofumigante.
2. Se selló la caja al vaso con ayuda de cinta parafilm.
3. El cierre de los vasos, y la ausencia de drenajes impidió que se escapen los gases producidos durante la descomposición de la materia orgánica.
4. Los vasos se incubaron en oscuridad completa a una temperatura constante de 25°C, durante 9 días en una cámara de germinación.
5. Se realizaron tres repeticiones para cada condición del ensayo y se llevaron a cabo por triplicado en el tiempo.
6. Las diferentes condiciones del ensayo fueron:
 - Combinaciones de material vegetal y estiércol
 - Tratamiento de estiércol solo sin material vegetal
 - Tratamiento control: vaso de precipitados vacío, sin ningún material.



Figura 17.- Establecimiento del ensayo en una cámara de germinación presente en el laboratorio de Fisiología vegetal del departamento de Botánica de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”.

III.7.- Variables evaluadas.

III.7.1.- Crecimiento radial.

Con la ayuda de un vernier, se midió el crecimiento radial del hongo *Fusarium oxysporum* Schlect f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hans, hasta que el tratamiento control cubrió la totalidad de la caja Petri (Figura 18.). Esto con la finalidad de contrastar el crecimiento normal del hongo con el de los tratamientos con biofumigante.



Figura 18.- Medición del crecimiento radial de *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* con la ayuda de un Vernier.

Después de nueve días, el ensayo concluyó y los registros de crecimiento de cada tratamiento se analizaron para determinar la velocidad de crecimiento (mm/día), el área de crecimiento (cm²) y el porcentaje de inhibición.

III.7.2.- Cinética de crecimiento

Se midió diariamente el crecimiento radial del hongo, los cuales se graficaron. Los resultados fueron obtenidos del promedio de nueve repeticiones por cada tratamiento.

III.7.3.- Velocidad de crecimiento (mm/día).

La velocidad de crecimiento en hongos filamentosos, indica la capacidad del microorganismo para colonizar algún sustrato, es decir, sirve para evaluar la capacidad de los hongos para invadir y adaptarse a los nutrientes. Se determinó restándole al tamaño final el tamaño inicial, posteriormente se dividió entre los días de incubación del hongo.

$$\text{Vel. crec.} = \frac{\text{Tamaño final} - \text{Tamaño inicial}}{\text{Días de incubación}}$$

III.7.4.- Área de crecimiento (cm²).

Se utiliza para determinar el crecimiento vegetativo del hongo, este crecimiento le sirve al hongo para obtener nutrientes y posteriormente formar estructuras reproductivas. Se obtuvo utilizando la fórmula del área del círculo ($A = \pi r^2$) y de esta manera determinar el área de expansión final del patógeno.

III.7.5.- Porcentaje de inhibición.

Se obtuvo mediante la siguiente fórmula. % inhibición = $[(X_c - X_i) / X_c] * 100$

Dónde:

Xc: Media del crecimiento radial del control

Xi: El crecimiento radial de los medios con biofumigación.

III.8.- Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con diez tratamientos, tres repeticiones para cada uno y se realizó por triplicado en el tiempo. Los datos fueron analizados con el programa estadístico R (R Core Team 2013). Se realizó un análisis de varianza para determinar si existen diferencias entre los tratamientos, y cuando así fue, se realizó una Prueba de comparación múltiple de medias por el Método de Tukey para identificar grupos que difieren estadísticamente ($P < 0.01$).

"El trabajo aleja de nosotros tres grandes males: el aburrimiento, el vicio y la necesidad."

Voltaire

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En este trabajo se ha realizado un análisis de Varianza y una comparación de medias (Cuadro 2), en los cuales se estudió la variabilidad que existe entre los compuestos volátiles producidos por diez tratamientos de Biofumigación en el control del hongo Fitopatógeno *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*. El ANOVA y comparación de medias se llevaron a cabo con el programa estadístico R.

Cuadro 2. Análisis de Varianza y Comparación de Medias del efecto producido por la biofumigación sobre las colonias de *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*.

| Tratamientos | Velocidad de crecimiento (mm/día) ** | Área de crecimiento (cm ²) ** | Inhibición (%) ** |
|-------------------------------|---|--|----------------------|
| <i>Brassica oleraceae</i> | 0.208 d ^δ | 0.638 f | 97.72 a |
| <i>Pinus cembroides</i> | 0.291 d | 0.722 f | 96.8 ab |
| <i>Olea europea</i> | 0.333 d | 0.857 f | 96.35 b |
| <i>Schinus molle</i> | 0.486 cd | 1.389 ef | 94.67 c |
| <i>Cucurbita foetidissima</i> | 0.680 bcd | 2.189 de | 92.54 d |
| <i>Carya illinoensis</i> | 0.791 bcd | 2.578 cd | 91.32 e |
| <i>Flourenzia cernua</i> | 1.347 bc | 3.569 bc | 85.24 f |
| <i>Larrea tridentata</i> | 1.514 b | 4.243 b | 83.41 g |
| Estiercol | 9.125 a | 50.27 a | 0 h |
| Control | 9.125 a | 50.27 a | 0 h |
| C.V. % | 25.0031 | 6.605999 | 0.925884 |
| DMSH | 0.9169362 | 1.182972 | 1.048432 |

^δ. Valores medios con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.01$); ** Diferencia altamente significativa; C.V. Coeficiente de variación expresado en %.; DMSH: Diferencia mínima Significativa Honesta.

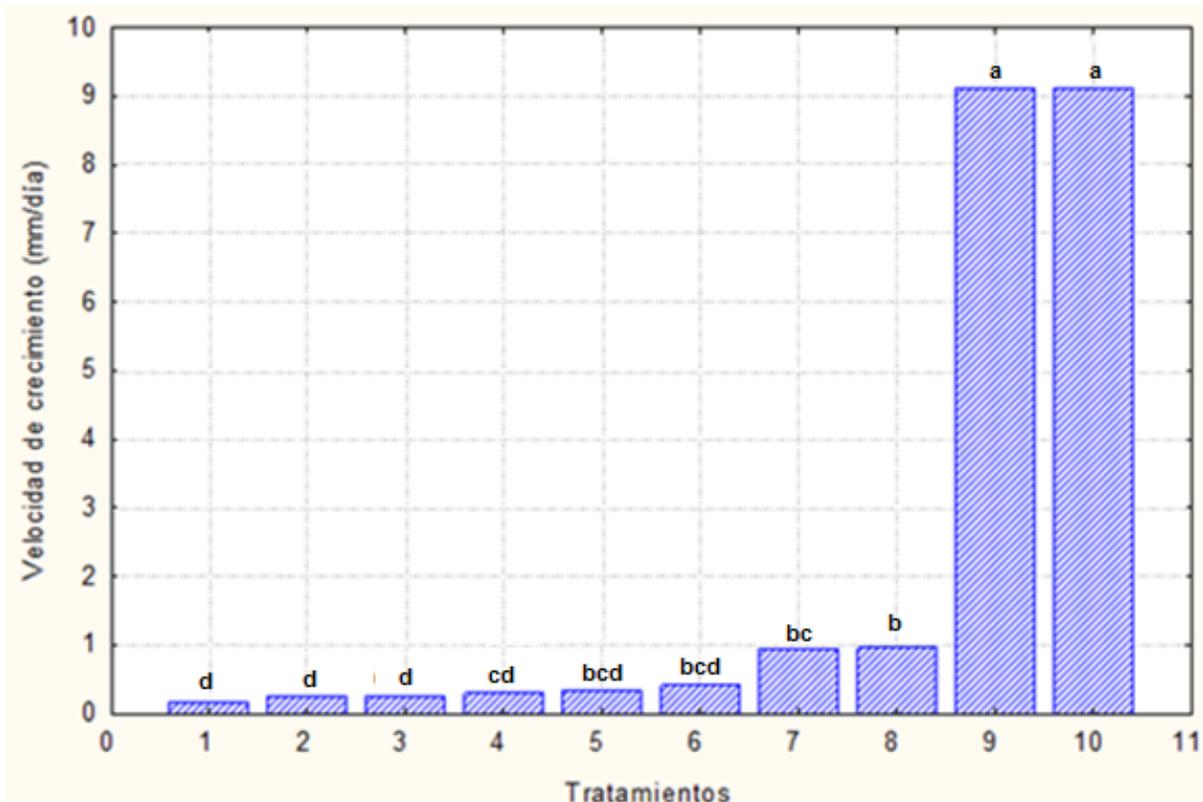
IV.1.- Velocidad de crecimiento.

La velocidad de crecimiento del hongo se vio extremadamente reducida con los tratamientos a los que se le aplicó material vegetal, los cuales probablemente liberaron algunas sustancias gaseosas con actividad antifúngica. En el análisis de varianza (Cuadro 2), se observa que el menor crecimiento del hongo se presentó en el tratamiento al que se le aplicó *Brassica oleracea* Var. *Itálica* (Brócoli), el cual presentó un crecimiento diario de 0.208 mm, mientras que el tratamiento control mostro un crecimiento del hongo de 9.125 mm/día, dejando ver de esta manera que los materiales vegetales al descomponerse liberan sustancias que detienen el crecimiento del hongo.

También la gobernadora (*Larrea tridentata*), que resultó ser el tratamiento con los efectos más pobres, presentó únicamente un crecimiento diario de 1.514 mm, el cual es seis veces menor que el tratamiento control y que el tratamiento donde se aplicó únicamente estiércol. (Gráfica 1.)

La velocidad de crecimiento del hongo *Fusarium* puede variar por las temperaturas de exposición, por lo tanto, al estar creciendo a las temperaturas optimas (25°C) y en oscuridad, se puede concluir que la reducción de la velocidad de crecimiento en este caso se debió a la exposición de la cepa a los gases generados en la

descomposición del material vegetal; puesto que el hongo nunca estuvo en contacto este, por lo que la toxicidad de los gases es inminente.



Gráfica 1. Velocidad de crecimiento radial del hongo *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*, expuesto a distintos tratamientos de biofumigación *in vitro*. Tratamientos: 1.- *Brassica oleraceae* Var. *Italica*, 2.- *Pinus cembroides*, 3.- *Olea europea*, 4.- *Schinus molle*, 5.- *Cucurbita foetidissima*, 6.- *Carya illinoensis*, 7.- *Flourenacia cernua*, 8.- *Larrea tridentata*, 9.- Estiércol puro, 10.- Control.

En el ANOVA realizado para esta variable, se observa que los mejores tratamientos, es decir, los que permitieron un menor crecimiento del hongo, fueron los que se les aplicó *Brassica oleraceae*, *pinus cembroides* y *Olea europea*, (grupo d) seguidos por el tratamiento con *Schinus molle* (grupo cd), posteriormente, están los tratamientos con

Cucurbita foetidissima y *Carya illinoensis* (grupo bcd), por ultimo quedaron los tratamientos a los que se les aplico *Flourensia cernua* (grupo bc) y *Larrea tridentata* (grupo b). El tratamiento control estuvo en un grupo aparte (grupo a), junto con el tratamiento al que únicamente se le aplico estiércol, ya que el hongo presento un crecimiento normal en ambos casos, es decir, no hubo efecto alguno sobre el crecimiento del patógeno. Esta grafica se realizó de acuerdo al análisis de varianza y comparación de medias por el método de Tukey ($P < 0.01$). De esta manera, se ilustran las diferencias estadísticas entre los efectos de los tratamientos en comparación con la reducción que ejerció el tratamiento control (no hubo reducción en el crecimiento del hongo).

Como ya se mencionó anteriormente, el tratamiento con *Brassica oleracea* permitió únicamente un crecimiento del hongo de 0.208 mm/día (Cuadro 2), esto debido a la presencia de isotiocianatos (Smolinska, et. al., 2003). Estos resultados son superiores a los reportados por García-Sosa (2010), quien reportó una velocidad de crecimiento de *Fusarium oxysporum* Schelecht f. sp. *gladioli* (Massey) Snyder y Hansen superior a 6 mm diarios expuesto a 0.1 mg/ml de bencil-isotiocianato, y 2-feniletíl-isotiocianato, mientras que para fenil-isotiocianato a la misma concentración, únicamente creció 2.23 mm diarios. Este hongo, comenzó su crecimiento después

del segundo día de exposición a los isotiocianatos extraídos de crucíferas.

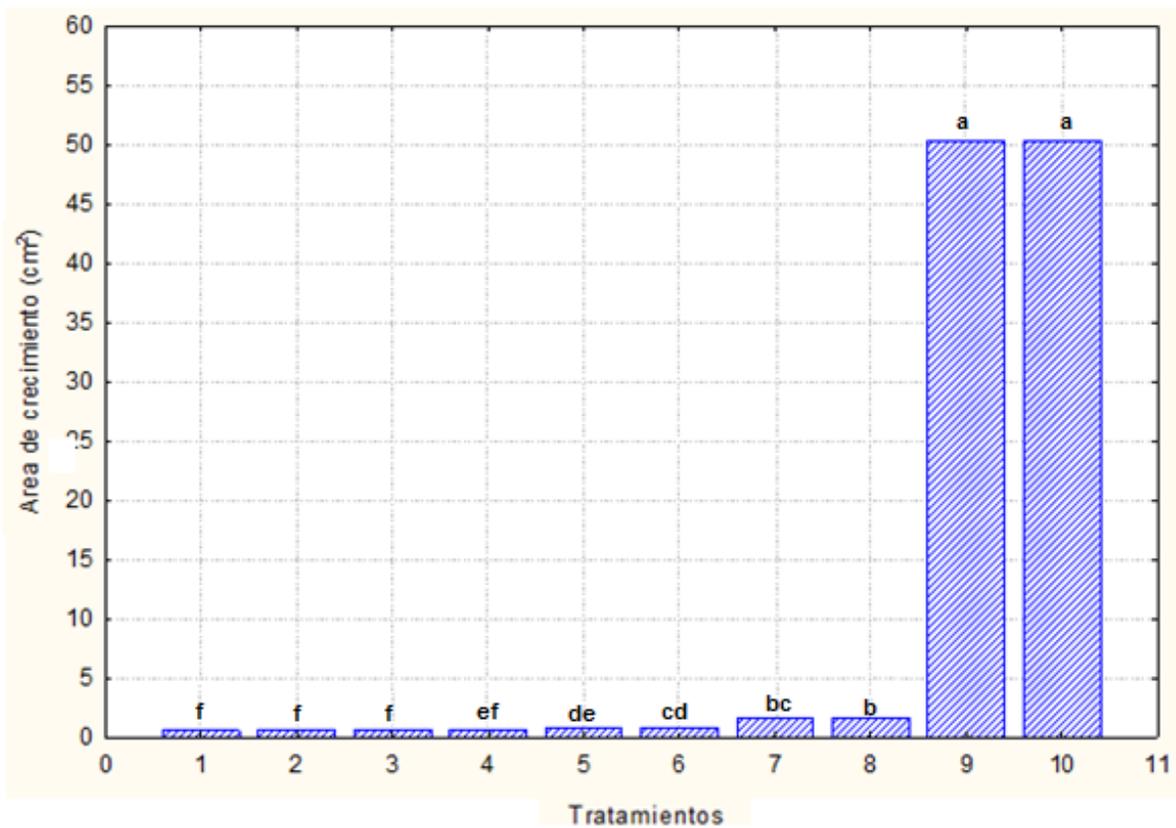
IV.2.- Área de crecimiento radial

El hongo patógeno *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* exhibe un crecimiento radial, por lo que ocupa un área de expansión. Debido a su naturaleza circular esta se puede calcular fácilmente. Esta variable sirve para determinar el área de expansión del patógeno. En el análisis de varianza y la prueba de comparación de medias por el método de Tukey ($P < 0.01$), (Cuadro 2) se muestra que en este experimento se pudo reducir el área de expansión del hongo de 50.27 cm^2 (tamaño máximo del hongo alcanzado en el tratamiento control) a tan solo 0.638 cm^2 con el tratamiento de biofumigación *in vitro* utilizando la especie *Brassica oleracea Var. Itálica* (Brócoli), siendo este el mejor tratamiento, seguido del pino (*Pinus cembroides*), y del olivo (*Olea europea*) con un área de expansión de 0.722 y 0.857 cm^2 respectivamente, constituyendo así el grupo “f”. Posteriormente, un área de crecimiento del hongo de 1.389 cm^2 fue presentada por el tratamiento al que se le aplicó *Schinus molle* (grupo “ef”). *Cucurbita foetidissima* constituyó el grupo “de” con un crecimiento de 2.189 cm^2 , posteriormente siguieron en ese orden los tratamientos a los que se les aplicó *Carya illinoensis* (2.578 cm^2 grupo “cd”), *Flourenzia cernua* (3.569 cm^2 grupo “bc”), *Larrea tridentata* (4.243

cm² grupo “b”), Estiércol y Control (con 50.27 cm² para ambos), constituyendo así el grupo “a”.

En la gráfica 2, se ilustra de manera gráfica las diferencias estadísticas altamente significativas encontradas en el ANOVA y comparación de medias, donde se muestra que la aplicación de brócoli obtuvo el menor área de crecimiento en el hongo con 0.638 cm², lo que representa un crecimiento siete veces menor al del tratamiento al que se le agregó la gobernadora (*Larrea tridentata*), siendo este el tratamiento que menos inhibió el crecimiento de *Fusarium* (4.243) cm². Por otro lado, este resultado es 11 veces menor que el presentado por el control y el tratamiento con estiércol (50.27 cm²), siendo de esta manera un resultado bastante considerable.

Estos resultados difieren con los encontrados por Smolinska, *et. al.*, (2003), quienes encontraron únicamente una acción fungistática, no fungitóxica, con la aplicación de isotiocianatos producidos por especies de *Brassicaceae* (2-propenyl, Ethyl, butyl, phenylethyl, benzyl, y phenyl isotiocianatos) a 0.3 µl, ya que no inhibieron el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, sino que, simplemente, inhibieron el crecimiento del patógeno los primeros días y posteriormente, el hongo continuó su desarrollo normal.



Gráfica 2. Área de crecimiento radial del hongo *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*, expuesto a distintos tratamientos de biofumigación *in vitro*. Tratamientos: 1.-*Brassica oleraceae* Var. *Italica*, 2.- *Pinus cembroides*, 3.- *Olea europea*, 4.- *Schinus molle*, 5.- *Cucurbita foetidissima*, 6.- *Carya illinoensis*, 7.- *Flourenzia cernua*, 8.- *Larrea tridentata*, 9.- Estiercol puro, 10.- Control.

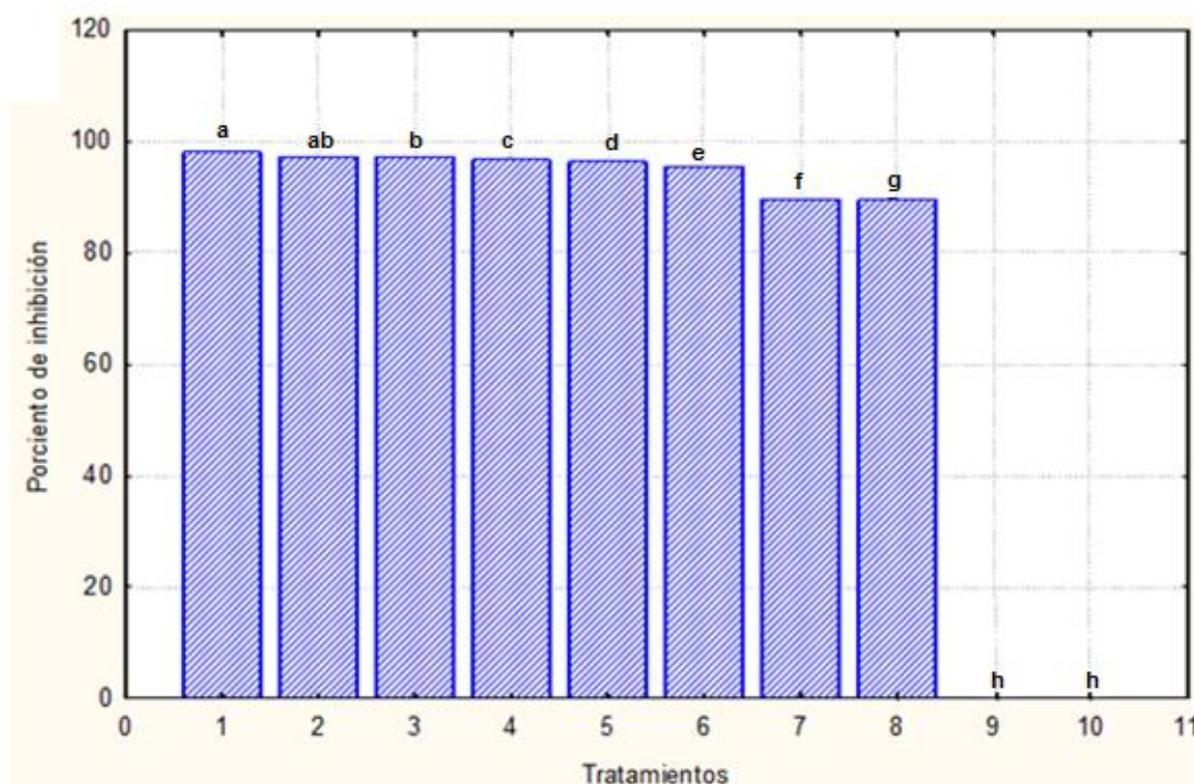
Por otro lado, Ramirez-Villapudua and Munnecke (1987), reportan que el crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* Schlecht. *f. sp. conglutinans* (Wr.) Syd y Hans., se redujo prácticamente a cero en experimentos de laboratorio, donde fueron expuestos a gases obtenidos de la descomposición de residuos de crucíferas en contenedores cerrados. La inhibición completa del crecimiento ocurrió 24 horas después de la aplicación de residuos de crucíferas a una concentración de 10%. Sin embargo, el patógeno

recuperó su crecimiento normal cuando las placas fueron transferidas al aire fresco, o cuando porciones del hongo fueron sembradas en PDA e incubadas al aire fresco. Por lo tanto, el efecto de las sustancias volátiles fue fungistático (Ramirez-Villapudua and Munnecke 1987). Estos autores explican que los gases no fueron absorbidos por el PDA, y que probablemente, el efecto fungistático fue debido a la acción directa de los gases en el micelio de *Fusarium* y no una acumulación toxica en PDA. En contraste, cuando el suelo infestado por el patógeno fue suspendido sobre residuos de crucíferas en descomposición, el efecto fue fungicida.

IV.3.- Porcentaje de inhibición del hongo.

Los tratamientos de biofumigación a los que fue expuesto el hongo patógeno *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*, liberaron gases tóxicos para este, (nunca hubo contacto directo entre el material vegetal y el hongo) lo cual se vio reflejado en el alto porcentaje de inhibición que estos generaron sobre el organismo en cuestión. En el ANOVA se muestra que el porcentaje de inhibición más alto lo presentó el tratamiento con material de brócoli (*Brassica oleracea Var. Itálica*) con una inhibición del 97.72 %, (Cuadro 2) mientras que el tratamiento control y el de estiércol no generaron ningún tipo de inhibición. Con la ayuda de la comparación de medias por el

método de Tukey ($P < 0.01$) se demostró que todos los tratamientos fueron estadísticamente diferentes. En la gráfica 3, se ilustran de manera práctica las diferencias estadísticas encontradas en el ANOVA y los grupos estadísticamente diferentes encontrados con la comparación de medias.



Gráfica 3. Porcentaje de inhibición del hongo *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*, expuesto a distintos tratamientos de biofumigación *in vitro*. Tratamientos: 1.-*Brassica oleraceae* Var. *Italica*, 2.- *Pinus cembroides*, 3.- *Olea europea*, 4.- *Schinus molle*, 5.- *Cucurbita foetidissima*, 6.- *Carya illinoensis*, 7.- *Flourenzia cernua*, 8.- *Larrea tridentata*, 9.- Estiercol puro, 10.- Control.

En esta imagen, se observa que *Brassica oleracea* obtuvo los mejores resultados de inhibición con un 97.72% (grupo “a”), seguido del tratamiento con *Pinus cembroides* con un 96.8% de inhibición en el crecimiento del hongo (grupo “ab”), seguidos de los tratamientos

con *Olea europea* (96.35 % de inhibición; grupo “b”), *Schinus molle* (94.67 % de inhibición; grupo “c”), *Cucurbita foetidissima* (92.54 % de inhibición; grupo “d”), *Carya illinoensis* (91.32 % de inhibición; grupo “e”), *Flourenzia cernua* (85.24 % de inhibición; grupo “f”), *Larrea tridentata* (83.41 % de inhibición; grupo “g”) y finalmente los tratamientos con Estiércol y el Control (no inhibieron al hongo, conformando así el grupo “h”).

Estos resultados coinciden con los reportados por Ramirez-Villapudua and Munnecke (1987), quienes reportan una inhibición de 99.4% en el crecimiento de *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *conglutinans* (Wr.) Snyder y Hans con la aplicación de residuos de crucíferas en descomposición. Resultados similares fueron reportados por Smolinska., (2000), quien reporta una inhibición de la viabilidad de propangulos de *Fusarium oxysporum* de un 86 a un 95% con la aplicación de residuos de *Brassica juncea*.

Smolinska y horbowicz (1998), reportan una inhibición total en la viabilidad de las clamidosporas de *Fusarium oxysporum*, cuando fueron expuestos a *Brassica juncea* y *Sinapis alba* (cultivares Nakielska y Borowska), las cuales presentan en altas concentraciones Allyl, Benzyl y Phenylethyl-isotiocianatos.

Por otro lado, los tratamientos que causaron una inhibición menor fueron los materiales de la Gobernadora y el hojase con una

inhibición de 83.41 y 85.24 % respectivamente. Resultados similares fueron obtenidos por López-Benítez, et. al., (2005), quienes reportaron una inhibición de 81.3 (5% de concentración) y 92.7% (10% de concentración) en *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, con la aplicación de extractos de gobernadora aunque difiere en los resultados con extractos de hojasen, puesto que reportaron una inhibición de 42.8 y 53.7% en las concentraciones anteriores, siendo muy inferiores a los encontrados en este trabajo.

En el caso de la Gobernadora, la lenta liberación del ácido nordihidroguayarético, puede ser la causa de la baja inhibición del crecimiento del hongo, puesto que se ha demostrado su potencial inhibitorio, pero esto es con la aplicación de extractos, los cuales son extraídos por medio de solventes orgánicos.(Mercado-Martínez, et. al., 2009)

IV.4.- Cinética de crecimiento

Los gases generados en la descomposición del material vegetal de todas las especies tuvieron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, tal como se muestra en la Figura 19. En ninguno de los casos el tratamiento con estiércol puro o el tratamiento control inhibieron el crecimiento radial del micelio del hongo.

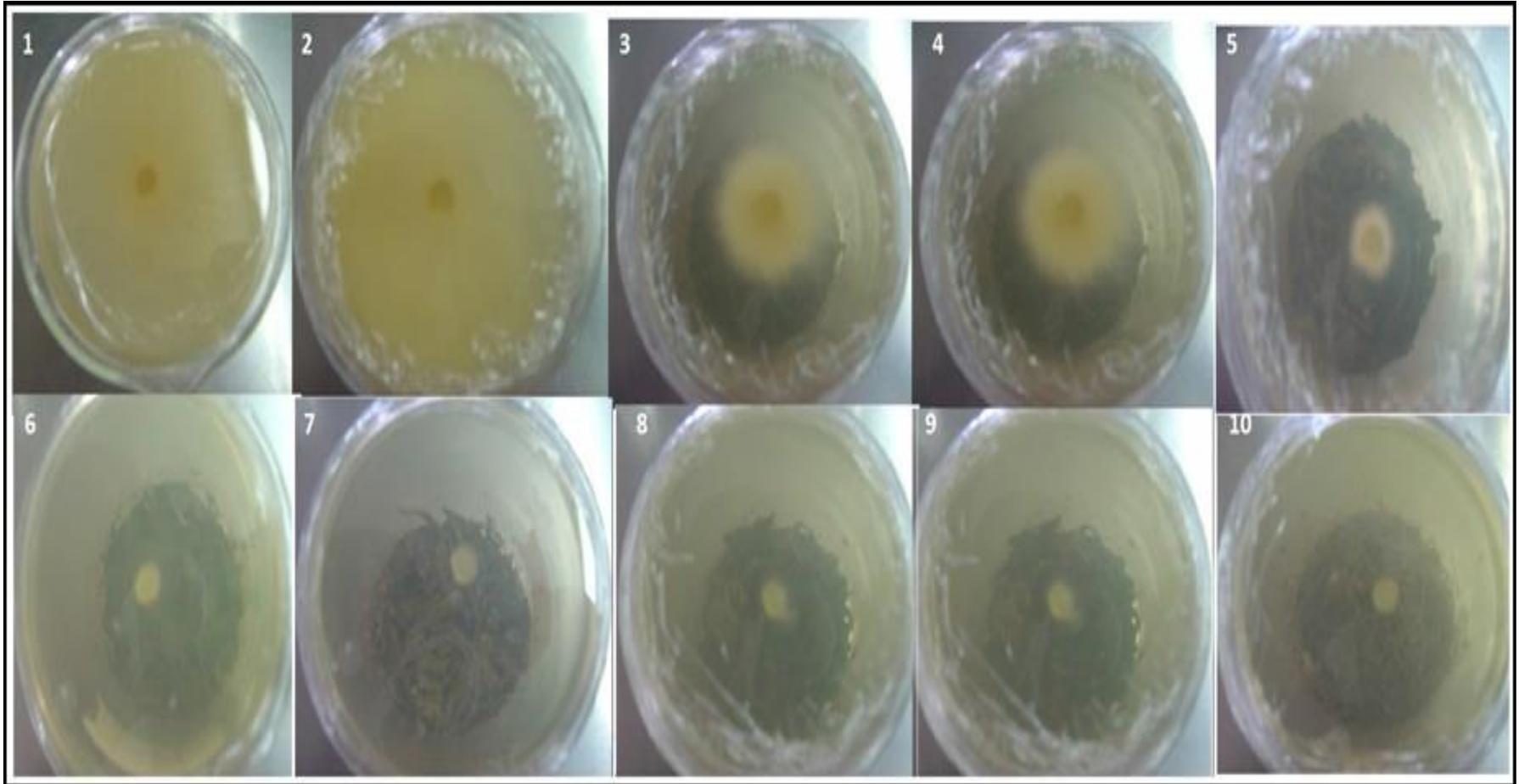
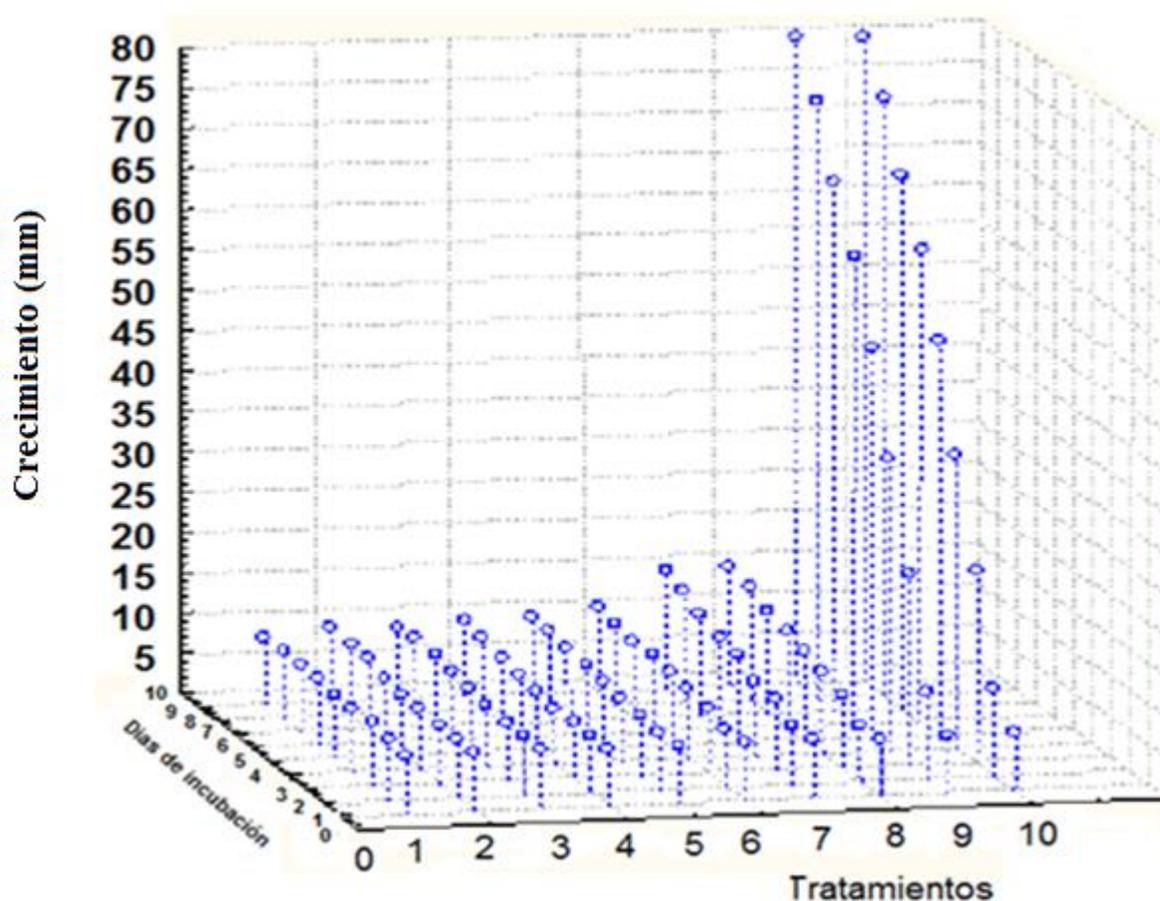


FIGURA 19. Crecimiento radial final del hongo *Fusarium oxysporum* bajo los siguientes tratamientos; 1.- Testigo, 2.- Estiércol, 3.- *Larrea tridentata*, 4.- *Flourenzia cernua*, 5.- *Carya illinoensis* 6.- *Cucurbita foetidissima*, 7.- *Schinus molle*, 8.- *Pinus cembroides*, 9.- *Olea europea*, 10.- *Brassica oleracea* Var. *Itálica*.

En la Gráfica 4 se observa que los mejores resultados inhibitorios del crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* se presentan con la aplicación del Brócoli (*Brassica oleracea* Var. *Itálica*) como material biofumigante. Esta característica es atribuida a la presencia de glucosinolatos en sus tejidos.



Gráfica 4. Cinética de crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*, sometido a diferentes tratamientos de biofumigación *in vitro*. Tratamientos: 1.- *Brassica oleraceae* Var. *Itálica*, 2.- *Pinus cembroides*, 3.- *Olea europea*, 4.- *Schinus molle*, 5.- *Cucurbita foetidissima*, 6.- *Carya illinoensis*, 7.- *Flourenxia cernua*, 8.- *Larrea tridentata*, 9.- Estiercol puro, 10.- Control.

Posteriormente los resultados de la aplicación de sustratos como biofumigantes van decreciendo en efectividad en el siguiente orden: *Olea europea*, *Pinus cembroides*, *Schinus molle*, *Cucurbita foetidissima*, *Carya illinoensis*, *Flourenzia cernua*, *Larrea tridentata*, y finalmente, con un crecimiento normal están los tratamientos a los que se les agrego únicamente estiércol como enmienda y el tratamiento control. Estos últimos no tuvieron efecto inhibitorio en el crecimiento del patógeno, es decir, el hongo siguió su curva normal de crecimiento.

*“La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar
y a ser ignorante.”*

Miguel de Unamuno

V. CONCLUSIONES

Los resultados anteriores permiten concluir que el uso de la biofumigación como técnica de control de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* es factible, ya que todos los tratamientos *in vitro* presentaron una alta capacidad inhibitoria. Estos resultados sirven de base para establecer investigaciones posteriores sobre el efecto de la rotación de cultivos de tomate y de Brócoli para disminuir el inóculo de *Fusarium oxysporum* e integrando esta técnica dentro de las prácticas culturales de un manejo integrado del patógeno en el cultivo del tomate.

De esta manera, la biofumigación se confirma fuertemente como una práctica agrícola que puede ser incluida satisfactoriamente en el manejo integrado de plagas fúngicas y demás.

“La ciencia no sirve sino para darnos una idea de cuan vasta es nuestra ignorancia.”

Félicité de Lamennais

VI. LITERATURA CITADA

- AGRIOS, G. N. 2005. Fitopatología. 2ª Edición, Editorial Limusa, México D. F. 819 pp.
- Al-Gendy A. A., O. D. El-gindi, A. S. Hafez, & A. M. Ateya. 2010. Glucosinolates, volatile constituents and biological activities of *Erysimum corinthium* Boiss. (Brassicaceae). Food Chemistry, 118(3), 519-524.
- Arteaga S., A. Andrade-Cetto y R. Cárdenas. 2005. “*Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid”. Journal of Ethnopharmacology. 98(3):231-239.
- Bailey K. L., G. Lazarovits. 2003. Suppressing soilborne diseases with residue management and organic amendments. In: AV Sturz, BR Christie (Eds). Soil agroecosystems: impacts of management on soil health and crop diseases. Soil & Tillage Research. 72: 169-180.
- Bello A., J. A. López-Pérez, M. Arias, A. Lacasa, C. Ros, M. Herrero, P. Fernández. 2001. Biofumigation and grafting in pepper as alternative to BM. *Annual International Research Conference on MB Alternatives and Emissions Reductions*. 5-9 Noviembre 2001. San Diego, California, EE UU.

- Bello A., J. A. López-Pérez, M.A.Díez-Rojo, J. López-Cepero, A. García Álvarez. 2008. Principios ecológicos en la gestión de los agroecosistemas. *Arbor, Ciencia, Pensamiento y Cultura* 729: 19-29.
- Bello A. J. A. López-Pérez, A. García-Álvarez. 2003. Biofumigación en agricultura extensiva de regadío. Produccion integrada de hortícolas. CSIC-Caja Rural de Alicante, Mundi-Prensa, Madrid, España, 670 pp.
- Botting, C. H., N. E. Davidson, D. W. Griffiths, R. N. Bennett, & N. P. Botting. 2002. Analysis of Intact Glucosinolates by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5), 983-988.
- Brown, P. D., and Morra, M. J. 1995. Glucosinolate-containing plant tissues as bioherbicides. *J. Agric. Food Chem.* 43:3070-3074.
- Diánez F., M. Santos-Hernandez, M. R. Blanco, M. Chebaani, P. Castillo, J. A. Yelamos, F. J. Gea, M. I. Trillas, M. Avilés, J. Sinobas, J. C. Tello. 2002. Supresividad de la microbiota bacteriana presente en el compost de orujo de vid frente a hongos fitopatógenos. *V. Congreso de La SEAE y I Congreso Iberoamericano de Agroecología*. Gijón, España. 983-991.

Diáñez F., J. Criado, M. Santos-Hernández, M. De Cara, R. Martínez, I. Segura, A. García-Gámez, M. Chebaani, A. Bello, M. Avilés, J. C. Tello. 2003. Control of *Phytophthora capsici* by biofumigation. IOBC WPRS Bulletin. Colloque International Lutte Intégrée Cultures Protégées Climat Méditerranéen. Agadir, Marruecos, 150-151.

Diez-Rojo M. A. 2010. Bases agronómicas para la utilización de restos agrarios en biodesinfección de suelos. Tesis Doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid, España, 409 pp.

Diez-Rojo M. A., J. A. López-Pérez, P. Urbano-Terrón, A. Bello-Pérez. 2010. Biodesinfección de suelos y manejo agronómico. Secretaria General Técnica. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. España 408 pp.

Dihigo, L. E, L. Savón, y F. Sierra. 2001. Estudios morfométricos del tracto gastrointestinal y órganos internos de conejos alimentados con piensos que contienen harina de caña de azúcar. Rev. Cub. Cienc. Agric. 35(4)361.

Escobar C. 1997. Hormonas naturales para control de plagas. AUPEC CIENCIA AL DÍA. Palmira, Colombia. <http://aupec.univalle.edu.co/informes/septiembre97/boletin45/hormonas.html>

Espinosa-García, F. J., 2001. La diversidad de los metabolitos secundarios y la teoría de la defensa vegetal. In: Anaya A. L., F. J. Espinosa-García, R. Cruz-Ortega, (Coordinadores). Relaciones químicas entre organismos. Aspectos básicos y perspectivas. Instituto de Ecología. Plaza y Valdés S. A. de C. V. México D. F.

Ezziyyani M., A. Sid-Ahmed, C. Pérez-Sánchez, M. E. Requena, M. E. Candela. 2006. Control biológico por microorganismos antagonistas. Revista Horticultura, 191: 8-15.

Farr D. F., G. F. Bills, G. P. Chamuris, A. Y. Rossman. 1989. Fungi on plants and plant products in the United States. APS Press. St. Paul, Minnesota, USA.

Figueredo R. M., A. Bello, A. Piedra Buena, M. A. Diez-Rojo. 2011. Evaluación del uso de residuos agrícolas como biofumigantes en el control de nematodos. Centro agrícola, 38(2):15-19.

García-Sosa P. R. 2010. Evaluación in vitro del quitosano e Isotiocianatos en el desarrollo y morfología de *Fusarium oxysporum* Shelecht f. sp. *Gladioli* (Massey) Snyder y Hansen. Tesis de Maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos, México 103 pp.

- Gimsing A. L., J. A. Kirkegaard, & H. C. B. Hansen. 2005. Extraction and Determination of Glucosinolates from Soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(25), 9663-9667.
- Gimsing A., & J. Kirkegaard. 2009. Glucosinolates and biofumigation: fate of glucosinolates and their hydrolysis products in soil. *Phytochemistry Reviews*, 8(1), 299-310.
- Glauert, A. M., J. T. Dingle, J. A. Lucy, 1962. Action of saponin on biological cell membranes. *Nature* 196: 953-955
- Grainge M., S. Ahmed. 1988. Handbook of plants with pest control properties. John Wiley and Sons. New York, USA, 470 pp..
- González-Mañas J. M. 2013. Curso de Biomoléculas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad del País Vasco. España. <http://www.ehu.es/biomoleculas/hc/sugar33c6.htm>
- Grayer, R. J., J. B. Harborne. 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry* 37: 19-42.
- Guzmán-Casado G., M. González de Molina y E. Sevilla Guzmán (eds.) 1999. Introducción a la agroecología como desarrollo rural sostenible. Editorial Mundi-Prensa, Madrid, España, 535 pp.
- Hader Y., R. Mandelbaum, B. Gorodecki. 1992. Biological control of soilborne plant pathogens by suppressive compost. *In: Tjamos*

- E. S., G. C. Papavizas, R. J. Cook (Eds). Biological control of plant diseases. Plenum Press, New York, USA, 79-83.
- Hoitink H. A. 1988. Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. Annual Review of Phytopathology. 24: 93-114.
- Instituto Biológico. 2013. Manual de Fitoterapia. www.institutobiologico.com/downloads/Manual%20de%20Fitoterapia.pdf
- Jones I. B., I. P. Jones, R. E. Stall y T.A. Zitter. 1997. Compendium of tomato diseases. The American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota USA.
- Josuah. 2009. *Schinus molle*. Fuente de permacultura. <http://foro.fuentedepermacultura.org/index.php?topic=905.0>
- Kirkegaard J. A., S. Akiew, T. Pattison, A. Young, L. Prior. 2008. Understanding mechanism of plant pest suppression using *Brassica* green manures. Proceedings of 3th International Biofumigation Symposium. Canberra, Australia, 21-25 July 2008, 21 pp.
- Koitaabashi, R., T. Suzuki, T. Kawazu, A. Sakai, H. Kuroiwa, T. Kuroiwa. 1997. 1,8- cineole inhibits root growth and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* L. Journal of Plant Research, 110: 1-6.

- Levin, D. A., B. M. York, 1978. The toxicity of plant alkaloids: an ecogeographic perspective. *Biochemistry, Systematics and Ecology* 6: 61-76.
- Li, X., & M. M. Kushad. 2004. Correlation of Glucosinolate Content to Myrosinase Activity in Horseradish (*Armoracia rusticana*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23), 6950-6955.
- López-Benítez A., S. R. López-Betancourt, M. E. Vázquez-Badillo, S. A. Rodríguez-Herrera, M. Mendoza-Elos, y E. Padrón-Corral. 2005. Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *Lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Verticillium dahliae* Kleb., mediante extractos vegetales acuosos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 23: 183-190.
- López-Cepero J. 2009. Agroecología y manejo de nematodos en cultivos protegidos de Canarias. Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, España. 314 pp.
- López-Cepero J., A. Piedra-Buena, M. A. Díez-Rojo, R. Regalado, E. Brito, Z. Hernández, M. Figueredo, G. Almendros, A. Bello. 2007. Evaluation of soil biodesinfestation with crop and garden residues in root-knot nematodos populatins. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. Ghent University 72:703-712.

López-Martínez N., S. Castillo, I. M. Cuaresma, I. Carmona, J. E. González-Zamora, C. Avilla, J. López-Medina, I. Aguirre. 2004. Efecto de la biofumigación sobre la flora arvensis del fresón. Actas VI Congreso SEAE, 27 de septiembre-2 de octubre, Almería, España, 1531-1539.

Lucini, E. I., M. P. Zunino, M. L. López, A. Zygadlo. 2006. Effect of monoterpenes on lipid composition and sclerotial development of *Sclerotium cepivorum* Berk. Journal of Phytopathology 154: 441-446.

Macias, A. F., C. G. J. Galindo, 2001. Terpenoides alelopáticos: estructura, actividad y aplicaciones. In: Anaya A. L., F. J. Espinosa-García, R. Cruz-Ortega. (Coordinadores). Relaciones químicas entre organismos. Aspectos básicos y perspectivas. Instituto de Ecología. Plaza y Valdés S. A. de C. V. México D. F. 137-161.

Mansfield, J. W., 1983. Antimicrobial compounds. In: Callow (ed.). Biochemical Plant Pathology. John Wiley and Sons. New York, USA, 237-263.

MBTOC. 2007. 2006 Report of the methyl bromide technical options committee. 2006 assessment 2006 MBTOC Assessment Report. UNEP, Nairobi, Kenia. 453 pp.

Mercado-Martínez D., J. L. Martínez, S. Martins, J. A. Teixeira, C. N. Aguilar. 2009. Estudio comparativo del proceso de liberación de ácido Nordihidroguayarático por fermentación en medio sólido y líquido utilizando diferentes microorganismos. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras. Acapulco, Guerrero, México.

Morrissey, J. P., A. Osbourn, 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Reviews* 63: 708-724.

Murphy C. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564-582.

Nelson P.E. 1981. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. En M.E. Mace, A.A. Bell and E.H. Beckman (eds.). *Fungal wilt diseases of plants*. Academic Press. New York. USA 640 pp

Nelson P.E. 1990. Taxonomy of fungi in the genus *Fusarium* with emphasis on *Fusarium oxysporum*. In R. Ploetz (ed.). *Fusarium wilt of banana*. American Phytopathological Society Press. St. Paul. Minnesota, USA, 140 pp.

Peñuelas J., M. Ribas-Carbo, L. Giles. 1996. Effects of allelochemicals on plant respiration and oxygen isotope

fractionation by the alternative oxidase. *Journal of Chemical Ecology* 22: 801-805.

Peñuelas, O., M. Arellano, J. L. Martínez, M. A. Gutiérrez, L. Castro y C. Mungarro. 2011. "Larrea tridentata potencial solución para la desinfección de suelo". *Ide@s CONCYTEG*, 6 (71): 605-616.

Piedra-Buena A. 2004. *Agroecología de Meloidogyne Göldi, 1982 (Nematoda: Heteroderidae) en cultivos hortícolas protegidos. Tesis doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad de Almería. Almería, España, 397 pp.*

R version 3.0.0 "Masked Marvel". Copyright (C) 2013 The R Foundation for Statistical Computing Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)

Rai, M., D. Acharya, P. Wadegaonkar, 2003. Plant-derived antimycotics: potential of Asteraceous plants. In: Rai, M., D. Mares, (eds.). *Plantderived antimycotics. Current trends and future prospects.* Hartworth Press. New York, USA. pp. 165-195.

Ramirez-Villapudua, J., and D. E. Munnecke, 1987. Control of cabbage yellow (*Fusarium oxysporum f. sp. conglutinans*) by solar heating of field soils amended with dry cabbage residues. *Plant Dis.* 71:217-221.

- Ramirez-Villapudua, J., and D. E. Munnecke, 1988. Effect of solar heating and soil amendments of cruciferous residues on *Fusarium oxysporum f. sp. conglutinans* and other organisms. *Phytopathology* 78:289-295.
- Regalado R., E. Brito, J. López-Cepero, A. Bello. 2006. Efectos de la biofumigación con residuos de cultivo sobre un suelo de cultivo de tomates. VII congreso SEAE, 18-23 Septiembre 2006, Zaragoza, España, N° 82. 6 pp
- Rodriguez R. 2000. Tendencias actuales para tecnologías sostenibles. Simposio sobre cultivos protegidos en climas de invernadero templado. *Horticultura* 145: 38-46.
- Sakakibara M., D. DiFeo, N. Najatani, B. Timmerman y T. Mabry (1976), "Flavonoid methyl ethers on the external leaf surface of *Larrea tridentata* and *L. divaricata*", *Phytochemistry*, 15: 727-731.
- Sampietro D. A. 2013. Alelopatia: Hipertextos del Área de la Biología. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán Argentina. <http://www.biologia.edu.ar/plantas/alelopatia.htm>.
- Santos M., N. Vicente, F. Diáñez, M. De Cara, J. C. Tello. 2007. Vinazas y hongos del suelo. *Agroecología* 2: 39-45.

- Schlösser, F. W., 1980. Preformed internal chemical defenses. In: Horsfall, J. G. and G. Cowling. (eds.). Plant Disease. Vol. V. Academic Press. New York. 556 pp.
- Selitrechnikoff, C. P., 2001. Antifungal proteins. Applied and Environmental Microbiology: 2883-2894.
- Senanayake U. M., T. H. Lee, R. B. H. Wills, 1978. Volatile constituents of cinnaom (*Cinnamomum zeylanicum*) oils. Journal of Agriculture Food Chemistry 26: 822-824.
- Sepúlveda-Jiménez G., H. Porta-Ducoing, M. Rocha-Sosa. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista Mexicana de Fitopatología 21: 355-363.
- Slusarenko, A. J., A. Patel, D. Portz, 2008. Control of plant diseases by natural products: allicin from garlic as a case study. European Journal of Plant Pathology 121: 313-322.
- Smith A., A. Smedley. 2011. *Fusarium oxysporum*. MicrobeWiki. the student-edited microbiology resource. http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Fusarium_oxysporum
- Smolinska, U. 2000. Survival of *Sclerotium cepivorum* sclerotia and *Fusarium oxysporum* chlamydospores in soil amended with cruciferous residues. J. Phytopathol. 148:343-349.

- Smolinska, U., M. J. Morra, G. R. Knudsen, and R. L. James, 2003. Isothiocyanates produced by Brassicaceae species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*. Plant Dis. 87:407-412.
- Smolinska, U., and Horbowicz, M. 1999. Fungicidal activity of volatiles from selected cruciferous plants against resting propagules of soil-borne fungal pathogens. J. Phytopathol. 147:119-124.
- Sotero V., E. Rengifo, J. Vela, C. Ono, Y. Fujii. 2010. Estudios de especies alelopáticas de la Amazonía peruana. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana. Iquitos, Peru. 3 pp.
- Tellez M. R., R. E. Estell, L. Fredrickson y K. M. Havstad. 1997. Essential oil of *Flourensia cernua* DC. Research report. J. Essent. Oil Res. 9: 619-624.
- Tiznado-Hernández, M. E., R. Troncoso-Rojas, 2006. Control of fungal diseases with isothiocyanates. Stewart Postharvest Review, 2(1):1-14.
- Weinert O. S. 2005. La Guerra de las plantas. Alelopatia. Universidad de Concepción. Wordpress, 26-30 <http://etraliprimera.files.wordpress.com/2011/03/alelopat.pdf>
- Zangerl, R. A., F. A. Bazzaz, 1992. Theory and pattern in plant defense allocation. In: Fritz, R. S., E. L. Simms (eds.) Plant

resistance to herbivores and pathogens. *Ecology, Evolution and Genetics*. University of Chicago Press. 590 pp.

Zanón M. J. 2009. Efecto de la biofumigación y biosolarización en el control de bacterias fitopatógenas. Tesis Doctoral, Escuela Universitaria de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politecnica de Valencia. Valencia, España, 301 pp.

Zavaleta-Mejía, E. 1987. Modificadores orgánicos en el manejo de enfermedades de la raíz. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 5:159-168.

Zhou X. G., and K. L. Everts. 2004. Suppression of *Fusarium* wilt of watermelon by soil amendment with hairy vetch. *Plant Dis*. 88:1357-1365.