



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**

**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS  
EN PROTECCIÓN VEGETAL**

**ACTIVIDAD FUNGICIDA *IN VITRO* DE EXTRACTOS ORGÁNICOS  
CONTRA PATÓGENOS DEL TOMATE (*Solanum lycopersicum*)**

**TESIS**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

**PRESENTA:**

**JOSÉ DE JESÚS BOJÓRQUEZ VEGA**

**Bajo la supervisión de: Dr. Marcelo Acosta Ramos**

**CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO, MARZO DE 2017**



DIRECCION GENERAL ACADEMICA  
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES  
COMISION DE EXAMENES PROFESIONALES



La presente tesis titulada **ACTIVIDAD FUNGICIDA *IN VITRO* DE EXTRACTOS ORGÁNICOS CONTRA PATÓGENOS DEL TOMATE (*Solanum lycopersicum*)**, bajo la dirección y asesoría del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

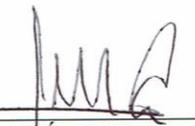
DIRECTOR: \_\_\_\_\_

  
Dr. Marcelo Acosta Ramos

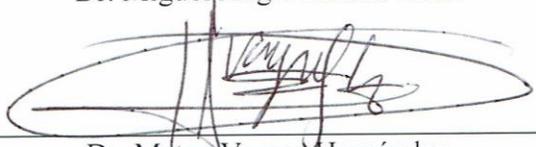
ASESOR: \_\_\_\_\_

  
Dra. María del Rosario García Mateos

ASESOR: \_\_\_\_\_

  
Dr. Miguel Ángel Serrato Cruz

ASESOR: \_\_\_\_\_

  
Dr. Mateo Vargas Hernández

Chapingo, Estado de México, marzo, 2017

## DEDICATORIAS

A mis padres Jasinto Bojórquez y Guadalupe Vega

A mi hermana Fernanda Bojórquez Vega

A mi pequeño sobrino Ismael “mayo” Bojórquez

A mi abuelo José Simón Vega

A mi abuela Plácida Gámez

En especial a toda mi familia y amigos

Todos ellos, por ser mi inspiración, estar conmigo en todo momento y apoyarme siempre

***No puedes construir un mundo pacífico sobre estómagos vacíos y miseria humana.***

*-Norman E. Borlaug*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma Chapingo, por brindarme la oportunidad de seguir creciendo como persona y profesionalmente.

Al Departamento de Parasitología Agrícola, por abrir sus puertas y hacer de mi estancia una de las mejores experiencias de mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por otorgarme apoyo financiero para llevar a cabo mis estudios de posgrado.

Al Dr. Marcelo Acosta Ramos, por sus enseñanzas, paciencia y todo su apoyo para la realización de la presente investigación. Además, agradezco su amistad brindada y el ser un ejemplo de persona profesional, siempre le estaré agradecido por ser parte de mi formación personal y profesional, una persona digna de admirarse.

A la Dra. María del Rosario García Mateos, por sus enseñanzas, mucha paciencia y todo su apoyo para la realización de esta presente investigación, una persona digna de admirarse.

Al Dr. Miguel Ángel Serrato Cruz, por su asesoría, apoyo y sus valiosas aportaciones para culminar este trabajo. Siempre hay un tema interesante de que hablar con esta persona, una persona digna de admirarse.

Al Dr. Mateo Vargas Hernández por su apoyo y siempre disponibilidad para la realización y culminación del presente trabajo, gracias doctor.

A todos mis compañeros y amigos de la maestría, pero muy en especial a Berenice, Paola Izquierdo, Joana, Marta, Marco Maidana y Erick Flores, por su compañía, disponibilidad de ayuda en trabajos, y consejos.

Al señor José Remedios Ramírez y al señor Hipólito Genaro Hernández por toda su ayuda para llevar a cabo esta investigación y gracias por todos esos ratos de bromas y risas que siempre alegraban el día.

A mis amigos Luis Galaviz, Edgar (borrego), Javier Huizar, Cesar y Baruch por siempre apoyarme en todo lo que me fue requerido para esta investigación, y por hacerme pasar ratos muy alegres durante mi estancia en Chapingo, agradezco también a todos mis paisanos Sinaloenses y amigos de otros estados que coexistieron conmigo durante este tiempo.

A mis compañeros del equipo representativo de béisbol de Chapingo, a mi manager Wilbert Solis por permitir pertenecer a esta gran familia.

Al Dr. Martin Tucuch Cahuich, por aceptarme en una estancia de investigación en la empresa GreenCorp Biorganiks de México en Saltillo Coahuila, siempre estaré agradecido con usted porque ese suceso me fortaleció mucho como profesional y persona, gracias totales.

A mis amigos, Cesar, Marco, Ontiveros, Irving, Odelia, Arizpe, Erika, Fabiola, Mike y al Dr. Daniel Hernández de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

En general a todas esas personas que formaron parte de esta meta y que me ayudaron a llegar hasta donde quiero estar.

## **DATOS BIOGRÁFICOS**

Nació en la Ciudad de Los Mochis, Sinaloa; realizó sus estudios de nivel medio superior en el Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 81 en el periodo 2006-2009, inició y terminó sus estudios de Licenciatura en Biología con especialidad en Parasitología Agrícola en el Instituto Tecnológico de Los Mochis en el periodo 2009-2013.

Durante el año 2014, se desempeñó como supervisor de producción convencional de tomate en Ahome, Sinaloa, y producción orgánica de tomate y pepino en invernaderos de alta tecnología en la empresa Wholesum Harvest Family Farms, en Imuris, Sonora.

Realizó estudios de posgrado en el Programa de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal del Departamento de Parasitología Agrícola en la Universidad Autónoma Chapingo en el periodo de 2015-2017.

# ACTIVIDAD FUNGICIDA *IN VITRO* DE EXTRACTOS ORGÁNICOS CONTRA PATÓGENOS DEL TOMATE (*Solanum lycopersicum*)

## FUNGICIDE ACTIVITY *IN VITRO* OF ORGANIC EXTRACTS AGAINST TOMATO PATHOGENS (*Solanum lycopersicum*)

José de Jesús **Bojórquez Vega**<sup>1</sup> y Marcelo **Acosta Ramos**<sup>2</sup>

### RESUMEN

La utilización de extractos vegetales para el manejo de enfermedades fúngicas en tomate es un recurso técnico alternativo al empleo de fungicidas sintéticos. El objetivo de la investigación fue evaluar *in vitro* la actividad antifúngica de extractos metanólicos a partir de hoja de *Argemone mexicana*, *Croton xalapensis*, *Foeniculum vulgare*, *Phytolacca icosandra* y *Tagetes lemmonii*, especies de amplia distribución en México, contra *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*, fitopatógenos que limitan la productividad en tomate. Los extractos se obtuvieron mediante equipo Soxhlet y se analizaron por cromatografía en capa fina; los bioensayos con estos extractos en concentraciones de 20, 40, 60 y 80 % aplicados contra tejido micelial de los patógenos, se establecieron con el método modificado de agar envenenado y también se incluyeron controles comerciales orgánico y químico. Con datos de inhibición del crecimiento se hizo análisis de varianza, prueba de Tukey ( $P=0.05$ ) y concentración mínima inhibitoria ( $CI_{50}$ ) con el procedimiento Probit. La inhibición del crecimiento micelial fue mayor con extractos de *P. icosandra* y *T. lemmonii* que con los de las otras especies. A la concentración de 80 %, el extracto metanólico de *P. icosandra*, constituido de alcaloides y flavonoides, presentó efecto de inhibición de 100 % contra *B. cinerea* ( $CI_{50}=0.04$  %), de 76 % en *A. solani* ( $CI_{50}=2.8$  %) y de 61 % en *F. oxysporum* ( $CI_{50}=40$  %); mientras que, con fungicida, la inhibición fue 77, 61 y 81 %, respectivamente y con el producto orgánico se lograron inhibiciones de 33, 63 y 70 %, respectivamente. El extracto de *T. lemmonii*, compuesto de flavonoides y terpenoides, mostró efecto de inhibición de 100 % contra *B. cinerea* ( $CI_{50}=19$  %), de 62 % en *A. solani* ( $CI_{50}$  de 34 %) y de 70 % en *F. oxysporum* ( $CI_{50}=48$  %).

**Palabras clave:** extractos metanólicos, antifúngico, análisis fitoquímico.

<sup>1</sup>Tesista, <sup>2</sup>Director.

### ABSTRACT

The use of vegetable extracts for the management of fungal diseases in tomatoes is an alternative technical resource to the use of synthetic fungicides. The objective of the research was to evaluate *in vitro* the antifungal activity of methanolic extracts from leaf of *Argemone mexicana*, *Croton xalapensis*, *Foeniculum vulgare*, *Phytolacca icosandra* and *Tagetes lemmonii*, species of wide distribution in Mexico, against *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum*, phytopathogens that limit productivity in tomatoes. The extracts were obtained by Soxhlet equipment and analyzed by thin layer chromatography; The bioassays with these extracts at concentrations of 20, 40, 60 and 80 % applied against mycelial tissue of the pathogens, were established with the modified method of poisoned agar and also organic and chemical commercial controls were included. With growth inhibition data, analysis of variance, Tukey's test ( $P = 0.05$ ) and minimum inhibitory concentration ( $CI_{50}$ ) were done with the Probit procedure. Inhibition of mycelial growth was greater with extracts of *P. icosandra* and *T. lemmonii* than with those of the other species. At 80% concentration, the methanolic extract of *P. icosandra*, constituted of alkaloids and flavonoids, had an inhibition effect of 100% against *B. cinerea* ( $CI_{50} = 0.04\%$ ), 76% in *A. solani* ( $CI_{50} = 2.8\%$ ) And 61% in *F. oxysporum* ( $IC_{50} = 40\%$ ); While, with fungicide, the inhibition was 77, 61 and 81%, respectively and with the organic product inhibitions of 33, 63 and 70% respectively were achieved. The extract of *T. lemmonii*, composed of flavonoids and terpenoids, showed 100% inhibition effect against *B. cinerea* ( $CI_{50} = 19\%$ ), 62% in *A. solani* ( $CI_{50}$  34%) and 70% in *F. oxysporum* ( $CI_{50} = 48\%$ ).

**Keywords:** methanolic extracts, antifungal, phytochemical analysis.

## CONTENIDO

INTRODUCCION .....	1
1 OBJETIVOS .....	5
1.1 Objetivo general .....	5
1.2 Objetivos específicos .....	5
1.3 Hipótesis .....	5
2 MARCO DE REFERENCIA .....	6
2.1 Generalidades del cultivo de tomate .....	6
2.1.1 Origen .....	6
2.1.2 Importancia económica .....	6
2.1.3 Producción mundial .....	7
2.1.4 Producción nacional .....	7
2.1.5 Exportación .....	8
2.1.6 Producción de tomate orgánico en México .....	8
2.2 Manejo fitosanitario en la producción orgánica de tomate .....	9
2.3 Hongos fitopatógenos de importancia en tomate .....	10
2.3.1 Tizón temprano ( <i>Alternaria solani</i> ) .....	10
2.3.1.1 Generalidades de la enfermedad .....	10
2.3.1.2 Pérdidas por la enfermedad .....	11
2.3.1.3 Proceso de infección .....	11
2.3.1.4 Síntomas de la enfermedad .....	12
2.3.1.5 Control de la enfermedad .....	13
2.3.1.6 Empleo de extractos vegetales .....	14
2.3.2 Moho gris ( <i>Botrytis cinerea</i> ) .....	15
2.3.2.1 Generalidades de la enfermedad .....	15
2.3.2.2 Pérdidas por la enfermedad .....	15
2.3.2.3 Proceso de infección .....	16
2.3.2.4 Síntomas de la enfermedad .....	16
2.3.2.5 Control de la enfermedad .....	18
2.3.2.6 Empleo de extractos vegetales .....	19
2.3.3 Marchitez vascular ( <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> ) .....	20
2.3.3.1 Generalidades de la enfermedad .....	20
2.3.3.2 Pérdidas por la enfermedad .....	21
2.3.3.3 Proceso de infección .....	21

2.3.3.4	Síntomas de la enfermedad.....	23
2.3.3.5	Control de la enfermedad.....	24
2.3.3.6	Empleo de extractos vegetales .....	26
2.4	Extractos vegetales en la protección a enfermedades fungosas de los cultivos .....	27
2.4.1	<i>Argemone mexicana</i> L. ....	31
2.4.2	Descripción botánica .....	31
2.4.3	Importancia.....	31
2.4.3.1	Evaluación en microorganismos .....	31
2.4.4	<i>Croton xalapensis</i> Kunth .....	32
2.4.5	Descripción botánica .....	32
2.4.6	Importancia.....	32
2.4.6.1	Evaluación en microorganismos .....	33
2.4.7	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.....	33
2.4.8	Descripción botánica .....	33
2.4.9	Importancia.....	33
2.4.9.1	Evaluación en microorganismos .....	34
2.4.10	<i>Phytolacca icosandra</i> L. ....	34
2.4.11	Descripción botánica .....	34
Importancia .....		35
2.4.11.1	Evaluación en microorganismos.....	35
2.4.12	<i>Tagetes lemmonii</i> .....	36
2.4.13	Descripción botánica .....	36
2.4.14	Importancia.....	36
2.4.14.1	Evaluación en microorganismos.....	37
3	MATERIALES Y MÉTODOS .....	38
3.1	Recolección de material vegetal .....	38
3.1.1	Identificación taxonómica .....	38
3.2	Obtención de extractos vegetales.....	38
3.3	Aislamiento de hongos fitopatógenos .....	39
3.4	Identificación morfológica de los hongos fitopatógenos.....	40
3.5	Evaluación antifúngica de los extractos <i>in vitro</i> .....	40
3.6	Diseño de tratamientos .....	41
3.7	Diseño experimental .....	41
3.8	Variables evaluadas.....	41

3.9	Análisis estadístico .....	42
3.10	Análisis fitoquímico de los extractos .....	42
3.10.1	Flavonoides .....	42
3.10.2	Terpenoides .....	43
3.10.3	Alcaloides .....	43
4	RESULTADOS .....	44
4.1	Identificación taxonómica del material vegetal.....	44
4.2	Obtención de extractos vegetales.....	45
4.3	Aislamiento e identificación de los hongos fitopatógenos .....	45
4.4	Actividad biológica <i>in vitro</i> de extractos metanólicos contra <i>Alternaria solani</i> , <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> .....	47
4.4.1	Análisis combinado. ....	47
4.4.2	Efecto de los tratamientos en la inhibición del micelio de <i>A. solani</i> .....	48
4.4.2.1	Concentración inhibitoria media (CI <sub>50</sub> ) de los extractos metanólicos de <i>P. icosandra</i> y <i>T. lemmonii</i> evaluados contra <i>A. solani</i> ..	52
4.4.3	Efecto de los tratamientos sobre la inhibición del micelio de <i>B. cinerea</i> .....	52
4.4.3.1	Concentración inhibitoria media (CI <sub>50</sub> ) de los extractos metanólicos de <i>P. icosandra</i> y <i>T. lemmonii</i> evaluados contra <i>B. cinerea</i> .....	55
4.4.4	Efecto de los tratamientos sobre la inhibición del micelio de <i>F. oxysporum</i> .....	56
4.4.4.1	Concentración inhibitoria media (CI <sub>50</sub> ) de los extractos metanólicos de <i>P. icosandra</i> y <i>T. lemmonii</i> evaluados contra <i>F. oxysporum</i> .....	59
4.5	Análisis fitoquímico .....	59
5	DISCUSIÓN .....	60
6	CONCLUSIONES.....	70
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71

## INDICE DE FIGURAS

No.	Figura	Página
1	Desarrollo y síntomas de la enfermedad causada por <i>Alternaria</i> en tomate.	12
2	Síntomas de <i>Alternaria solani</i> en hojas de tomate.	13
3	Desarrollo de las enfermedades producidas por moho gris <i>Botrytis</i> .	17
4	Moho gris y cancro en tallo de tomate.	17
5	Ciclo patológico de la marchitez vascular del tomate ocasionada por <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> .	23
6	Tejidos vasculares obstruidos y descoloridos en corte longitudinal del tallo de tomate infectado con <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> .	24
7	Identificación taxonómica de <i>Argemone mexicana</i> L. (A), <i>Croton xalapensis</i> G.L. Webster (B), <i>Foeniculum vulgare</i> L. (C), <i>Phytolacca icosandra</i> L. (D), <i>Tagetes lemmonii</i> A. Grey (E).	44
8	Crecimiento de <i>A. solani</i> en PDA, conidióforo y conidio de <i>A. solani</i> (A), crecimiento de <i>B. cinerea</i> en PDA, conidióforo y conidios de <i>B. cinerea</i> (B), crecimiento de <i>F. oxysporum</i> en PDA, microconidios de <i>F. oxysporum</i> (C).	46
9	Efecto de los extractos metanólicos de <i>P. icosandra</i> sobre <i>A. solani</i> en medio de cultivo PDA a las 144 horas de crecimiento (a: 80%, b: 60%, c: 40%, d: 20%), e: extracto de gobernadora, f: pirimetanil, g: testigo absoluto.	50
10	Efecto de los extractos metanólicos de <i>T. lemmonii</i> sobre <i>A. solani</i> en medio de cultivo PDA a las 144 horas de crecimiento (a: 80%, b: 60%, c: 40%, d: 20%), e: extracto de gobernadora, f: pirimetanil, g: testigo absoluto.	50
11	Efecto de los extractos metanólicos de plantas sobre el crecimiento micelial (mm) de <i>A. solani</i> . Barras con las mismas letras indican que las medias no fueron estadísticamente diferentes, usando la prueba de Tukey al 5 % de significancia.	51
12	Efecto de los extractos metanólicos de <i>P. icosandra</i> sobre <i>B. cinerea</i> en medio de cultivo PDA a las 144 horas de crecimiento (a: 80%, b: 60%, c: 40%, d: 20%), e: extracto de gobernadora, f: fenhexamid, g: testigo absoluto.	53

- 13 Efecto de los extractos metanólicos de *T. lemmonii* sobre *B. cinerea* en medio de cultivo PDA a las 144 horas de crecimiento (a: 80%, b: 60%, c: 40%, d: 20%), e: extracto de gobernadora, f: fenhexamid, g: testigo absoluto. 54
- 14 Efecto de los extractos metanólicos de plantas sobre el crecimiento micelial (mm) de *B. cinerea*. Barras con las mismas letras indican que las medias no fueron estadísticamente diferentes, usando la prueba de Tukey al 5 % de significancia. 55
- 15 Efecto de los extractos metanólicos de *P. icosandra* sobre *F. oxysporum* en medio de cultivo PDA a las 144 horas de crecimiento (a: 80%, b: 60%, c: 40%, d: 20%), e: extracto de gobernadora, f: tiofanato metílico, g: testigo absoluto. 57
- 16 Efecto de los extractos metanólicos de *T. lemmonii* sobre *F. oxysporum* en medio de cultivo PDA a las 144 horas de crecimiento (a: 80%, b: 60%, c: 40%, d: 20%), e: extracto de gobernadora, f: tiofanato metílico, g: testigo absoluto. 58
- 17 Efecto de los extractos metanólicos de plantas sobre el crecimiento micelial (mm) de *B. cinerea*. Barras con las mismas letras indican que las medias no fueron estadísticamente diferentes, usando la prueba de Tukey al 5 % de significancia. 58

## INDICE DE CUADROS

No.	Cuadro	Página
1	Países productores de tomate en 2015.	7
2	Estados productores de tomate en México en 2015.	8
3	Coordenadas geográficas de los sitios de recolecta y tipo de tejido de las especies vegetales utilizadas para los extractos.	39
4	Diseño de tratamientos para <i>A. solani</i> , <i>B. cinerea</i> y <i>F. oxysporum</i> .	41
5	Rendimiento de los extractos metanólicos.	45
6	Análisis combinado a través de los patógenos, muestreos y tratamientos sobre el porcentaje de crecimiento y porcentaje de inhibición	48
7	Concentración Inhibitoria Media para los extractos metanólicos de <i>P. icosandra</i> y <i>T. lemmonii</i> sobre el crecimiento de <i>A. solani</i> .	49
8	Concentración Inhibitoria Media para los extractos metanólicos de <i>P. icosandra</i> y <i>T. lemmonii</i> en el crecimiento de <i>A. solani</i> .	52
9	Comparaciones de medias del porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos sobre <i>B. cinerea</i> .	52
10	Concentración Inhibitoria Media para los extractos metanólicos de <i>P. icosandra</i> y <i>T. lemmonii</i> en el crecimiento de <i>B. cinerea</i> .	55
11	Comparaciones de medias del porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos sobre <i>F. oxysporum</i> .	56
12	Concentración Inhibitoria Media para los extractos metanólicos de <i>P. icosandra</i> y <i>T. lemmonii</i> en el crecimiento de <i>F. oxysporum</i> .	59
13	Metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos de las especies vegetales evaluadas.	59
14	Valores para la aplicación práctica de los extractos metanólicos en campo.	68

## INTRODUCCION

En el año 2015, para México se reporta una producción de tomate de 3 098 329.41 toneladas y el estado de Sinaloa con el primer lugar en producción con 849 341.95 T; En segundo lugar, Michoacán con 223 677.84 T y otros no menos importantes como San Luis Potosí, Baja California y Jalisco (SIAP, 2016).

Los problemas fitosanitarios son la principal limitante del cultivo de tomate en las zonas productoras de México, tanto en producción convencional como orgánica. Por su importancia económica, destacan las enfermedades fungosas, las cuales afectan ramas, peciolo, hojas, tallos y frutos, causando una disminución considerable de la producción. (Jones *et al.*, 2001).

El tizón temprano inducido por *Alternaria solani* es un hongo que afecta el follaje del tomate en invernadero y campo abierto, el 79 % de las pérdidas en este cultivo se deben a este devastador patógeno (Leiminger *et al.*, 2014). *Botrytis cinerea* es causante del moho gris y puede infectar hojas, tallos, flores, frutos y se han reportado pérdidas en la producción que van del 20 al 50 % cuando las condiciones de humedad relativa son altas y temperaturas bajas, principalmente en invernadero (Ji *et al.*, 2012). Otra enfermedad muy agresiva en todas las regiones productoras de tomate es la marchitez vascular ocasionada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, la cual tiene su origen en el suelo, es un factor limitante para la producción, ocasionando pérdidas en el rendimiento del 45 al 50 % (Ramybharathi *et al.*, 2012; Fasio *et al.*, 2003).

El control químico de estos patógenos permite el aumento de la productividad y calidad de la cosecha, pero no es apropiado, ya que su uso indiscriminado no solo ha puesto en situación de riesgo a la salud humana y animal, también amenaza al ambiente por las sustancias contaminantes de difícil degradación (Kumar *et al.*, 2007). En un intento de modificar esta condición, se han adoptado métodos alternativos de control., entre ellos, el uso de extractos de

plantas como fuente natural de sustancias antimicrobianas, consideradas como seguras y que se pueden degradar por los microorganismos del suelo, además, no representan problema alguno a la salud o al ambiente en cualquier concentración que se utilicen (Yang *et al.*, 2010).

En diferentes estudios fitoquímicos se han determinado grupos de compuestos involucrados en el efecto antifúngico en varias especies de plantas como es el caso de saponinas, alcaloides, aceites esenciales, entre otros metabolitos secundarios (Montes-Belmont *et al.*, 2000), estas sustancias han evolucionado para proteger a las plantas del ataque de patógenos (Benner, 1993). Numerosos estudios en laboratorio, invernadero y campo han demostrado el potencial de extractos de plantas para el control de plagas y enfermedades en la agricultura por lo que es promisoría su inclusión en programas de manejo integrado de plagas. La realización de estudios que permitan extraer, conocer su fitoquímica y evaluar extractos nuevos de diferentes plantas que no se hayan evaluado con anterioridad es de gran importancia para generar opciones prometedoras en el manejo orgánico de los principales patógenos del tomate.

Los extractos vegetales se han definido como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua metanol, etanol, hexano, cloroformo y éter dietílico (Castillo *et al.*, 2010).

Se ha evaluado el efecto de extractos metanólicos de diferentes especies de plantas para inhibir el crecimiento micelial de *A. solani*. Jabeen *et al.* (2014) reportaron que el extracto metanólico de hoja de *Melia azedarach* a 5 % tiene una fuerte actividad antifúngica, retardando el crecimiento del diámetro de la colonia en un 90 %. También, Singh *et al.* (2010) encuentran que el extracto metanólico crudo de *Acorus calamus* y *Celestrus paniculatus* a 5 000  $\mu\text{g ml}^{-1}$  fueron altamente eficaces contra este patógeno.

Para *B. cinerea* los extractos obtenidos con metanol han presentado actividad biológica. Bahraminejad *et al.* (2015) con extractos metanólicos crudos de 43

especies de plantas pertenecientes a 27 familias encontraron que los extractos de hojas de *Allium hirtifolium*, *Haplophylum perforatum* y el extracto de inflorescencias de *A. hirtifolium* y *Dodonaea viscosa* tienen mayor efecto inhibitorio ( $\geq 50\%$ ) contra este hongo.

El extracto metanólico de raíz y hoja de rábano al 6 % mostró mayor actividad antifúngica reduciendo 39 y 52 % respectivamente, el crecimiento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, por lo que, esta especie podría ser explotada para el manejo de la marchitez vascular en tomate (Javaid y Bashir, 2015).

Los extractos de hoja de *Argemone mexicana* han sido reportados con actividad fungitóxica contra hongos patógenos de frutas como es *Alternaria alternata*, *Dreschlera halodes*, *Helminthosporium speciferum* y *Curvularia tuberculata* (Srivastava y Srivastava, 1998), pero no del extracto metanólico para *A. solani*, *B. cinerea* y *F. oxysporum*. Esta planta es fuente de una gran diversidad de compuestos químicos que incluyen alcaloides, terpenoides, esteroides, carbohidratos, alcoholes alifáticos de cadena larga y ácidos carboxílicos, aminoácidos, flavonoides y otros compuestos fenólicos que pueden brindar actividad antifúngica (Brahmachari *et al.*, 2013).

Algunos extractos de especies del género *Croton* han manifestado actividad en hongos. Gurgel *et al.* (2005) reportan el efecto antifúngico *in vitro* de *Croton urucrana* en hongos dermatofitos. La actividad biológica de extractos metanólicos de especies de este género en hongos fitopatógenos como *A. solani*, *B. cinerea* y *F. oxysporum* es muy poco reportada, por lo que surgen como objeto de estudio ya que se sabe que en estas plantas se han identificado esteroides, alcaloides, flavonoides, cumarinas y una gran variedad estructural de diterpenos mediante resonancia magnética (Junior *et al.*, 2006).

Los resultados del efecto del aceite esencial de *Foeniculum vulgare* indican que poseen capacidad antimicótica al reducir el crecimiento micelial y germinación de esporas de diferentes hongos fitopatógenos como *Sclerotinia sclerotium*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Fusarium graminearum* y *F. miniliforme* (Soylu *et al.*,

2007). Esta especie es rica en monoterpenos, fenoles y glucósidos fenólicos. Sin embargo, el efecto que puedan tener los extractos metanólicos de esta especie para otros hongos podría ser diferente, así como su composición química.

El extracto hexánico y metanólico de *Phytolacca icosandra* tiene efecto en hongos fitopatógenos de importancia económica, principalmente para *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. fructicola* respectivamente. Inclusive para hongos patógenos de humanos, pero no se sabe su efecto en otros hongos fitopatógenos importantes como *A. solani*, *B. cinerea* y *F. oxysporum*. Estas plantas son ricas en metabolitos secundarios como terpenoides, flavonoides, esteroides, cumarinas, ligninas y saponinas (Williams *et al.*, 2002).

Algunas especies de *Tagetes* tiene actividad antifúngica sobre hongos de importancia agrícola. Principalmente, se le ha atribuido a la presencia de monoterpenos en el aceite esencial de diferentes especies, pero es poco informada la actividad de otros extractos en hongos. Para *T. lemmonii* es poca la información sobre su actividad biológica y solo se conocen los monoterpenos presentes en el aceite esencial.

La actividad antimicrobiana de los extractos vegetales depende en gran medida a diferentes factores como: la familia de la planta de interés, el género, la especie, condiciones abióticas del área de colecta, la polaridad del solvente de extracción, las concentraciones a probar y los microorganismos usados (Mohammadhosseini *et al.*, 2017). Un aspecto metodológico necesario en la evaluación de la actividad biológica de extractos, debe ser la verificación al menos de los grupos químicos importantes, sobre todo cuando se trata de recursos naturales locales.

Con base en lo anterior se realizó la presente investigación con los siguientes:

# 1 OBJETIVOS

## 1.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica de extractos metanólicos de hoja de *Argemone mexicana*, *Croton xalapensis*, *Phytolacca icosandra* y *Tagetes lemmoni* mediante bioensayos *in vitro* para inhibir el crecimiento micelial de *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*.

## 1.2 Objetivos específicos

- Determinar cualitativamente la presencia de terpenoides, flavonoides y alcaloides por cromatografía en capa fina en los extractos evaluados.
- Evaluar la actividad antifúngica de los extractos de hoja *in vitro* para el control de *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*.

## 1.3 Hipótesis

- Los extractos metanólicos de las especies estudiadas poseen actividad antifúngica diferente contra el crecimiento micelial de *A. solani*, *B. cinerea* y *F. oxysporum*.

## **2 MARCO DE REFERENCIA**

### **2.1 Generalidades del cultivo de tomate**

#### **2.1.1 Origen**

El tomate (*Solanum lycopersicum L.*), tiene su centro de origen en una región de los Andes en Perú, Ecuador y Chile (Jones, 2001). La domesticación de la especie parece ser que ocurrió fuera de su centro de origen, y la realizaron los primeros pobladores de México. A partir de 1900, se extendió el cultivo como alimento humano en todo el mundo y actualmente ocupa un lugar importante entre las hortalizas. Además, es una importante materia prima para la industria de la transformación (FAO, 2002).

#### **2.1.2 Importancia económica**

SAGARPA (2010) señala que el tomate es la hortaliza de mayor importancia en todo el mundo y la de mayor valor económico, su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. El incremento anual de la producción en los últimos años se debe principalmente al aumento en el rendimiento y en menor proporción al aumento de la superficie cultivada. Las actividades agronómicas y la comercialización del tomate rojo generan 72 mil empleos directos y alrededor de 10.7 millones de empleos indirectos. El valor de la producción de esta hortaliza es de 12 mil 700 millones de pesos. La situación geográfica de México y la utilización de tecnologías permiten la explotación en dos ciclos agrícolas: otoño-invierno donde se produce el 55 %, y el resto en primavera-verano; en zonas de riego se produce el 85 % y el 25 % en áreas de temporal, del total de la producción anual respectivamente (Ríos *et al.*, 2003).

### 2.1.3 Producción mundial

Los países que ocuparon el primer lugar en producción de tomate a nivel mundial fueron China, India y Estados Unidos de América, México ocupó el décimo lugar de esta lista (Cuadro 1) (FAO, 2015).

Cuadro 1. Países productores de tomate en 2015.

Posición	País	Producción (Ton)	Valor unitario (\$/Ton)
1	China	50 552 200	18 682 273.24
2	India	18 227 000	6 736 043.03
3	Estados Unidos de América	12 574 550	4 647 101.00
4	Turquía	11 820 000	3 712 971.76
5	Egipto	8 533 803	3 153 786.37

Fuente: FAO, 2015.

### 2.1.4 Producción nacional

En México se produce tomate todo el año y en 2015 hubo una producción total de 3 098 329.41 toneladas. Durante los primeros meses del año es cuando se genera el tope de producción nacional en el Estado de Sinaloa (Cuadro 2), que abastece al mercado nacional y la mitad del norteamericano. Por otro lado, durante el verano, la producción de los estados del centro, occidente y Baja California son los que abastecen la demanda interna y de exportación. Finalmente, en los meses de agosto a diciembre son otras entidades las que cubren la producción (SIAP, 2016).

Cuadro 2. Estados productores de tomate en México en 2015.

Estado	Producción (t)	Superficie cosechada (ha)
Sinaloa	849,341.95	12,833.08
Michoacán	223,677.84	6,960.30
San Luis Potosí	221,561.27	2,349.45
Baja California	220,847.72	2,821.50
Jalisco	161,804.59	2,216.43

Fuente: SIAP, 2016.

### 2.1.5 Exportación

El tomate es el principal producto agroalimentario de exportación en México con un valor promedio anual de 899 millones de dólares en el periodo 2000-2009; Norteamérica es su principal mercado con el 95 % (Estados Unidos y Canadá). La oferta de tomate es grande y diversificada ya que, en toda la región de Norteamérica, se comercializan variedades producidas a cielo abierto, casa sombra e invernaderos; los tomates cultivados tradicionalmente en suelo, hidroponía y orgánicos son los de mayor presencia en el mercado (SAGARPA, 2014).

### 2.1.6 Producción de tomate orgánico en México

Los cultivos orgánicos crecen un 22 % al año en México, durante la última década, la agricultura orgánica ha mostrado ser una alternativa muy prometedora para el campo mexicano, al pasar de 21 265 a 512, 246 hectáreas sembradas, con una producción de alrededor de 750 000 toneladas al año. La producción de estos productos en México aún es incipiente, con crecimientos anuales del 22% en promedio durante los últimos cinco años; el reto es que al cierre de cada año se logre por lo menos el 32 %. Actualmente, el 85 % de la producción orgánica de México se destina a la exportación, principalmente a los mercados europeos y estadounidenses, lo que representa un valor económico superior a 600 millones de dólares; mientras que, en el mercado nacional, que

se estima en un valor de 1 174 millones de pesos, se registra un crecimiento del 10 por ciento anual en la demanda de este tipo de alimentos certificados (Linares, 2014).

El Consejo Nacional de Producción Orgánica (CNPO) en México reporta que los ingresos en divisas por las exportaciones de productos orgánicos son de alrededor de 400 millones de dólares promedio anual. Dada la importancia que tiene el sector orgánico en México, se expidió el 7 de febrero de 2006 la Ley de Productos Orgánicos (LPO) y el 1 de abril de 2010 el Reglamento de la Ley con el fin de reglamentar los sistemas de producción orgánica e impulsar comercialmente tanto a nivel nacional como internacional los productos orgánicos en México (CNPO, 2016).

La producción orgánica intensiva de tomate en nuestro país se lleva a cabo en Baja California Sur y algunas regiones de Sinaloa y Sonora, con rendimientos bajos, por lo que es conveniente producir en invernadero, buscando rendimientos mucho más elevados con la aplicación de insumos orgánicos para garantizar la obtención de un producto orgánico e inocuo (Cano, 2004).

## **2.2 Manejo fitosanitario en la producción orgánica de tomate**

La producción de cultivos orgánicos se caracteriza parcialmente por la ausencia de plaguicidas y fertilizantes sintéticos, debido a que las prácticas de manejo promueven la salud del ecosistema. Las prácticas en la agricultura orgánica se rigen por normas formuladas por la Federación Internacional de Movimientos de Agricultura Orgánica (IFOAM) y reguladas por organismos de certificación nacionales. Los objetivos de las normas de la IFOAM para el manejo de plagas y enfermedades se basan en trabajar en el manejo integrado de estas en lugar de eliminarlos, fomentar y mejorar los ciclos biológicos dentro del sistema agrícola, evitar la contaminación procedente de la agricultura convencional, mantener la diversidad genética del sistema agrícola y su entorno y considerar el impacto social y ecológico del sistema agrícola. Se hace hincapié en la prevención de los problemas fitosanitarios (USDA, 2011).

Los extractos de muchas especies de plantas pueden ser tóxicas para patógenos y plagas de las plantas, algunos se permiten bajo directrices orgánicas. Varios extractos de plantas han sido formulados para su uso contra insectos. Por ejemplo, los extractos de yuca y de cítricos están en la lista OMRI (Instituto de Revisión de Materiales Orgánicos) como productos comerciales para la agricultura orgánica. Estos insecticidas naturales son frecuentemente aprobados para usarse en la producción orgánica, pero pueden tener efectos secundarios sobre insectos benéficos como abejas y depredadores de insectos plaga (Leteourneau y Bruggen, 2006). Los mecanismos de acción de estos extractos no suelen estar claros, pero sí logran tener un efecto directo sobre las plagas y patógenos, o a través de la resistencia inducida en las plantas. A pesar de que los extractos de plantas y agentes microbianos pueden ser eficaces en comparación de no aplicar algún tratamiento, estos son frecuentemente menos eficaces que los fungicidas sintéticos, por lo que, el manejo fitosanitario de los cultivos debe tener un enfoque integrado (Van Bruggen, 1995).

### **2.3 Hongos fitopatógenos de importancia en tomate**

Los problemas de más importancia que se presentan en el desarrollo del cultivo de tomate es el ataque de plagas y enfermedades altamente dañinas, afectando de manera significativa la producción y calidad de los frutos (Jiménez, 2014).

#### **2.3.1 Tizón temprano (*Alternaria solani*)**

##### **2.3.1.1 Generalidades de la enfermedad**

El género *Alternaria* es muy común en un gran número de especies vegetales causando daños en pre y poscosecha de productos agrícolas, incluyendo cereales, frutales y hortalizas. En tomate (*Solanum lycopersicum*) y en papa (*Solanum tuberosum*), *A. solani* es causante de la enfermedad conocida como tizón temprano y es de las más importantes y frecuentes de estos cultivos en el mundo y el poder destructivo de la enfermedad es considerable; ataca hojas y tallos donde con el tiempo puede llegar a causar defoliación de las plantas reduciendo el rendimiento y calidad de la fruta (Chaerani *et al.*, 2007). La

susceptibilidad a tizón temprano se asocia generalmente con el tejido maduro y es más común durante la fase de fructificación llegando a ocurrir graves epidemias, dado que las hojas más viejas y senescentes son más susceptibles (Maiero *et al.*, 1990).

### **2.3.1.2 Pérdidas por la enfermedad**

El tizón temprano es una de las enfermedades más catastróficas que causan fuertes pérdidas económicas en el cultivo de tomate en el mundo (Mathur y Shekhawat, 1986). Cerca del 79 % de las pérdidas en este cultivo se deben a esta devastadora enfermedad, ya que el hongo posee una gran diversidad de hospedantes, patogenicidad, propiedades físico-químicas y relaciones epidemiológicas (Leiminger *et al.*, 2014). Desde hace varias décadas se ha estudiado el impacto que ocasiona el ataque de tizón temprano en tomate, y en un experimento realizado por Basu (1974) en pruebas de campo encontró que es necesario un 60 % de defoliación para obtener 10 % de frutos infectados y la reducción del rendimiento varía del 10 al 34 % con una pérdida que va del 13 al 37 % en la calidad debido a la fruta manchada. Aunado a lo anterior, es necesario gastar en aplicaciones de fungicidas, lo que se traduce en pérdida económica para el agricultor y de acuerdo con Lopes y Santos (1994), esto representa el 30 % del costo de producción. Una encuesta realizada en Brasil en la zona productora de tomate del Estado de Minas Gerais señaló que la incidencia del tizón temprano fue del 88 % y se tuvieron que realizar 18 aplicaciones de fungicidas durante el ciclo del cultivo para controlar la enfermedad (Vale *et al.*, 1992).

### **2.3.1.3 Proceso de infección**

El hongo puede sobrevivir en el suelo, residuos de cultivo, malezas, semillas y es dispersado con la ayuda del viento, agua, insectos, trabajadores y maquinaria agrícola (Jiménez, 2014). Es probable que la infección primaria sea causada por el hongo que está en el suelo, contribuyendo a ella los días lluviosos o húmedos y la temperatura ambiental de 24 °C. Los conidios

germinan a un óptimo de entre 28 y 30 °C con alta humedad relativa. El hongo produce ácido alternárico, toxina causante de la clorosis alrededor de la mancha necrótica (Tlapal, 2010). Su ciclo biológico se muestra en la Figura 1.

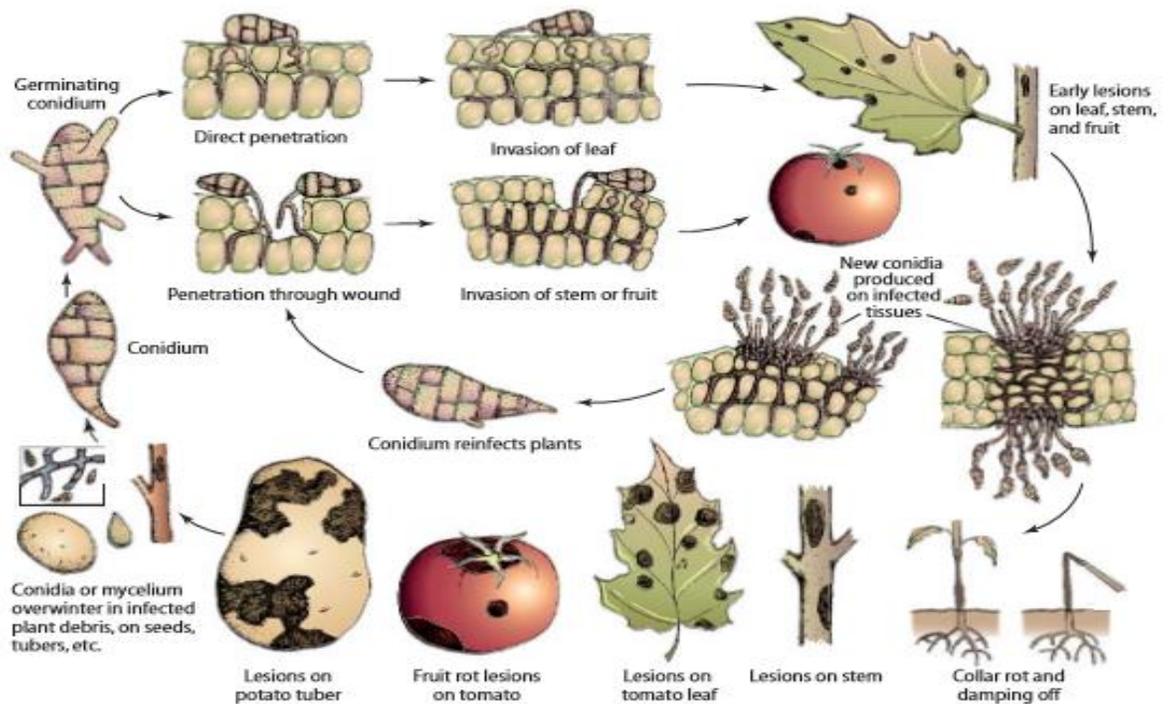


Figura 1. Desarrollo y síntomas de la enfermedad causada por *Alternaria* en tomate.

#### 2.3.1.4 Síntomas de la enfermedad

La enfermedad aparece en hojas, tallos, peciolos, ramas y frutas, bajo condiciones favorables causa defoliación, secado de ramas y caída prematura de frutos lo que ocasiona pérdidas del 35 al 78 % en el rendimiento (Datar y Mayee, 1982). En tomate las lesiones en hojas se presentan como manchas en forma de anillos concéntricos de color oscuro y hundidos que luego se tornan de una consistencia parecida al papel (Figura 2), estas lesiones se agrandan, se unen y causan la muerte de la hoja (Pseheidt, 1985).



Fig. 2. Síntomas de *Alternaria solani* en hojas de tomate.

#### **2.3.1.5 Control de la enfermedad**

Como una primera medida de control de la enfermedad, se recomienda usar materiales tolerantes o resistentes al patógeno dentro de un manejo integrado de enfermedades, sin embargo, no hay una variedad de tomate disponible con niveles aceptables de resistencia a tizón temprano (Grigolli *et al.*, 2011). El método de control usualmente es la aplicación de múltiples fungicidas de contacto y sistémicos de diferentes grupos químicos como los carbamatos (Mancozeb y Maneb), Ftalonitrilos (Clorotalonil), Estrobilurinas (Azoxistrobin y Piraclostrobin) y Carboxamidas (Boscalid). El Pirimetanil quizá es el fungicida más usado para el control de *A. solani* ya que actúa bloqueando la excreción de las enzimas hidrolíticas implicadas en la patogénesis y de una inhibición de la biosíntesis de metionina y otros aminoácidos en las células fúngicas (Leroux y Gredt, 1996). Sin embargo, hay un alto riesgo de que las poblaciones de *Alternaria* generen resistencia a fungicidas (Pasche *et al.*, 2004). Por esta razón, el uso de fungicidas no se considera una solución a largo plazo, además de presentar riesgos de exposición a residuos y peligros ambientales. En un intento por modificar estas condiciones se han adoptado algunos métodos alternativos de control (Latha *et al.*, 2009).

### 2.3.1.6 Empleo de extractos vegetales

Diversos estudios han demostrado que los extractos de plantas controlan *in vitro* e *in vivo* de manera eficaz el desarrollo de *A. solani*. Ravikumar y Garampalli (2013) usan extractos acuosos de 39 plantas de la India, de estos solo 13 reducen significativamente el crecimiento micelial del patógeno, reportan una tasa de inhibición superior al 20 % en siete extractos a la concentración de 4 %, los cuales son: *Crotalaria trichotoma* (36.6 %), *Citrus aurantifolia* (27.3 %), *Azadirachta indica* (23.7 %), *Polyalthia longifolia* (23.3 %), *Datura metel* (21.3 %), *Muntingia calabura* (20.09 %) y *Oxalis latifolia* (20.09 %). A concentración de 2 %, seis extractos muestran una inhibición significativa del crecimiento: *C. trichotoma* (16.6 %), *A. indica* (10 %), *Capsicum annum* (7.1 %), *D. metel* (6.6 %), *P. longifolia* (6.3 %) y *C. aurantifolia* (5.5 %).

En otro estudio, se examinó el potencial antifúngico *in vitro* de tres plantas medicinales silvestres, que son *Acacia nilotica*, *Achillea fragrantissima* y *Calotropis procera*. Los extractos acuosos y etanólicos de todas las plantas reducen el crecimiento micelial y la germinación de conidios, sin embargo, los extractos etanólicos son más eficaces y dentro de estos el extracto de *C. procera* exhibe más potencial antifúngico. Al observar por microscopía electrónica de barrido, hay alteraciones en la morfología y estructura del patógeno cuando fue sometido al extracto etanólico de *C. procera* a una concentración de 20 % (Baka y Rashad, 2016).

El extracto foliar de *Allium cepa* muestra la mayor inhibición del crecimiento micelial (87 %) de *A. solani in vitro*. El ensayo *in vivo* indica que el extracto de *A. cepa* en mezcla con *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis* reduce la incidencia del tizón temprano, además incrementa la acumulación de enzimas de defensa en las plantas de tomate tratadas con esta mezcla, en comparación con el control (Latha *et al.*, 2009).

## **2.3.2 Moho gris (*Botrytis cinerea*)**

### **2.3.2.1 Generalidades de la enfermedad**

*Botrytis* se refiere a un grupo de especies de hongos que infectan una gran variedad de cultivos agrícolas como hortalizas, ornamentales, frutales, granos, bulbos, fibras y oleaginosas, no solo en campo y en invernadero, si no también durante el almacenamiento y traslado (Jackson, 2014). Es el patógeno que induce una de las enfermedades más comunes y ampliamente distribuidas en todo el mundo y aparecen principalmente en forma de tizones de inflorescencias y pudriciones del fruto. Bajo condiciones húmedas, el hongo produce una capa fructífera conspicua de moho gris sobre los tejidos infectados, una característica de las enfermedades por *Botrytis* (Agrios, 2005). En el cultivo de tomate, *B. cinerea* es causante de la enfermedad conocida como moho gris y es una amenaza grave y constante tanto en campo abierto como invernadero en muchos países del mundo, el agente causal infecta hojas, tallos, flores y frutos, ya sea por penetración directa o por heridas causadas en prácticas del cultivo, la infección es estimulada por alta humedad relativa y bajas temperaturas (Williamson *et al.*, 2007).

### **2.3.2.2 Pérdidas por la enfermedad**

Las pérdidas económicas causadas por *B. cinerea* en productos agrícolas pueden ser graves, ya que el hongo provoca importantes enfermedades en pre y post cosecha de muchos cultivos, lo que da como resultado pérdidas económicas anuales de 10 a 100 billones de dólares en Estados Unidos de América y el mundo, lo que lleva a una inestabilidad en el suministro de alimentos (You *et al.*, 2016). Al respecto, Ji *et al.*, (2012) reportan pérdidas en rendimiento de fruta de tomate del 20-50 % en China antes de la cosecha debido a la infección por *B. cinerea*. La merma económica no solo está relacionada con la disminución del rendimiento, sino también por el gasto que se genera para el control de la enfermedad, de acuerdo a Dean *et al.*, (2012), alcanzó hasta aproximadamente 1.5 mil millones de dólares por año.

### **2.3.2.3 Proceso de infección**

*B. cinerea* sobrevive como micelio en residuos de plantas o como esclerocio en el suelo (Figura 3), en las principales áreas puede persistir a través del año sobre alguno de sus múltiples hospedantes alternos. Es un fuerte competidor saprofítico, coloniza y esporula sobre tejido senescente y muerto de muchas especies de plantas. Los conidios son dispersados por el viento, pero también pueden ser diseminados por el salpique del agua de lluvia. El inóculo primario son los conidios, en la mayoría de los casos, pero los esclerocios juegan su papel al germinar como micelio, el cual puede infectar directamente. El papel de las ascosporas, si las hay es desconocido en el ciclo de la enfermedad. Las temperaturas de 18 a 32 °C y humedades relativas de 90-95 % son ideales para el crecimiento, esporulación, liberación de esporas y germinación de conidios (Tlapal, 2010).

### **2.3.2.4 Síntomas de la enfermedad**

El hongo puede infectar todas las partes de la planta de tomate, pero la infección en tallos en variedades de crecimiento indeterminado de ciclo largo puede ser altamente perjudicial. El patógeno invade los tallos a través de heridas resultantes en la poda y durante la cosecha (Figura 4), y este inóculo llega hasta flores y frutos jóvenes, lo que luego conduce a caída prematura de estos órganos. En frutos inmaduros provoca un síntoma que se conoce como mancha fantasma que se piensa es causada por la germinación de esporas del hongo, en frutos maduros a menudo causa pudrición lo que afecta adversamente la comercialización (O'Neill *et al.*, 1997).

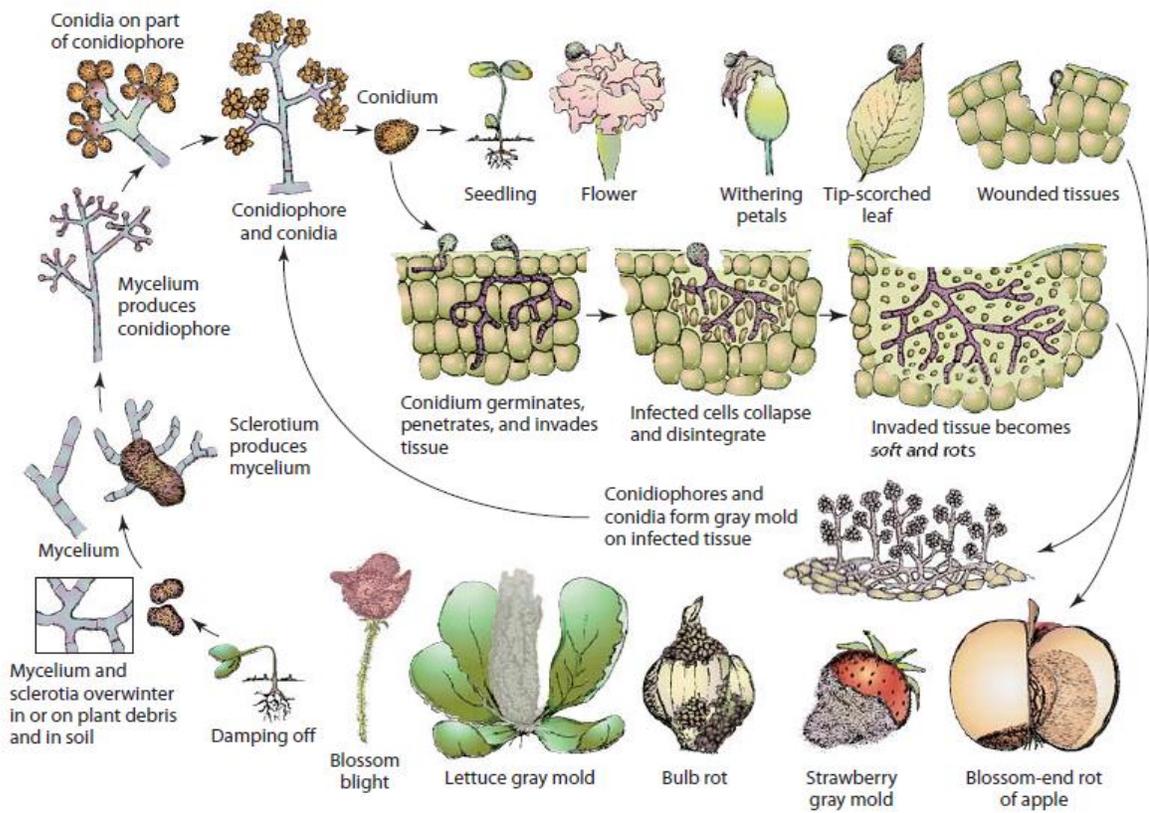


Fig. 3. Desarrollo de las enfermedades producidas por mohos gris *Botrytis*.



Fig. 4. Moho gris y cancro en tallo de tomate.

### 2.3.2.5 Control de la enfermedad

En todo el mundo, *Botrytis* es probablemente el patógeno más difícil de controlar, no existe resistencia varietal a este hongo, aunque la edad fisiológica de los tejidos es un factor importante que determina la incidencia y gravedad de la infección y las variedades parecen diferir en susceptibilidad (Dik y Wubben, 2007). La mejor práctica actual dentro de un manejo integrado de la enfermedad es mediante la manipulación de las condiciones ambientales, sin embargo, el control de la enfermedad se logra generalmente mediante el uso de fungicidas sintéticos. Jackson (2014) menciona que la alta producción de esporas y su capacidad para ser dispersadas a largas distancias hacen que el hongo prolifere rápidamente, lo que lleva a realizar al menos una aplicación de fungicidas por semana. Desde los años 90's se han usado fungicidas sistémicos de diferentes grupos como los benzimidazoles (Carbendazim), dicarboxamidas (Procimidona) y N-fenilcarbamatos (Diethofencarb) en rotación con fungicidas de contacto tales como Clorotalonil y Captan (Leroux *et al.*, 2007). Con el desarrollo de fungicidas sistémicos más selectivos, hay una tendencia a sustituir estos compuestos. Ejemplos eficaces contra *Botrytis* incluyen dicarboxamidas (Iprodiona, Procimidona, Vinclozolina); anilino pirimidinas (Ciprodinil, Mepanipirim, Pirimetanil); hidrocarburos aromáticos (Dicloran), fenilpirroles (Fludioxonil) e hidroxianilidas (Fenhexamida) (Jackson, 2014), este último grupo es de los más usados para las enfermedades causadas por *Botrytis* ya que suprime la biosíntesis de ergosterol en los hongos (Debieu *et al.*, 2001). En los últimos años, la resistencia a fungicidas ha sido frecuentemente reportada en *B. cinerea*, lo cual es motivo de gran preocupación debido a la alta variabilidad genética, el ciclo de vida corto y la prolífica reproducción del patógeno (Malandrakis *et al.*, 2011). La resistencia a carbendazim y a diethofencarb en *B. cinerea* ha sido reportada frecuentemente y está asociada con mutaciones puntuales en el codón 198 o 200 en el gen de la  $\beta$ -tubulina (Ma y Michailides, 2005). Los fungicidas del grupo de las dicarboxamidas han sido los más usados para el control de moho gris durante muchos años y en diversos países han surgido poblaciones resistentes

a estos compuestos. Ma *et al* (2007) consignan que la resistencia a estos fungicidas está relacionada con el gen *Bos1* de la histidina quinasa, dos componentes importantes en *B. cinerea*. Esta característica negativa de los fungicidas sintéticos, además de los efectos adversos en el medio ambiente, ha provocado la necesidad de desarrollar nuevas alternativas de control de la enfermedad reduciendo la aplicación de fungicidas convencionales. El benzotiadiazol, una nueva clase de agente de control de enfermedades, posee la nueva propiedad de inducir resistencia sistémica adquirida. Se ha encontrado que activan la síntesis de fenoles en plantas que aumenta la resistencia a las enfermedades. Estos agentes selectivos tienen la ventaja de contaminar menos el medio ambiente, además de tener la capacidad de penetrar los tejidos de las plantas y ser traslocados en sistema vascular, por lo tanto, tienen la propiedad de ser curativos, así como evitar el lavado por lluvia y protección contra radiación ultravioleta (Jackson, 2014). El control biológico utilizando microorganismos antagonistas naturales ha sido ampliamente estudiado, y se ha demostrado que algunos hongos como *Trichoderma* y bacterias del genero *Bacillus* son eficaces contra el moho gris en tomate. Los aceites esenciales de plantas y extractos vegetales pueden ser alternativa como agentes de control de enfermedades ya que constituyen una rica fuente de productos químicos bioactivos los cuales tienen actividad contra un número limitado de especies, además son biodegradables a productos no tóxicos, por lo tanto, son potencialmente útiles como fungicidas (Balandrin *et al.*, 1985).

#### **2.3.2.6 Empleo de extractos vegetales**

Se han publicado distintos trabajos donde los autores tratan de encontrar una alternativa a los fungicidas sintéticos usados actualmente en el control de moho gris.

El crecimiento de *B. cinerea*, *Fusarium* spp. y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* se inhibió por los aceites esenciales de orégano y tomillo a concentraciones de 85 a 1 000 mg ml<sup>-1</sup>. La composición química de los aceites se determinó por cromatografía de gases acoplado a masas, el timol es el

componente principal del aceite de orégano, mientras que el aceite de tomillo es rico en carvacrol (Daferera *et al.*, 2003).

Por otro lado, Ribera *et al.* (2008), indican que el extracto acuoso y etanólico de los brotes *in vitro* de *Quillaja saponaria* reduce la germinación conidial y el crecimiento micelial de *B. cinerea*, siendo el extracto etanólico el más activo. Además, se redujo el área de daño producido por este hongo en hojas de tomate y fresa pre tratadas con este extracto. El análisis por HPLC del extracto mostró que contiene saponinas y algunos compuestos fenólicos, tales como ácidos clorogénico, cafeíco, vanílico y salicílico, y escopoletina, que se han identificado como agentes antifúngicos en hongos fitopatógenos.

El extracto de cloroformo-metanol, obtenido de la corteza de *Zanthoxylum rhoifolium*, mostró un efecto fungistático en *B. cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloesporioides* y *Clonostachys rosea*. Se determina que la inhibición en *B. cinerea* se debe a la presencia en el extracto del alcaloide O-metilcapaurina quien inhibe (91 %) la expresión del gen BcatrB, el cual participa en la resistencia a una amplia gama de compuestos xenobióticos (Carotenuto *et al.*, 2015).

### **2.3.3 Marchitez vascular (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)**

#### **2.3.3.1 Generalidades de la enfermedad**

*F. oxysporum* ha sido estudiado principalmente por su capacidad para causar enfermedad en plantas económicamente importantes, su distribución y actividad ecológica reflejan un repertorio mucho más diverso. *F. oxysporum* está entre los hongos más comúnmente aislados de raíces de plantas asintomáticas (Gordon *et al.*, 1989). Para ubicar las variantes patógenas conocidas dentro de *F. oxysporum*, Synder y Hansen proponen 25 formas especiales, esta designación tiene por objeto describir las capacidades fisiológicas de los hongos y no forma parte de la jerarquía taxonómica formal. El concepto de forma especial ha sido útil para identificar un subconjunto de aislamientos que afectan la producción de un cultivo susceptible a la marchitez por *Fusarium* (Synder y Hansen, 1940).

Entre las enfermedades más importantes que atacan al cultivo de tomate se encuentra la marchitez vascular, cuyo agente causal es *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Sacc.) Synder y Hansen, es responsable de pérdidas en los rendimientos de hasta un 60 %, afectando también la calidad del producto. Esta enfermedad afecta al menos en 32 países y en gran diversidad de condiciones, informándose hasta el momento la existencia de tres razas, las cuales se distinguen por su virulencia en materiales que contienen genes de resistencia (Amaral *et al.*, 2008). La enfermedad es más agresiva en climas cálidos y suelos con textura arenosa, sin embargo, fuertes infecciones en cultivares susceptibles se han reportado bajo condiciones de invernadero. Los daños se presentan con mayor severidad cuando las plantas son sometidas a un periodo de estrés hídrico, principalmente en la etapa de floración y fructificación (Ramírez, 1998).

### **2.3.3.2 Pérdidas por la enfermedad**

El hongo es de los patógenos más importantes del suelo que causan enfermedades en tomate, tiene la capacidad de persistir por períodos muy largos en el suelo sin la presencia de un hospedante (Larena *et al.*, 2003). En la actualidad la marchitez vascular causa grandes mermas en tomate en el campo y en invernadero, siendo un factor limitante para la producción. Ramyabharathi *et al.*, (2012) refieren pérdidas en el rendimiento del 45 % en la India, pero en México del 50% (Fasio *et al.*, 2003) y en Sinaloa del 60 % (García, 2001).

### **2.3.3.3 Proceso de infección**

El patógeno es un organismo que habita en el suelo y que sobrevive en los cultivos en los restos de plantas infectadas que yacen en el suelo en forma de micelio y en cualquiera de sus formas de esporas, pero lo hace con mayor frecuencia en forma de clamidosporas, sobre todo en regiones templadas frías. Se propaga a cortas distancias a través del agua y el equipo agrícola contaminado, y a grandes distancias principalmente en los trasplantes infectados o en el suelo que va en ellos. Es frecuente que una vez que un área haya sido infectada por *Fusarium* se mantenga así por tiempo indefinido. Los

tubos germinales de los conidios o el micelio penetran directamente en las puntas de las raíces o entran en estas últimas a través de heridas o a nivel de la zona donde se forman las raíces laterales. El micelio del hongo se propaga intercelularmente a través de la corteza de la raíz y llega al tejido vascular. Se mantiene entonces exclusivamente en los vasos y viaja a través de ellos, principalmente en sentido ascendente, hacia el tallo y la corona de la planta. Cuando se encuentra en los vasos, dicho micelio se ramifica y produce microconidios que son desprendidos y llevados hacia la parte superior de la planta en el torrente de la savia. Los microconidios germinan en el punto donde cesa su movimiento ascendente, el micelio penetra la pared superior del vaso y el hongo produce más microconidios en el siguiente vaso. El micelio del hongo avanza también lateralmente en los vasos adyacentes, en los que penetra a través de las punteaduras. El hongo invade entonces en gran escala a los tejidos parenquimatosos de la planta, llega a la superficie de los tejidos muertos y ahí esporula profusamente. Las esporas son diseminadas hacia nuevas plantas o áreas por medio del viento, el agua y otros factores. En ocasiones el hongo llega a los frutos de las plantas infectadas y penetra o contamina a las semillas. Esto sucede principalmente cuando la humedad del suelo es alta y la temperatura relativamente baja, condiciones que permiten a las plantas producir buenas cosechas, aunque sean infectadas por el hongo. Sin embargo, es frecuente que los frutos infectados se pudran y desprendan y, que incluso después de haber sido cosechados, sus semillas infectadas son tan ligeras que se eliminan durante métodos de extracción y limpieza de las semillas, lo cual hace que casi no tengan importancia alguna en la propagación del hongo (Agrios, 2005). De esta manera se cumple el ciclo biológico del patógeno (Figura 5).

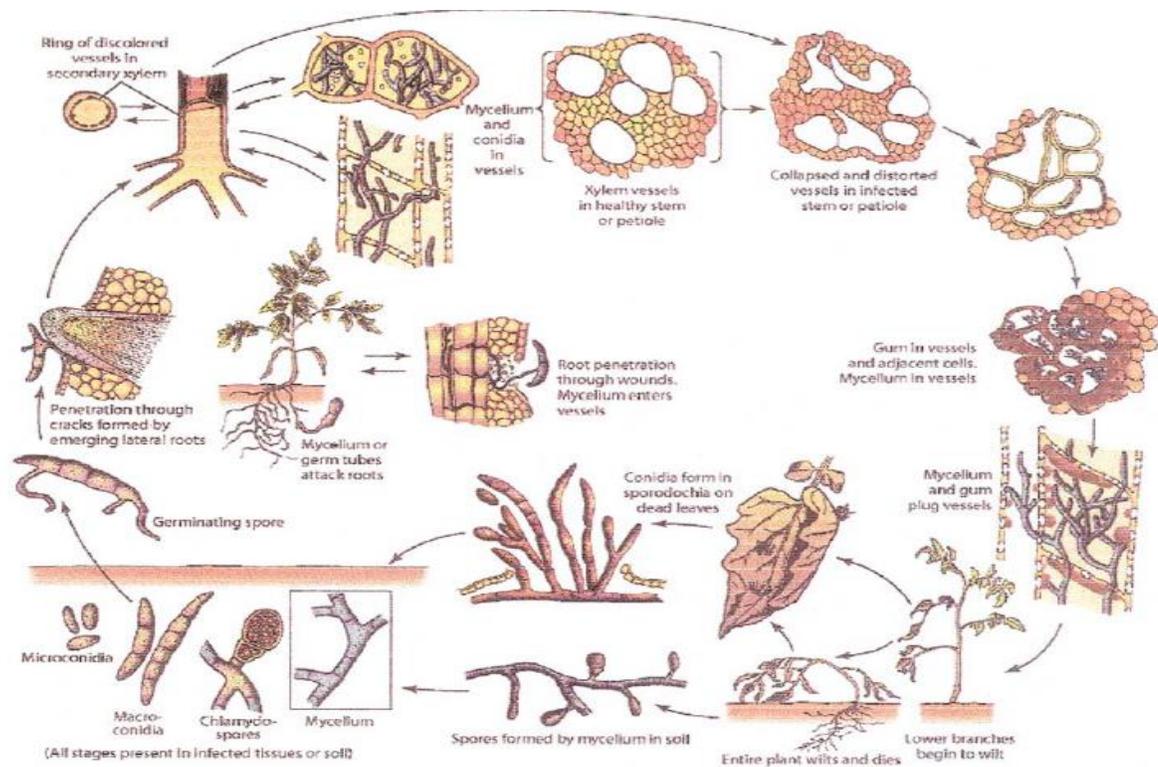


Fig.5. Ciclo patológico de la marchitez vascular del tomate ocasionada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

### 2.3.3.4 Síntomas de la enfermedad

En plántulas, la enfermedad causa amarillamiento, retraso del crecimiento y marchitez. En plantas maduras también se presenta un amarillamiento y marchitamiento del follaje, que suele ser más notable después de la floración y durante las horas más calurosas del día. Esta sintomatología puede tener una apariencia unilateral debido a la invasión y bloqueo de tejido vascular que puede extenderse por toda la longitud del tallo inclusive hasta en peciolas. Las temperaturas cálidas (~28 °C), el pH del suelo bajo y el uso de fertilizantes a base de amonio favorece el desarrollo de los síntomas (McGovern, 2015). Al hacer un corte longitudinal del tallo, cerca de la base de la planta infectada, se puede observar una coloración café en el área de los haces vasculares, y el avance de la decoloración hacia la parte superior de la planta, depende de la severidad de la enfermedad (Figura.6) (Agrios, 2005).



Fig.6. Tejidos vasculares obstruidos y descoloridos en corte longitudinal del tallo de tomate infectado con *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

### 2.3.3.5 Control de la enfermedad

Como se trata de un patógeno de origen edáfico, la clave en el manejo de marchitez vascular está en reducir la densidad poblacional, así como su capacidad de multiplicarse (patogenicidad) y su capacidad de producir enfermedad (virulencia) (Mc Govern, 2015), y existen estrategias y tácticas que se deben de incluir dentro de un manejo integrado de la enfermedad que van encaminadas a lograr estos objetivos.

La resistencia de las plantas a los agentes patógenos es vista como el método de manejo de la enfermedad más económico y ecológicamente viable (Agrios, 2005). Aunque la resistencia poligénica a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) se ha reconocido en una serie de cultivares de tomate, tales como Homestad y Marglobe, que no parecen ser prometedoras en los programas de manejo en el cultivo de tomate (Gao *et al.*, 1995). La resistencia monogénica a Fol en tomate se expresa principalmente como deposición de calosa, acumulación de fenoles y la formación de tilosis en las células del parénquima del xilema adyacente al

tejido vascular, estas respuestas, si son oportunas, limitan la infección interior del tejido conductivo de agua por Fol. Los cultivares de tomate resistentes a Fol raza 1 a 3 han sido desarrollados a través de la integración de genes de los parientes silvestres del tomate como *Solanum pennelli* y *S. pimpinellifolium* (Takken y Rep, 2010). El uso de injertos con patrones resistentes a enfermedades ya es una práctica común en todo el mundo y se ha intensificado debido a la prohibición del bromuro de metilo. La solarización del suelo es otra táctica que se basa en reducir la densidad del inóculo a través de la inactivación térmica, acumulación de compuestos volátiles y debilitamiento de los patógenos mediante el calentamiento subletal (Katan y DeVay, 1991). El uso de fumigantes ha sido la estrategia de manejo más común para marchitez vascular en todo el mundo, pero en la actualidad muchos ya no son permitidos debido a su alto impacto ambiental, principalmente en el deterioro de la capa de ozono (Mc Govern, 2015).

La aplicación de fungicidas es el método de control mayormente usado para el control de la enfermedad, una amplia gama de fungicidas muestra actividad contra Fol. Un estudio realizado por Amini y Sidovich (2010) determinan que Bromuconazole y Procloraz cuando se aplican al suelo en drench a dosis de 10 mg i.a. mL<sup>-1</sup> son más efectivos en la reducción de la severidad de marchitez vascular que Azoxystrobin, Benomil, Carbendazim y Fludioxanil; sin embargo, todos los fungicidas probados reducen significativamente la enfermedad en comparación con el control. El tiofanatometílico es uno de los fungicidas más ampliamente usados para el control de *Fusarium* en diversos cultivos y su actividad se debe a que provoca efectos tóxicos en los hongos, principalmente inhibiendo la polimerización de la tubulina, perjudicando así la mitosis (Traina *et al.*, 1998). Desafortunadamente, estos fungicidas químicos no son fácilmente biodegradables, tienden a persistir durante años en el medio ambiente y los patógenos han desarrollado resistencia a ellos. Por lo tanto, las alternativas a los fungicidas sintéticos se centran en la búsqueda de agentes de control biológico y sustancias naturales producidas por plantas con actividad fungicida.

### 2.3.3.6 Empleo de extractos vegetales

El enfoque en el manejo de enfermedades causadas por *Fusarium* se basa en la búsqueda de sustancias de origen vegetal.

Se evaluó el efecto antifúngico de cuatro aceites esenciales: clavo (*Syzygium aromaticum*), limonillo (*Cymbopogon citratus*), menta (*Mentha x piperita*) y eucalipto (*Eucalyptus globulus*) con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. El aceite de clavo muestra una inhibición completa del crecimiento micelial y de la germinación de esporas a 125 ppm. Los demás aceites inhiben el desarrollo del hongo a concentraciones mayores. Por cromatografía de gases se identificaron 31 compuestos diferentes que constituyen el 99 % del aceite de clavo, siendo los principales componentes el eugenol (75.41 %), E-cariofileno (15.11 %), a-humuleno (3.78 %) y óxido de cariofileno (1.13 %). Para este mismo aceite, por microscopía electrónica de barrido se revela una deformación en las hifas, mientras que por microscopía de fuerza atómica se observa que las esporas se encojen. Además, el aceite de clavo controló la infección por marchitez vascular en plantas de tomate, por lo que los autores de este trabajo proponen que el aceite de clavo se podría utilizar como un biofungicida para el control preventivo de esta enfermedad (Sharma *et al.*, 2016).

Yilar y Kadioglu (2016) reportan que el mayor efecto de inhibición en el desarrollo del micelio de *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* se tiene en el aceite esencial de *Salvia officinalis* con 62.71 % de inhibición, seguido de *S. tomentosa* y *S. cryptantha*.

## **2.4 Extractos vegetales en la protección a enfermedades fungosas de los cultivos**

Cada una de las especies de plantas se ve afectada por casi un centenar de diferentes tipos de hongos, bacterias, micoplasmas, virus, nematodos, etc. En general, las plantas contrarrestan el ataque de los patógenos, ya sea mediante características estructurales que actúan como barreras físicas e impiden que el patógeno penetre y se propague en ellas, o por medio de reacciones bioquímicas que tienen lugar en sus células y tejidos, las cuales producen sustancias tóxicas para el patógeno o crean condiciones que inhiben su desarrollo. La combinación de las características estructurales y reacciones bioquímicas que utilizan las plantas para defenderse de los patógenos difieren en las distintas interacciones hospedante-patógeno. Además, incluso al tratarse del mismo hospedante y patógeno, las combinaciones varían con la edad de la planta, el tipo de órganos y tejidos de ésta al ser atacados y el estado nutricional de la planta, así como las condiciones climáticas (Agrios, 2005).

Como parte de la protección química, las plantas producen metabolitos secundarios (MS) con actividad antimicrobiana, que son compuestos de bajo peso molecular que no solamente tienen una gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos, sino que también, una síntesis activa de MS se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas como el consumo por herbívoros, ataque de microorganismos patógenos, competencia por espacio y nutrientes, exposición a la luz solar y otros tipos de estrés abiótico (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2004). Los precursores de la biosíntesis de MS se derivan de rutas del metabolismo primario, tales como como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del shikimato. Una síntesis constitutiva y específica de MS puede existir para cada tipo de órgano, tejido o tipo celular. Existen también MS que se sintetizan en todos los órganos y tejidos de la planta, pero que se almacenan en órganos o tejidos

diferentes a los de sus síntesis, a través de su redistribución por el xilema y/o floema, o por el espacio apoplástico (Edwards y Gatehouse, 1999).

La respuesta de defensa contra el ataque de microorganismos patógenos está coordinada tanto espacial como temporalmente para una contención rápida del microorganismo patógeno, por lo que puede ser local o en sitios lejanos, conocida como respuesta sistémica. La respuesta local está asociada con una respuesta hipersensible caracterizada por una muerte rápida de las primeras células infectadas y la restricción de la expansión del microorganismo patógeno, aislándolo del resto de la planta (Hammond *et al.*, 1996). Posteriormente, se da un aumento de los niveles del ácido jasmónico, el ácido salicílico y el etileno, la acumulación de proteínas relacionadas a la patogénesis, un aumento de la producción de MS con actividad antimicrobiana o antioxidante y el fortalecimiento de la pared celular. En la respuesta sistémica se induce la producción de proteínas relacionadas con las patogénesis similares a las de la respuesta local y de otras proteínas.

Desde el punto de vista evolutivo, una alta proporción de los hongos han interactuado con plantas y a pesar de los escasos registros fósiles, se tiene evidencias de la presencia de hongos parásitos de plantas desde hace alrededor de 400 millones de años. La co-evolución entre especies de hongos y plantas ha permitido entre otras cosas, el desarrollo del concepto gen a gen, que considera que los cambios que ocurren en la virulencia o agresividad de los patógenos deben estar en constante equilibrio con los cambios que ocurran en la resistencia del hospedante y viceversa, de manera que se establezca un equilibrio que permita tanto la sobrevivencia del patógeno como al del hospedante (Flor, 1971). Las plantas han desarrollado dos tipos de compuestos que tienen que ver con su defensa al ataque de hongos, los llamados compuestos antifúngicos que existen en las plantas estructuralmente para detener la invasión de diversas especies de hongos, y las fitoalexinas que se producen como respuesta a la infección de patógenos más específicos por reacciones bioquímicas rápidas como la hidrólisis enzimática (Grayer y

Harborne, 1994). La diversidad estructural de los compuestos antifúngicos es enorme y sólo se conoce una pequeña parte de ellos, puesto que las plantas estudiadas representan un porcentaje sumamente bajo del total de especies de plantas en el planeta (entre 200 000 y 250 000 especies de angiospermas) (Montes-Belmont *et al.*, 2000).

Los extractos de plantas constan de una combinación de elementos activos producto del metabolismo vegetal. Todo el conjunto de sustancias del vegetal forma un todo; la gran cantidad de sustancias químicas que contienen interacciona de modo sinérgico, es decir, dan como resultado efectos superiores al efecto de los mismos elementos por separado. Entre los compuestos presentes en los extractos vegetales que han mostrado un efecto antifúngico destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos (Cown,1999). Sus mecanismos de acción son variables; por ejemplo, la toxicidad de los fenoles en microorganismos se atribuye a la inhibición enzimática por oxidación de compuestos. El modo de acción de terpenos y aceites esenciales no ha sido dilucidado por completo, pero se postula que pueden causar rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofílicos. De los alcaloides se ha postulado que se intercalan con el DNA, y de las lectinas y polipéptidos se conoce que pueden formar canales iónicos en la membrana celular o causar la inhibición competitiva por adhesión de proteínas microbianas a los polisacáridos receptores del hospedero. Dentro del ciclo de las enfermedades fungosas, la posibilidad de acción de los metabolitos secundarios de las plantas se puede dar interrumpiendo procesos como la germinación de esporas, la formación de estructuras de penetración a las células para iniciar infección, el desarrollo del micelio durante la colonización de tejidos, la esporulación y el inicio de la enfermedad en las fuentes de inóculo primario (Montes *et al.*, 2000).

Diversos experimentos se han llevado a cabo usando extractos de plantas de especies y familias diferentes así como, distintos tipos de extractos obtenidos con diferentes solventes, para determinar su actividad antifúngica contra

hongos fitopatógenos de diversos grupos como *Phytophthora*, *Pythium* y *Pseudoperonospora* de la clase Oomicetes; *Claviceps*, *Dydymella*, *Erysiphe*, *Monilinia* y *Phyllachora* de los ascomicetos; *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Oidium*, *Penicillium*, *Stemphylium* y *Botrytis* de la clase deuteromicetes y los causantes de las denominadas royas, de los géneros *Hemileia*, *Puccinia* y *Uromyces* de la clase basidiomicetes.

También se han hecho diferentes estudios fitoquímicos donde se han determinado grupos de compuestos involucrados en el efecto antifúngico en varias de las plantas probadas, por ejemplo, se ha identificado una saponina esterooidal como el posible principio activo contra *Uromyces appendiculatus* (Montes *et al.*, 1992). Se han aislado algunos alcaloides como lupanina, nomerlicopicina y anhidroiamogenina, que, aunque no está confirmado, están involucrados sobre el efecto fungistático y antiesporulante sobre *Fusarium moniliforme* (Bravo *et al.*, 1997). De tomillo se ha aislado el timol, linalol de albahaca, eugenol de canela y clavo; y mentol de yerbabuena, los cuales han logrado buenos resultados al colocar el contacto directo el hongo con el metabolito en medio de cultivo sobre *Fusarium moniliforme* (Hernández *et al.*, 1996).

México es uno de los países con mayor diversidad vegetal en el mundo, estimándose que tiene entre 23 000 y 30 000 especies de plantas de las cuales, se utiliza una mínima cantidad, y existen algunas que poco o nunca se han estudiado por su efecto contra hongos fitopatógenos de importancia en tomate como *Argemone mexicana*, *Croton xalapensis*, *Foeniculum vulgare*, *Phytolacca icosandra* y *Tagetes lemmonii*, por lo tanto, se determinó la actividad fungicida en *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*.

### **2.4.1 *Argemone mexicana* L.**

### **2.4.2 Descripción botánica**

Es una planta de la familia Papaveraceae y en México se le conoce comúnmente como chicalote. Es una hierba espinosa erecta, erguida de aproximadamente 1 m de altura; las hojas suelen tener de 5 a 11 cm de largo y más o menos manchadas de verde y blanco, de verde claro en la base, entrelazadas con el tallo prominentemente sinuoso-lobuladas y espinosas. Las flores son de 4 a 5 cm de diámetro y son terminales, amarillas y sin olor. El fruto es tipo cápsula espinoso, obovado o elíptico-oblongo, y de unos 3 cm de longitud. Las semillas son esféricas, brillantes y negras (Chopra *et al.*, 1956).

### **2.4.3 Importancia**

*Argemone mexicana* es considerada como una importante planta medicinal en todo el mundo, todas las partes y componentes de esta planta se han utilizado como tratamiento en diferentes tipos de enfermedades, por ejemplo, la savia de color amarillo que exuda la planta cuando ha sufrido una lesión, se ha utilizado durante mucho tiempo en la India como medicina tradicional para la ictericia, oftalmia, sarna y afecciones cutáneas. El aceite de semilla se emplea como un remedio para la disentería, úlceras, asma y otras afecciones intestinales. Las hojas se usan para mantener una buena circulación sanguínea, así como adecuados niveles de colesterol. Las flores son expectorantes y se han utilizado en el tratamiento de la tos (Brahmachari *et al.*, 2010).

#### **2.4.3.1 Evaluación en microorganismos**

La actividad biológica de extractos de *A. mexicana* se ha comprobado en diversos microorganismos, como bacterias. Un estudio realizado por Rahman *et al.* (2009) evalúan *in vitro* la actividad antibacteriana de extractos crudos de tallo (n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y etanol) contra bacterias Gram positivas y Gram negativas contaminantes de alimentos tales como *Bacillus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y

*Salmonella typhimurium* y encuentran que los extractos muestran una potente actividad antibacteriana con valores de CMI (concentración mínima inhibitoria) entre 62.5 y 500  $\mu\text{L mL}^{-1}$ . Este estudio indica la presencia de algunos componentes químicos antibacterianos en la planta, que podrían encontrar aplicaciones útiles. También se ha reportado la actividad fungitóxica de extractos de hoja de chicalote contra hongos patógenos de frutas como *Alternaria alternata*, *Dreschlera halodes*, *Helminthosporium speciferum* y *Curvularia tuberculata* (Srivastava y Srivastava, 1998). La planta es fuente de una gran diversidad de compuestos químicos que incluyen alcaloides, terpenoides, esteroides, carbohidratos, alcoholes alifáticos de cadena larga y ácidos carboxílicos, aminoácidos, flavonoides y otros compuestos fenólicos (Brahmachari *et al.*, 2013).

#### **2.4.4 *Croton xalapensis* Kunth**

#### **2.4.5 Descripción botánica**

El género *Croton*, perteneciente a la gran familia *Euphorbiaceae*, está formado por hierbas, arbustos, árboles e inusualmente lianas. Las plantas están recubiertas por pelos estrellados o escamosos, y tienen hojas enteras, dentadas o lobuladas. Sus flores son monoicas o dioicas y están reunidas en espigas terminales o axilares. Dicho género comprende aproximadamente unas 1300 especies difundidas en las regiones cálidas del planeta, sobre todo en América del Sur y en África; es el género más grande de la subfamilia *Crotonoideae* (Berry, 1999).

#### **2.4.6 Importancia**

Las diferentes especies de *Croton* han sido evaluadas como una fuente potencial de agentes quimioterapéuticos basándose en sus usos etnomedicinales. Chen *et al.*, (1994) estudian las propiedades antibacterianas de la savia roja de *Croton lechleri* en Ecuador, determinan los compuestos 2,4,6-trimetoxifenol, 1,3,5-trimetoxibenceno, ácido crolequínico y korberinas A y B presentes en la savia para exhibir la actividad antibacteriana individualmente.

#### **2.4.6.1 Evaluación en microorganismos**

Peres *et al.* (1997), demuestran la actividad inhibitoria de extractos acuosos, etanólicos y metanólicos de *Croton urucurana* sobre las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*. También se ha evaluado la actividad contra hongos de esta planta, por ejemplo, Gurgel *et al.* (2005) reportan el efecto antifúngico *in vitro* de *Croton urucurana* en hongos dermatofitos. La química del género *Croton*, ha sido bastante explorada, se han realizado estudios fitoquímicos que han conducido al aislamiento de esteroides, alcaloides, flavonoides, cumarinas y una gran variedad estructural de diterpenos, con esqueleto carbonado tipo labdano, kaurano, cleistanano, crotofalano, así como clerodano, siendo este último el más abundante, muchas especies son ricas en mono y sesquiterpenos (Junior *et al.*, 2006).

#### **2.4.7 *Foeniculum vulgare* Mill**

##### **2.4.8 Descripción botánica**

La planta es un arbusto que puede medir más de metro y medio de altura. Forma un rosetón en el suelo, del que parte un largo y robusto tallo de color verde claro que presenta líneas más claras y una ancha médula en el interior. Las ramas crecen en forma de vainas que posteriormente se vuelven como hojas afiladas y muy ramificadas. El fruto es muy pequeño, alargado y ligeramente curvo; mide en su lado más largo cuatro milímetros y desprende un agradable olor a anís. Las inflorescencias son vistosas umbelas de hasta treinta radios, formadas por pequeñas flores amarillas (Santos, 2006).

##### **2.4.9 Importancia**

Debido a sus propiedades carminativas, el hinojo se usa principalmente en la medicina como purgantes para reducir sus efectos secundarios. El extracto de semillas de hinojo se ha demostrado en animales que tienen un uso potencial en el tratamiento del glaucoma, como diurético y un medicamento para el tratamiento de la hipertensión (Agarwal *et al.*, 2008).

#### **2.4.9.1 Evaluación en microorganismos**

Se ha reportado la actividad antibacteriana de extractos acuosos y orgánicos de hinojo. Un estudio llevado a cabo por Kwon *et al.* (2002) demuestra que el aceite esencial de *F. vulgare* presenta potencial para el control de infecciones multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*, identificando como principios antimicrobianos activos, un derivado de fenilpropanoide. También se ha informado que el aceite esencial de hinojo reduce el crecimiento micelial y germinación de *Sclerotinia sclerotium*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Fusarium graminearum* y *F. miniliforme*, por lo que, se podría utilizar como fungicida biológico como alternativa a los fungicidas sintéticos contra hongos fitopatógenos (Soylu *et al.*, 2007). Las mayores concentraciones de aceites esenciales en la planta de hinojo se encuentran en la semilla donde han sido reportados compuestos como *trans*-anetol, fencon, estragol y alfa-felandreno. Las otras clases de fitoquímicos presentes en *F. vulgare* son fenoles y glucósidos fenólicos (Rather *et al.*, 2012).

#### **2.4.10 *Phytolacca icosandra* L.**

##### **2.4.11 Descripción botánica**

Es una hierba anual o perenne, de vida corta, con frecuencia robusta, sin pelos o poco pubescente, algo suculenta; que alcanza casi los dos metros de altura. La raíz es gruesa, carnosa y los tallos son ramificados, huecos y angulosos. Las hojas son alternas oblongo lanceoladas de 7-20 cm de largo por 2.5 a 9.5 cm de ancho, ápice agudo, acuminado y a veces mucronato, con base atenuada, acuminada; pecíolos bien manifiestos, de 1 a 6 cm de largo.

Las flores son sub sésiles o sobre pedicelos de 2 a 5 mm de largo, brácteas sub ovaladas, sépalos verdosos, blancos o rojizos, elípticos a ovados de 2.5 a 3.2 mm de largo por 1.5 a 3 mm de ancho, persistente; los estambres varían de 8 a 20, ovario sub globoso, con 6 a 10 carpelos, estilos encorvados. El fruto se integra en racimos pedunculados, numerosos, axilares y terminales de 8-1 cm o

más de largo, en estado de fructificación, raquis frecuentemente pubescente (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

### **Importancia**

Varias especies de este género son reconocidas por sus propiedades medicinales y se ha usado como analgésico, antiinflamatorio, bactericida y fungicida. En uso veterinario en condiciones *in vitro*, los extractos etanólicos y diclorometano inhiben la migración larval de *Haemonchus contortus*, un nematodo parásito de cabras y ovejas. Además, el extracto etanólico inhibe al 72.25 % la eclosión de los huevecillos (Hernández-Villegas *et al.*, 2011). También se ha evaluado el efecto de extractos metanólicos y acuosos de *P. icosandra* contra una de las plagas más importantes que afectan hortalizas, la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* con efecto de toxicidad en condiciones de laboratorio de 39.5 y 40.5 % respectivamente; en invernadero estos valores fueron de 23.3 y 26.3 % respectivamente (Ángeles-Martínez *et al.*, 2011).

#### **2.4.11.1 Evaluación en microorganismos**

También se ha reportado el efecto fungicida de esta planta, en este caso, Mecalco (2014) encontró que el extracto hexánico de *P. icosandra* a concentración del 50 % tiene mayor efecto de inhibición en el crecimiento micelial *in vitro* de *Colletotrichum gloesporioides*, debido a la presencia de saponinas.

Todos estos efectos son atribuidos a la presencia de metabolitos secundarios como los terpenoides, flavonoides, esteroides, cumarinas, ligninas y saponinas (Williams *et al.*, 2002).

#### **2.4.12 *Tagetes lemmonii***

#### **2.4.13 Descripción botánica**

Pertenece a la familia *Asteraceae*, tribu *Tageteae*. Son plantas herbáceas anuales o perennes, aromáticas al estrujarse; hojas todas opuestas, o bien, las superiores alternas, por lo común profundamente pinnatipartidas o pinnadas, algunas veces simples, con numerosas glándulas oleíferas translúcidas; cabezuelas solitarias o más o menos cimoso-corimbosas, involucreo cilíndrico, fusiforme o angostamente campanulado, sus brácteas de tamaño subigual, unidas entre sí hasta cerca del ápice y provistas de 2 hileras de glándulas oleíferas translúcidas; receptáculo plano o convexo, desnudo; flores liguladas generalmente presentes, fértiles, sus corolas amarillas, anaranjadas, rojizas o blancas; flores del disco hermafroditas, sus corolas amarillas o anaranjadas, con la garganta infundibuliforme, anteras con las bases obtusas, ramas del estilo de las flores hermafroditas truncadas y peniciladas en el ápice, o bien, con apéndices cónicos cortos; aquenios lineares o claviformes, vilano de tres a diez escamas desiguales, a veces más o menos unidas entre sí, 1 o 2 (a veces más) de ellas lineares, mucho más largas que las demás (Rzedowski, 2005).

#### **2.4.14 Importancia**

Algunas especies de *Tagetes* han sido ampliamente utilizadas en la medicina tradicional para tratar problemas en el hígado, fiebre, problemas digestivos y reducir las flemas, pero su principal uso se ha enfocado en la agricultura, como insecticidas, fungicidas, herbicidas y nematocidas naturales (Lin, 2009). Además, los pigmentos de las flores de *Tagetes* se han usado en alimentos y bebidas como colorante. Otras aplicaciones son la actividad antioxidante y antimutagénica, lo que poco a poco ha llamado el interés de los científicos en el mundo.

#### 2.4.14.1 Evaluación en microorganismos

Se encontró que los aceites esenciales de *T. minuta* obtenidos por hidrodestilación tienen actividad antibacteriana, especialmente contra bacterias Gram positivas. La CMI para el aceite de plantas cultivadas en invernadero en Reino Unido fue de 6.25x25 g ml<sup>-1</sup> para bacterias Gram positivas y de 25x50 g ml<sup>-1</sup> para bacterias Gram negativas, la CMI más baja frente a *Streptococcus faecalis*. El aceite de plantas de Sudáfrica con un valor de CMI de 50x100 g ml<sup>-1</sup> frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas (Senatore *et al.*, 2004). En otro ensayo, utilizando microdilución en serie, se reporta que los extractos acuosos y orgánicos de *T. minuta* tienen actividad antifúngica sobre hongos de importancia agrícola, estos resultados indicaron que los constituyentes químicos de esta especie se pueden desarrollar como posibles fungicidas orgánicos (Thembo *et al.*, 2010).

Los estudios fitoquímicos en plantas de *Tagetes* se han llevado a cabo desde 1920, hasta ahora, se han obtenido aproximadamente 126 metabolitos secundarios principalmente, derivados fenólicos, fenilpropanoides, derivados de tiofeno, derivados de benzofurano, triterpenoides, esteroides, alcaloides, flavonoides, carotenoides y otros (Xu *et al.*, 2012).

### **3 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Recolección de material vegetal**

##### **3.1.1 Identificación taxonómica**

Para la identificación taxonómica del material vegetal se solicitó el apoyo del M.C. Antonio Cortés Jiménez responsable del Herbario-Hortorio JES del Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

##### **3.2 Obtención de extractos vegetales**

Las especies vegetales utilizadas para la extracción se recolectaron de distintos lugares, en el Cuadro 3 se presenta la lista de las cinco especies estudiadas, la familia, lugar de colecta, ubicación, así como el tejido empleado. Las muestras se secaron en una estufa a 40 °C por 48 h. El molido del material con un molino marca Thomas Wiley modelo 4 Arthur H. (Thomas Company Philadelphia, P.A. U.S.A.) hasta obtener una harina, la cual se almacenó en bolsas de papel hasta su análisis. La obtención de los extractos se llevó a cabo en un equipo Soxhlet en serie, colocando en la parte media del cuerpo extractor del sistema de cartuchos de papel filtro con 100 g de material vegetal molido, usando hexano como disolvente para desengrasar, a una temperatura de 60 °C por 36 h. Transcurrido este tiempo, los cartuchos se secaron al aire libre para colocarlos nuevamente en el equipo Soxhlet usando metanol como disolvente y haciendo la extracción por 36 h. Los extractos hexánicos y metanólicos se concentraron por evaporación del disolvente a presión reducida en un rotaevaporador marca Büchi (Delgado *et al.*, 2012).

Cuadro 3.- Coordenadas geográficas de los sitios de recolecta y tipo de tejido de las especies vegetales utilizadas para los extractos.

<b>Especie</b>	<b>Familia</b>	<b>Lugar de recolecta</b>	<b>Ubicación</b>	<b>Tejido</b>
<i>Argemone mexicana</i>	<i>Papaveraceae</i>	Papalotla, Edo. de México	19°33'21.40"LN 98°51'34.39" LO	HOJA
<i>Croton xalapensis</i>	<i>Euphorbiaceae</i>	Huejutla, Tehuetlan, Hidalgo.	21°3'1.65" LN 98°30'34.39"LO	HOJA
<i>Foeniculum vulgare</i>	<i>Apiaceae</i>	Chapingo, Texcoco, Edo. de México	19°29'33.30"LN 98°52'28.09" LO	HOJA
<i>Phytolacca icosandra</i>	<i>Phytolaccaceae</i>	San Simón, Texcoco, Edo. de México	19°31'31"LN 98°52'28.76 LO	HOJA
<i>Tagetes lemmonii</i>	<i>Asteraceae</i>	Chapingo, Texcoco, Edo. de México	19°29'33.30"LN 98°52'28.09" LO	HOJA

### 3.3 Aislamiento de hongos fitopatógenos

Las plantas de tomate enfermas de los hongos fitopatógenos usados en la presente investigación se recolectaron en los invernaderos experimentales de Tlapiaxco que pertenecen a la Universidad Autónoma Chapingo. El tejido vegetal dañado se trasladó al Laboratorio de Posgrado I del Departamento de Parasitología Agrícola para su proceso.

El hongo *A. solani* se aisló de hojas con lesiones características de tizón temprano. El patógeno *B. cinerea* se obtuvo de tallo que presentaba cancro con abundante esporulación de color gris, propia de enfermedades causadas por este hongo (Agrios, 2005). A *F. oxysporum* se le aisló de plantas que presentaban un amarillamiento de hojas y al hacer un corte longitudinal del tallo,

estas presentaron una necrosis del tejido vascular típico de una infección de este patógeno. Todos los tejidos infectados se sometieron a un proceso de desinfección con hipoclorito de sodio al 1.5 % por 2 min con la finalidad de eliminar bacterias, posteriormente el material vegetal se lavó con agua esterilizada y se colocó en cajas Petri con medio de cultivo PDA, todo esto se realizó bajo condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar, las cajas se incubaron durante 8 d a una temperatura de 28 °C.

### **3.4 Identificación morfológica de los hongos fitopatógenos**

De un cultivo de 8 d para cada uno de los hongos, se utilizó la técnica de cinta pegante. La muestra se tiñó adicionando una gota de azul de lactofenol para observación en microscopio óptico (Olympus, modelo CX31) usando el objetivo a 40X y 100X. Las características morfológicas de crecimiento colonial y estructuras conidiales de las cepas de *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* se compararon con las descripciones taxonómicas de Mendoza (1995). Para *Fusarium oxysporum* se basó en la descripción de Leslie y Summerell (2008).

### **3.5 Evaluación antifúngica de los extractos *in vitro***

Para determinar el efecto fungicida de los extractos, el bioensayo se realizó mediante el método de agar envenenado modificado usado. El método consistió en colocar 100 µL del extracto y fungicidas en medio PDA solidificado en cajas Petri y se extendió sobre la superficie del medio, después de 2 min en el centro se colocó un fragmento de PDA infectado con la cepa del hongo de interés a evaluar de aproximadamente 5 mm de diámetro, la incubación se realizó a 28 °C y el crecimiento radial del micelio se midió con un vernier cuando la caja Petri sin tratamiento cubrió por completo la superficie del medio (10 d) (Reyes *et al.*, 1998).

### 3.6 Diseño de tratamientos

Soluciones acuosas se prepararon a concentraciones de 20, 40, 60 y 80 % de cada extracto y como testigo químico se utilizaron los fungicidas comerciales Scala® 60 SC (pirimetanil) para *Alternaria solani*, Elevat® (fenhexamid) para *Botrytis cinerea* y Cercobin® M (tiofanato metílico) para *Fusarium oxysporum* a la dosis recomendada en la etiqueta, también se usó fungicida orgánico comercial que fue PROGRANIC®Mega (Extracto de *Larrea tridentata*) contra los tres hongos, usando la dosis de acuerdo con la etiqueta (Cuadro 4).

Cuadro 4. Diseño de tratamientos para *A. solani*, *B. cinerea* y *F. oxysporum*.

Tratamientos		Concentraciones (%)				Variable Respuesta
1	Controles	-----				Crecimiento (mm) del diámetro del micelio
2	E.M.* <i>Argemone mexicana</i>	20	40	60	80	
3	E.M. <i>Croton xalapensis</i>	20	40	60	80	
4	E.M. <i>Foeniculum vulgare</i>	20	40	60	80	
5	E.M. <i>Phytolacca icosandra</i>	20	40	60	80	
6	E.M. <i>Tagetes lemmoni</i>	20	40	60	80	
7	PROGRANIC®Mega ( <i>Larrea tridentata</i> )	95 (5 ml L <sup>-1</sup> )				
8	CERCOBIN® M (tiofanato metílico)	70 (1 g L <sup>-1</sup> )				
9	SCALA® 60 (pirimetanil)	54.5 (2.5 ml L <sup>-1</sup> )				
10	ELEVAT® (fenhexamid)	50 (3.09 g L <sup>-1</sup> )				

\*= Extracto Metanólico

### 3.7 Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones, la unidad experimental estuvo formada por una caja Petri de 9 cm de diámetro con medio de cultivo PDA.

### 3.8 Variables evaluadas

El crecimiento radial del hongo se midió cuando la caja Petri sin tratamiento cubrió la superficie completa, posteriormente se calcularon los porcentajes de

inhibición media con la siguiente ecuación (Jing *et al.*, 2014; Punawich *et al.*, 2010):

$$PI = \left[ \frac{CMC - CMT}{CMC} \right] (100)$$

Donde PI= % de inhibición, CMC=crecimiento micelial en el control y CMT=crecimiento micelial en el tratamiento.

También se determinó la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>), mediante un Análisis Probit (Finney, 1971), usando el software DL-Probit, versión 1.0.

### **3.9 Análisis estadístico**

Se realizó el análisis de varianza y comparación múltiple de medias con el método de Tukey al 5 % de significancia, adicionalmente se hizo un análisis combinado en donde estuvieron involucrados los patógenos, los muestreos y los tratamientos, usando el mismo nivel de significancia que en el análisis individual, utilizando el paquete estadístico SAS.

### **3.10 Análisis fitoquímico de los extractos**

#### **3.10.1 Flavonoides**

Para la identificación cualitativa de flavonoides en los extractos metanólicos de hoja de *A. mexicana*, *C. xalapensis*, *F. vulgare*, *P. icosandra* y *T. lemmonii* se colocó una muestra de cada extracto en una placa cromatográfica de gel de sílice 60 F254 (Merck) de 20x20 cm con ayuda de un capilar, la placa se colocó en una cámara de elución saturada con una mezcla de butanol: ácido acético: agua (40:10:50 v/v). La placa se asperjó con reactivo NP (2-aminoethildifenilborinato) al 0.3 % en metanol y después se asperjó con PEG (poli etilenglicol) 4000 al 5 % p/v en metanol para acentuar la coloración de las manchas. La placa se expuso a luz ultravioleta a una longitud de 365 nm (Wagner y Bladt, 1996).

### **3.10.2 Terpenoides**

Para la determinación de terpenoides se utilizó una placa de sílice gel 60 F254 (Merck) de 20x20 cm a la cual se colocó con la ayuda de un capilar una muestra de cada extracto metanólico de hoja de las especies vegetales estudiadas, la placa se introdujo en una cámara de elución utilizando como eluyente tolueno-acetato de etilo en proporción 93:7, respectivamente, se reveló con los agentes cromogénicos de una mezcla de vainillina al 1 % en etanol, se dejó secar y se asperjó con una solución etanólica de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10 % v/v, finalmente se colocó en una estufa a 110 °C durante 5 min para su observación (Wagner y Bladt, 1996).

### **3.10.3 Alcaloides**

Una muestra de cada extracto metanólico se aplicó sobre una placa de cromatografía en capa fina de gel de sílice de 20x20 cm, la placa se introdujo en una cámara de elución saturada con una mezcla de metanol: diclorometano (8:2 v/v), una vez que el disolvente alcanzó el frente, se sacó la placa y se dejó secar al aire libre, se asperjó con reactivo de Dragendorff, y se colocó en una parrilla eléctrica a baja temperatura (Wagner y Bladt, 1996) para visualizar la presencia de alcaloides.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Identificación taxonómica del material vegetal.

Las características taxonómicas de las especies utilizadas en el presente estudio permitieron determinar que las plantas colectadas fueron, *Argemone mexicana* L., *Croton xalapensis* G.L. Webster, *Foeniculum vulgare* L., *Phytolacca icosandra* L. y *Tagetes lemmonii* A. Gray (Figura.7).

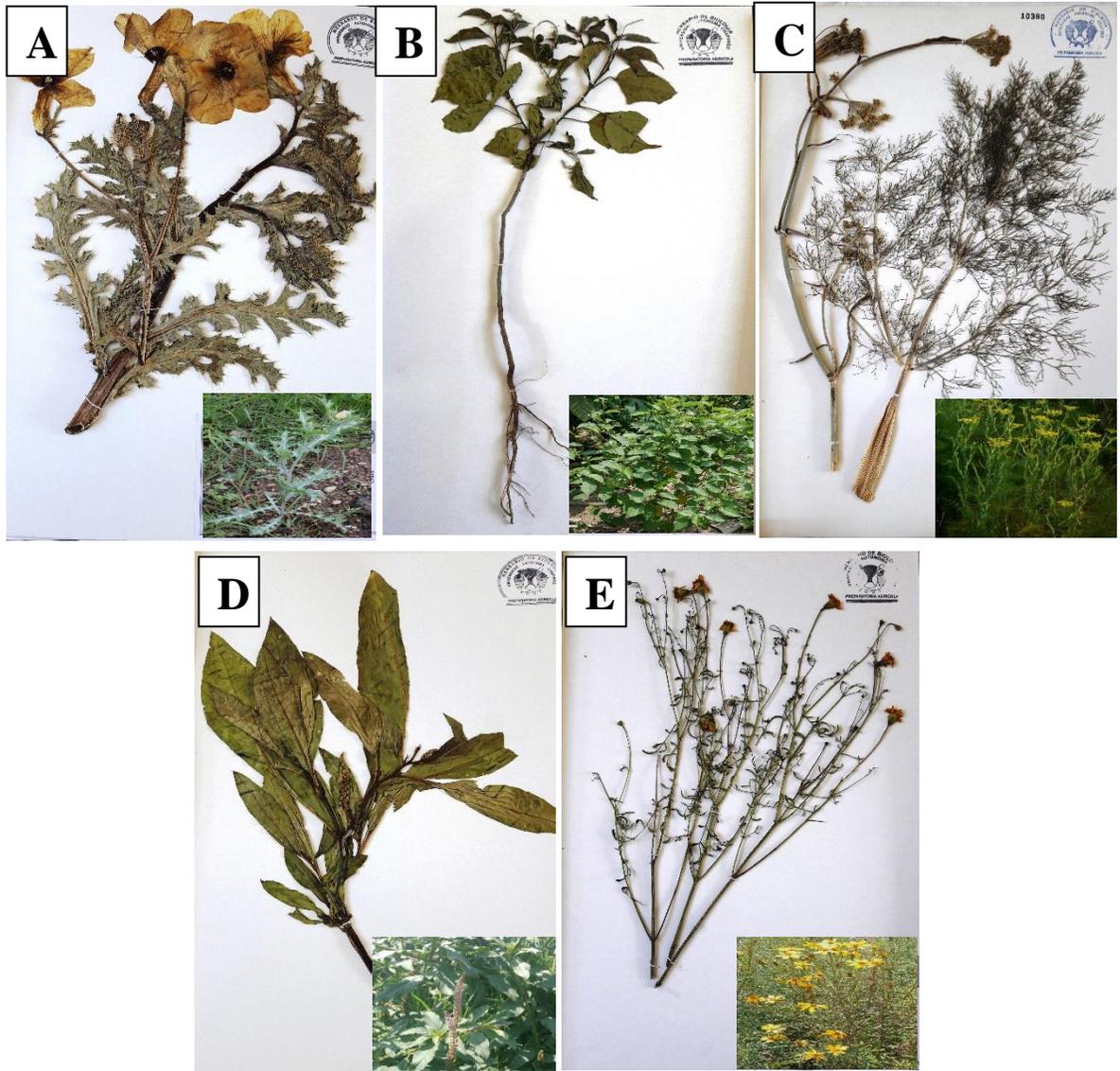


Fig.7. Identificación taxonómica de *Argemone mexicana* L. (A), *Croton xalapensis* G.L. Webster (B), *Foeniculum vulgare* L. (C), *Phytolacca icosandra* L. (D), *Tagetes lemmonii* A. Gray (E).

## 4.2 Obtención de extractos vegetales

El mejor rendimiento de los extractos metanólicos se presentó en *Tagetes lemmonii* con un 27.6 %, luego *Argemone mexicana* con 20.8 %, *Phytolacca icosandra* 13.6 %, *Croton xalapensis* 11.9 % y finalmente, *Foeniculum vulgare* con 11.6 % (Cuadro 5).

Cuadro 5. Rendimiento de los extractos metanólicos.

Especie	Rendimiento (%)
<i>F. vulgare</i>	11.6
<i>C. xalapensis</i>	11.9
<i>P. icosandra</i>	13.6
<i>A. mexicana</i>	20.8
<i>T. lemmonii</i>	27.6

## 4.3 Aislamiento e identificación de los hongos fitopatógenos

Los aislamientos de los hongos fitopatógenos *A. solani* y *B. cinerea* coincidieron con la descripción macroscópica y microscópica propuesta por Mendoza (1995). La colonia en PDA de *A. solani* tuvo crecimiento rápido de aspecto veloso, al principio de color gris y después adquirió un tono verde oliváceo, conidióforo oscuro alargado, conidios oscuros, muriformes, obclavado y elíptico. La morfología colonial de *B. cinerea* en PDA fue un micelio blanco, denso, piloso que posteriormente se tornó gris, presentó conidióforo septado, grande y grueso, ramificado en la parte distal, con ápices hinchados y pequeños esterigmas productores de conidios lisos, unicelulares, café claro, de elipsoidales a ovoides (Figura 8)

*F. oxysporum* se identificó de acuerdo con las características descritas por Leslie y Summerell (2006), el hongo en medio de cultivo PDA fue de color violeta claro con micelio blanco, hubo presencia de microconidios en forma de óvalo, elípticos y sin septos, muy abundantes en el micelio aéreo (Figura.8).

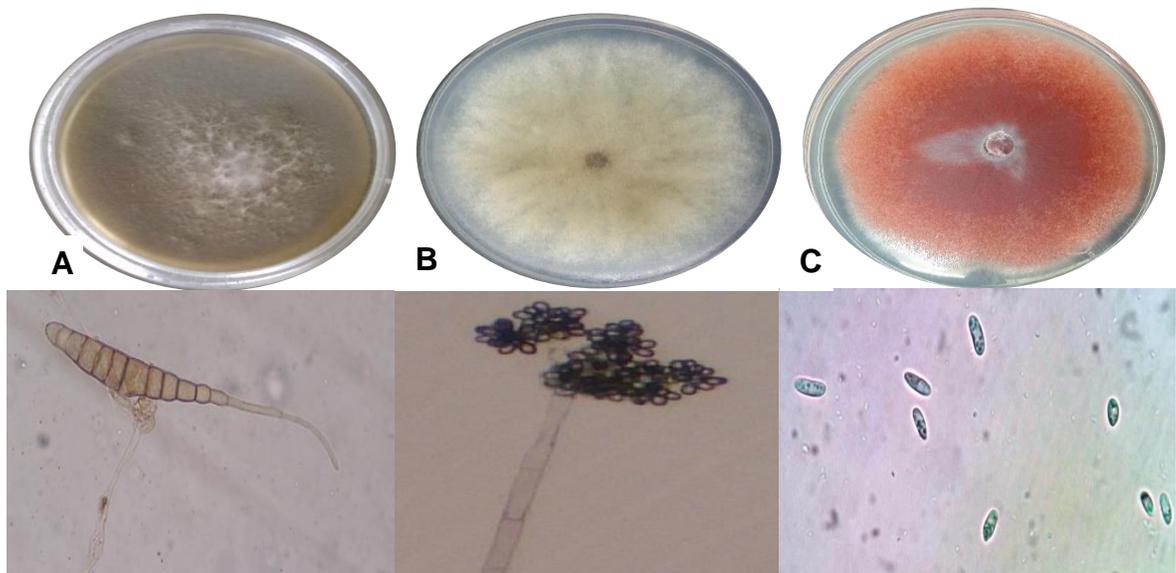


Fig.8. Crecimiento de *A. solani* en PDA, conidióforo y conidio de *A. solani* (A), crecimiento de *B. cinerea* en PDA, conidióforo y conidios de *B. cinerea* (B), crecimiento de *F. oxysporum* en PDA, microconidios de *F. oxysporum* (C).

#### **4.4 Actividad biológica *in vitro* de extractos metanólicos contra *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum***

##### **4.4.1 Análisis combinado.**

El análisis combinado de las variables de respuesta de acuerdo con los factores de estudio involucrados en el experimento, destacó lo siguiente. En el caso de los patógenos, detectó diferencias significativas para el porcentaje de inhibición (Cuadro 6); la comparación de medias de Tukey ( $P=0.05$ ) indicó que el hongo fitopatógeno con mayor sensibilidad a los extractos metanólicos probados fue *B. cinerea*, con la media más alta (79.77 %) en porcentaje de inhibición. Sin embargo, el desarrollo de los hongos *A. solani* y *F. oxysporum* también fue afectado por la aplicación de los extractos (51.71 y 47.93 %, respectivamente).

Con respecto a los muestreos, también se detectaron diferencias significativas, lo que permitió se formaran diferentes grupos con la prueba de comparación de medias, se observa que la media más alta se alcanzó a las 96 h (Cuadro 6), lo que indicó que los extractos metanólicos a partir de este tiempo obtienen el mayor porcentaje de inhibición, no obstante, el mayor porcentaje ocurre hasta las 144 h, ya que a este tiempo los testigos absolutos para cada hongo cubrieron la superficie de la caja Petri, siendo así el final de la evaluación.

Para los tratamientos hubo diferencias altamente significativas, los extractos metanólicos de hoja de *P. icosandra* y *T. lemmonii* a la concentración de 80 % fueron los mejores tratamientos para inhibir el crecimiento de los tres hongos fitopatógenos evaluados (Cuadro 6), dado que revelaron las medias más elevadas y no existió diferencia estadística, sin embargo, las concentraciones siguientes para ambos extractos demostraron actividad biológica sobre los hongos y diferencias significativas con respecto al testigo absoluto, por lo que, los extractos metanólicos de estas dos plantas podrían poseer potencial antifúngico.

Cuadro 6. Análisis combinado a través de los patógenos, muestreos y tratamientos sobre el porcentaje de crecimiento y porcentaje de inhibición.

<b>Inhibición (%)/Agrupamiento Tukey</b>	
<b>Patógenos</b>	
<i>Botrytis cinerea</i>	79.77 a <sup>1</sup>
<i>Alternaria solani</i>	51.73 b
<i>Fusarium oxysporum</i>	47.93 c
DMS <sup>2</sup>	2.04
Pr>F	<.0001
<b>Muestreo</b>	
48 h	57.61 b
96 h	61.75 a
144 h	60.08 a
DMS	1.86
Pr>F	>0.0001
<b>Tratamientos (%)</b>	
<i>P. icosandra</i> 80	76.28 ba
<i>P. icosandra</i> 60	76.62 ba
<i>P. icosandra</i> 40	74.83 ba
<i>P. icosandra</i> 20	69.38 c
<i>T. lemmonii</i> 80	77.35 a
<i>T. lemmonii</i> 60	71.78 bc
<i>T. lemmonii</i> 40	55.49 d
<i>T. lemmonii</i> 20	35.58 e
Testigo absoluto	0 f
DMS	4.01
Pr>F	<.0001

<sup>1</sup>: Medias con las mismas letras no son estadísticamente diferentes (Tukey, p=0.05).

<sup>2</sup>: Diferencia mínima significativa.

Los extractos de *A. mexicana*, *C. xalapensis* y *F. vulgare* no manifestaron actividad en ninguno de los hongos, por lo tanto, únicamente se analizarán los resultados de los extractos de *P. icosandra* y *T. lemmonii*.

#### **4.4.2 Efecto de los tratamientos en la inhibición del micelio de *A. solani***

Los resultados del análisis de varianza mostraron diferencias significativas en el efecto de inhibición causado por los tratamientos sobre el crecimiento de *A. solani* (Cuadro 6).

Cuadro 7. Comparaciones de medias del porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos en *A. solani*.

Tratamiento	Concentración (%)	Media (%)
Pirimetanol	54.6	77.5 a
<i>P. icosandra</i>	80	76.6 a
<i>P. icosandra</i>	40	69.4 b
<i>P. icosandra</i>	60	66.8 cb
<i>T. lemmonii</i>	80	66.2 cb
<i>P. icosandra</i>	20	64.2 cd
Extracto de gobernadora	95	63.6 cd
<i>T. lemmonii</i>	60	62.9 cd
<i>T. lemmonii</i>	40	61 d
<i>T. lemmonii</i>	20	28.1 e
DSH <sup>2</sup>		5.1

<sup>1</sup>: Medias con las mismas letras no son estadísticamente diferentes (Tukey, p=0.05).

<sup>2</sup>: Diferencia Significativa Honesta de Tukey.

El mayor PI (76.6 %) se observó con el extracto metanólico al 80 % de *P. icosandra*, sin diferencias significativas con respecto al testigo positivo químico SCALA® 60 (77.5 %) y superior al testigo positivo orgánico PROGRANIC® Mega (extracto de gobernadora) (63.6 %). El menor valor de PI (28.1 %) se presentó aplicando el extracto metanólico de *T. lemmonii* al 20 % con respecto a los testigos de referencia químico y orgánico (77.5 % y 63.6 % de PI, respectivamente) (Cuadro 7). Todas las concentraciones del extracto metanólico de *P. icosandra* superaron el 60 % de inhibición, inclusive en la dosis más baja de 20 %, donde no hubo diferencia significativa con respecto a PROGRANIC® Mega (extracto de gobernadora) obteniendo un PI de 64.25 y 63.6 % respectivamente (Figura. 9); además, las concentraciones mostraron consistencia, presentando efecto de concentración: un mayor control a mayor concentración.

Para la especie *T. lemmonii* se obtuvieron valores bajos en el porcentaje de inhibición del crecimiento de *A. solani* en comparación con *P. icosandra*, sin embargo, en las concentraciones de 80, 60 y 40 % no hubo diferencias significativas con el testigo positivo orgánico (extracto de gobernadora) (Figura 10).

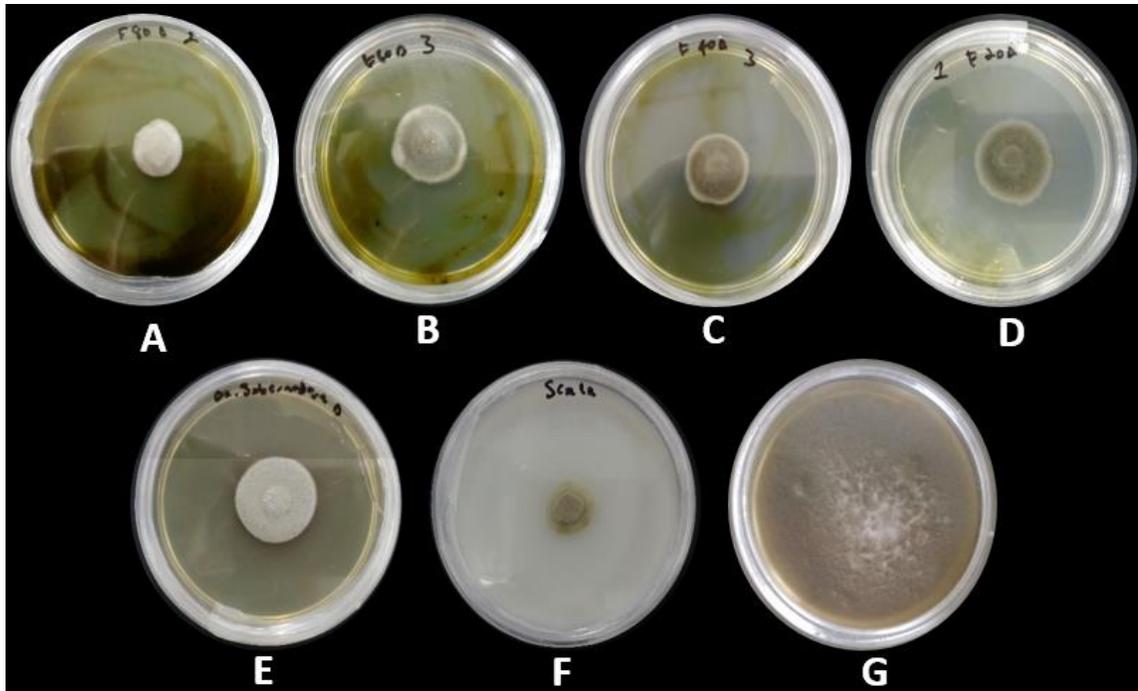


Figura 9. Efecto de los extractos metanólicos de *P. icosandra* sobre *A. solani* en medio de cultivo PDA a las 144 h de crecimiento (a: 80 %, b: 60 %, c: 40 %, d: 20 %), e: extracto de gobernadora, f: pirimetanil, g: testigo absoluto.

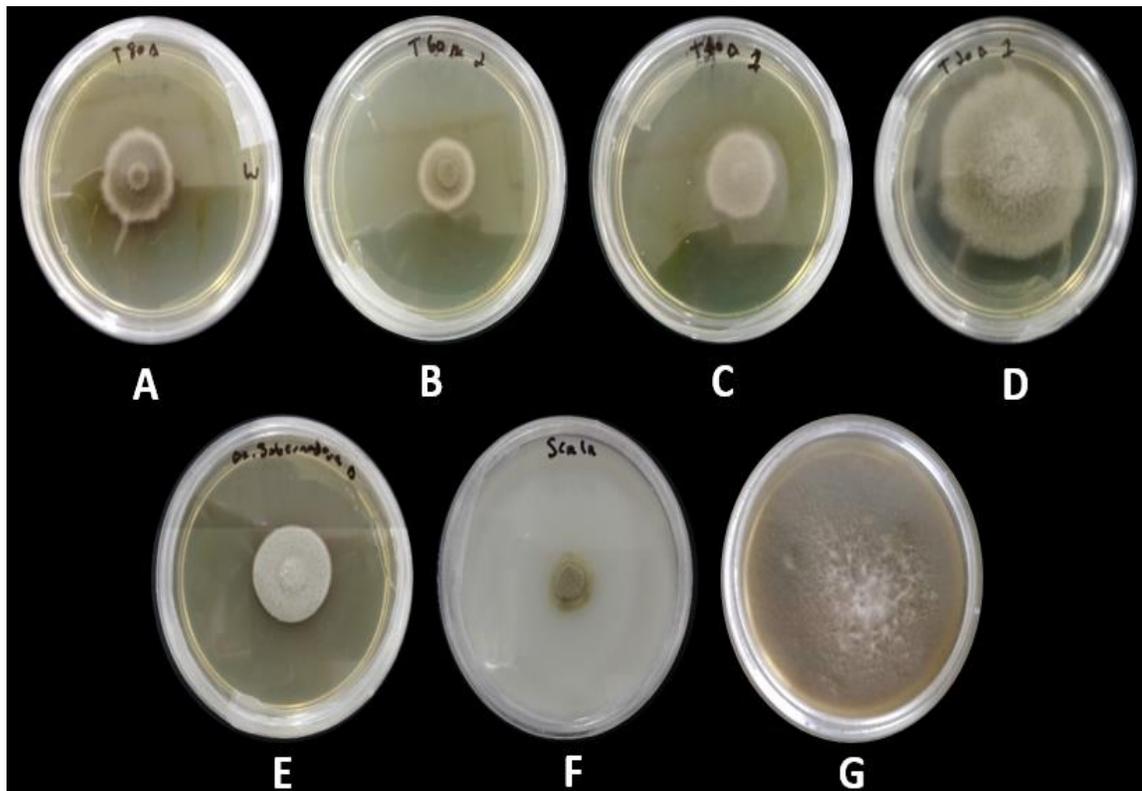


Figura 10. Efecto de los extractos metanólicos de *T. lemmonii* sobre *A. solani* en medio de cultivo PDA a las 144 h de crecimiento (a: 80 %, b: 60 %, c: 40 %, d: 20 %), e: extracto de gobernadora, f: pirimetanil, g: testigo absoluto.

Este extracto también presentó consistencia en el control y conforme disminuye la concentración se reduce el porcentaje de inhibición a valores que no son adecuados para que el extracto sea considerado como un candidato para evaluar su potencial de efecto fungicida.

De manera general, se presentó una tendencia de reducción en el desarrollo micelial del hongo al aumentar la concentración de los extractos (Figura 11).

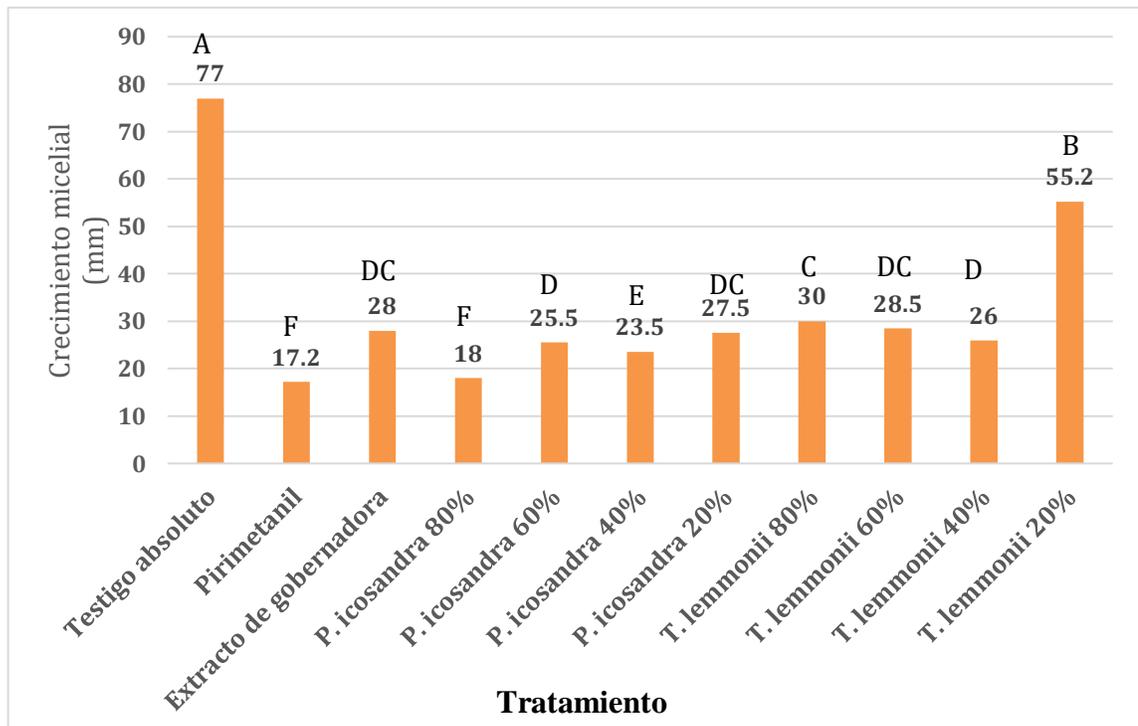


Figura 11. Efecto de los extractos metanólicos de plantas sobre el crecimiento micelial (mm) de *A. solani*. Barras con las mismas letras indican que las medias no fueron estadísticamente diferentes, usando la prueba de Tukey al 5 % de significancia.

#### 4.4.2.1 Concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) de los extractos metanólicos de *P. icosandra* y *T. lemmonii* evaluados contra *A. solani*

El extracto metanólico de *P. icosandra* fue el que presentó la CI<sub>50</sub> más eficiente para *A. solani* de acuerdo al análisis Probit (Cuadro 8), estos datos coinciden con el PIM donde se logró el mayor efecto para inhibir el crecimiento micelial del hongo con respecto al extracto metanólico de *T. lemmonii* y los demás extractos probados.

Cuadro 8. Concentración Inhibitoria Media para los extractos metanólicos de *P. icosandra* y *T. lemmonii* en el crecimiento de *A. solani*.

Extracto	CI <sub>50</sub> (%)
<i>P. icosandra</i>	2.8
<i>T. lemmonii</i>	34.1

#### 4.4.3 Efecto de los tratamientos sobre la inhibición del micelio de *B. cinerea*.

Los resultados del análisis de varianza mostraron diferencias significativas en el efecto de inhibición causado por los tratamientos sobre el crecimiento de *B. cinerea* (Cuadro 9).

Cuadro 9. Comparaciones de medias del porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos sobre *B. cinerea*.

Tratamiento	Concentración (%)	Media (%)
<i>P. icosandra</i>	80	100 a <sup>1</sup>
<i>P. icosandra</i>	60	100 a
<i>P. icosandra</i>	40	100 a
<i>P. icosandra</i>	20	100 a
<i>T. lemmonii</i>	80	100 a
<i>T. lemmonii</i>	60	100 a
<i>T. lemmonii</i>	40	75.6 b
Fenhexamid	50	61 c
<i>T. lemmonii</i>	20	55.4 c
Extracto de gobernadora	95	33.7 d
DSH <sup>2</sup>		12.6

<sup>1</sup>: Medias con las mismas letras no son estadísticamente diferentes (Tukey, p=0.05).

<sup>2</sup>: Diferencia Significativa Honesta de Tukey.

El extracto metanólico de *P. icosandra* presentó el mayor efecto de inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* en todas las concentraciones con un 100 % de PI, siendo estadísticamente más efectivo que el testigo positivo químico ELEVAT® (61 % PI) y que el testigo positivo orgánico PROGRANIC® Mega (extracto de gobernadora) (33.7 % PI) (Figura. 12).

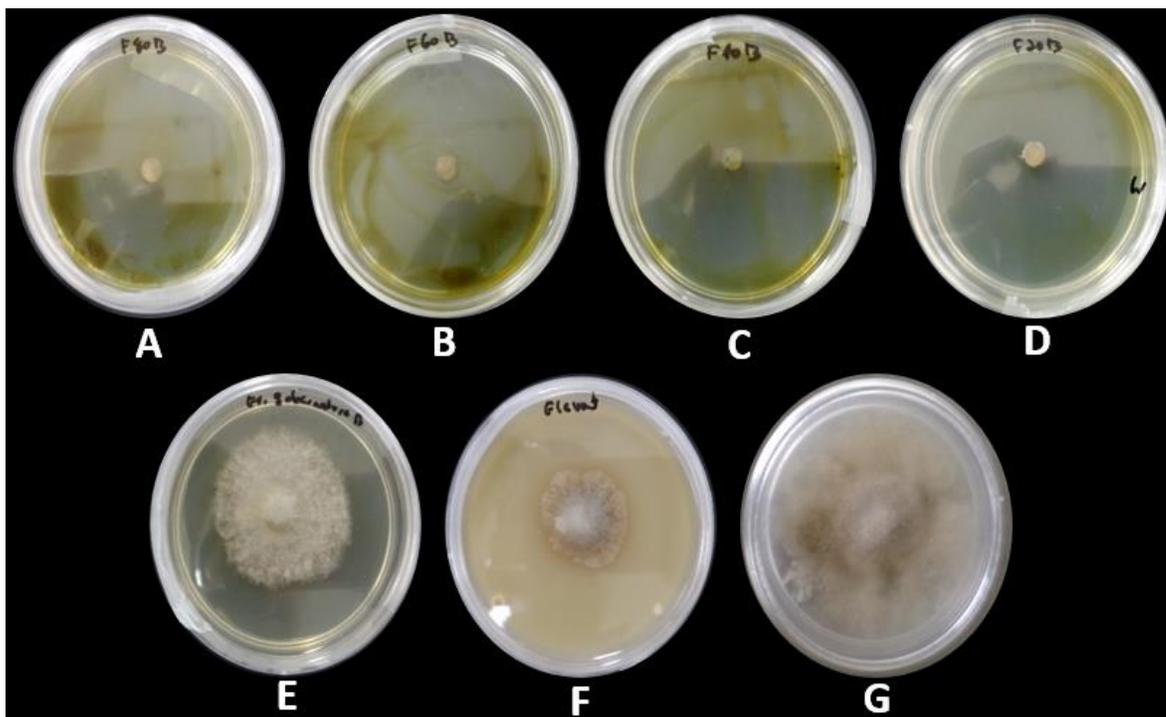


Figura 12. Efecto de los extractos metanólicos de *P. icosandra* sobre *B. cinerea* en medio de cultivo PDA a las 144 h de crecimiento (a: 80 %, b: 60 %, c: 40 %, d: 20 %), e: extracto de gobernadora, f: fenhexamid, g: testigo absoluto.

En *T. lemmonii* también hubo 100 % de inhibición del crecimiento, pero solo a las concentraciones de 80 y 60 %, la concentración de 40 % presento un PI de 75.6 %, superando estas tres concentraciones al testigo positivo químico ELEVAT® (fenhexamid) y a al testigo positivo orgánico PROGRANIC® Mega (extracto de gobernadora), sin embargo, en la concentración más baja del 20 % no hubo diferencia significativa con el testigo positivo químico, pero sí en el testigo positivo orgánico (Figura 13). El extracto fue consistente en el control disminuyendo el crecimiento del hongo con respecto al aumento de la concentración, por lo tanto, esta especie vegetal es candidata para estudios

posteriores contra otros hongos fitopatógeno. Es importante recalcar que este es el primer estudio en donde se ha utilizado esta especie para evaluar el efecto anti fúngico contra *B. cinerea*.

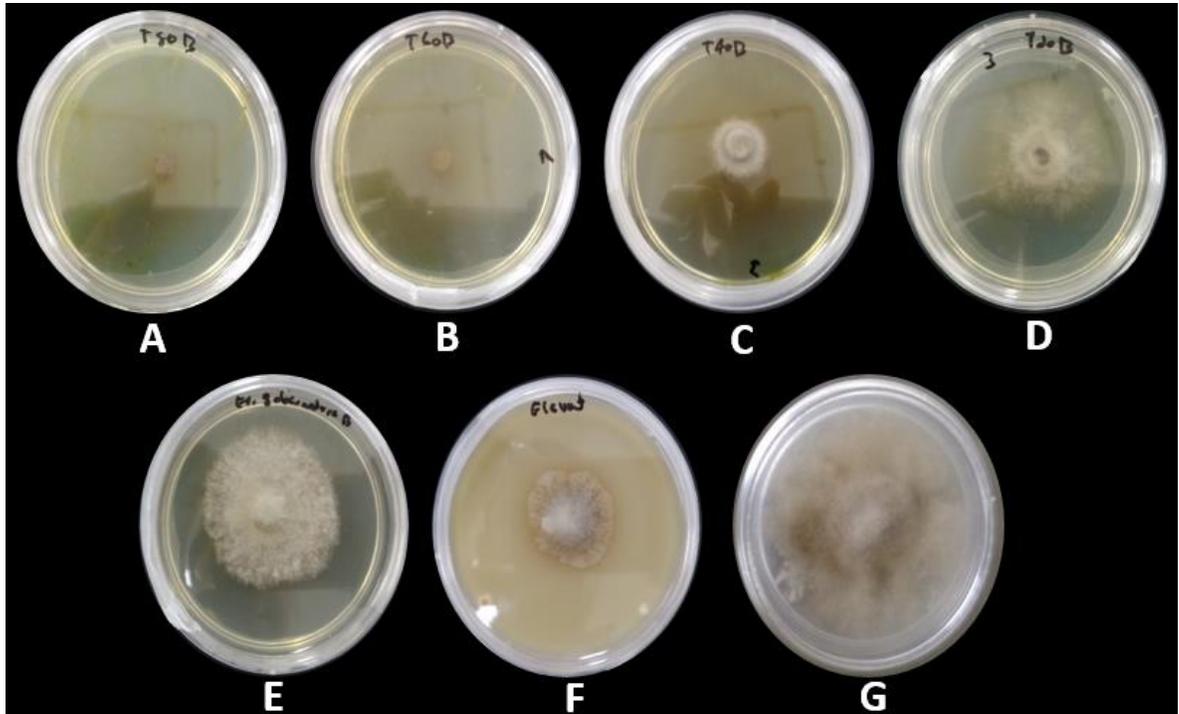


Figura 13. Efecto de los extractos metanólicos de *T. lemmonii* sobre *B. cinerea* en medio de cultivo PDA a las 144 h de crecimiento (a: 80 %, b: 60 %, c: 40 %, d: 20 %), e: extracto de gobernadora, f: fenhexamid, g: testigo absoluto.

Ambas especies inhibieron el desarrollo del hongo en todas las concentraciones probadas, superando a los productos fungicidas químicos y orgánicos, dicho comportamiento se puede observar de manera gráfica en la Figura 14, lo que da una pauta para seguir ensayando su efecto antifúngico a concentraciones menores contra *B. cinerea*.

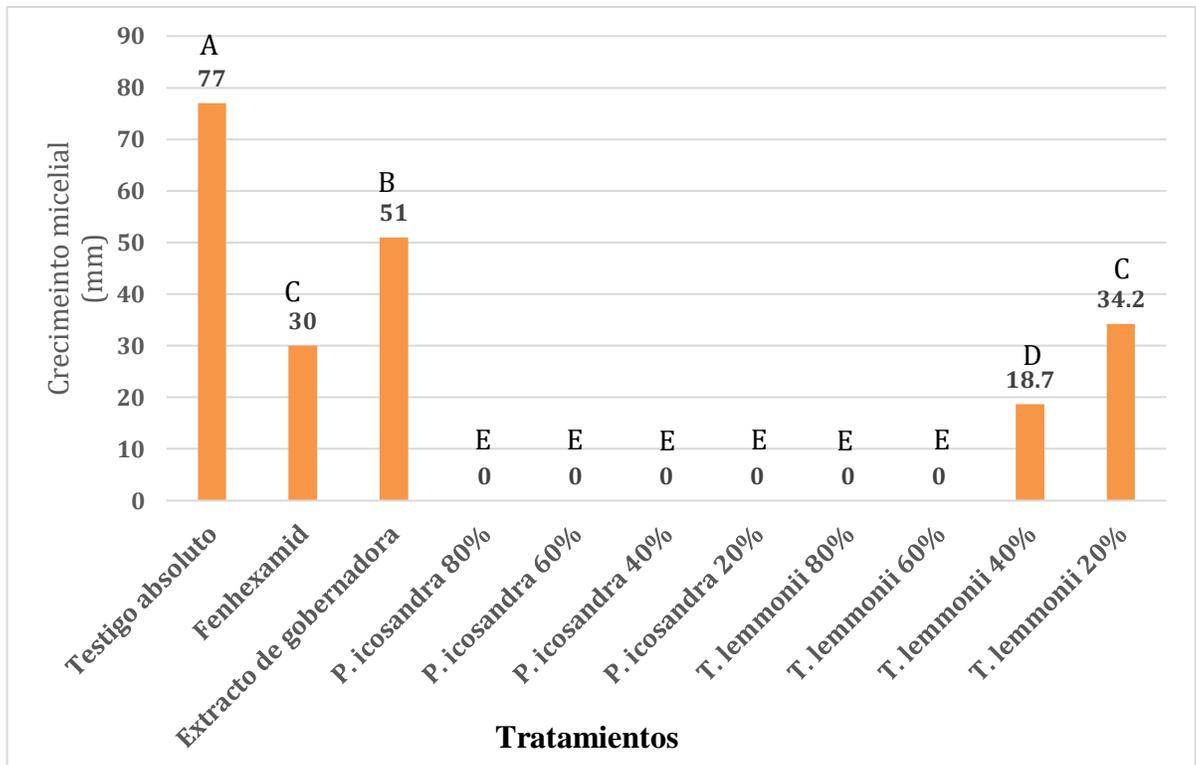


Figura 14. Efecto de los extractos metanólicos de plantas sobre el crecimiento micelial (mm) de *B. cinerea*. Barras con las mismas letras indican que las medias no fueron estadísticamente diferentes, usando la prueba de Tukey al 5 % de significancia.

#### 4.4.3.1 Concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) de los extractos metanólicos de *P. icosandra* y *T. lemmonii* evaluados contra *B. cinerea*

En *P. icosandra* se propone que la  $CI_{50}$  se encuentra en el rango de 0.1 a 20 % y se tendría que determinar mediante ensayos posteriores. Para *T. lemmonii* los datos de la  $CI_{50}$  mediante análisis Probit coinciden con los valores de PIM en las concentraciones evaluadas (Cuadro 10).

Cuadro 10. Concentración Inhibitoria Media para los extractos metanólicos de *P. icosandra* y *T. lemmonii* en el crecimiento de *B. cinerea*.

Extracto	$CI_{50}$ (%)
<i>P. icosandra</i>	0.044
<i>T. lemmonii</i>	19.0

#### 4.4.4 Efecto de los tratamientos sobre la inhibición del micelio de *F. oxysporum*.

Los resultados del análisis de varianza mostraron diferencias significativas en el efecto de inhibición causado por los tratamientos sobre el crecimiento de *F. oxysporum* (Cuadro 11).

Cuadro 11. Comparaciones de medias del porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos sobre *F. oxysporum*.

Tratamiento	Concentración (%)	Media (%)
Tiofanato metílico	70	81.1 a <sup>1</sup>
Extracto de gobernadora	95	70.7 b
<i>T. lemmonii</i>	80	70.7 b
<i>P. icosandra</i>	80	61 c
<i>P. icosandra</i>	60	62.9 c
<i>P. icosandra</i>	40	63.2 c
<i>T. lemmonii</i>	60	59.3 c
<i>T. lemmonii</i>	40	35 d
<i>P. icosandra</i>	20	22.9 e
<i>T. lemmonii</i>	20	20.3 e
DSH <sup>2</sup>		7.4

<sup>1</sup>: Medias con las mismas letras no son estadísticamente diferentes (Tukey, p=0.05).

<sup>2</sup>: Diferencia Significativa Honesta de Tukey.

El valor mayor de PI en el extracto metanólico de *P. icosandra* fue de 63.2 % y se encontró a la concentración del 40%, sin embargo, no hubo diferencia estadística significativa con respecto a las concentraciones del 80 y 60 % y estas tres fueron superadas por el testigo positivo químico CERCOBIN® M con un PI de 81.1 % y por el testigo positivo orgánico PROGRANIC® Mega (extracto de gobernadora) con 70.7 % de PI. La concentración más baja probada (20 %) presentó un PI muy bajo, permitiendo el buen desarrollo del hongo (Figura 15).

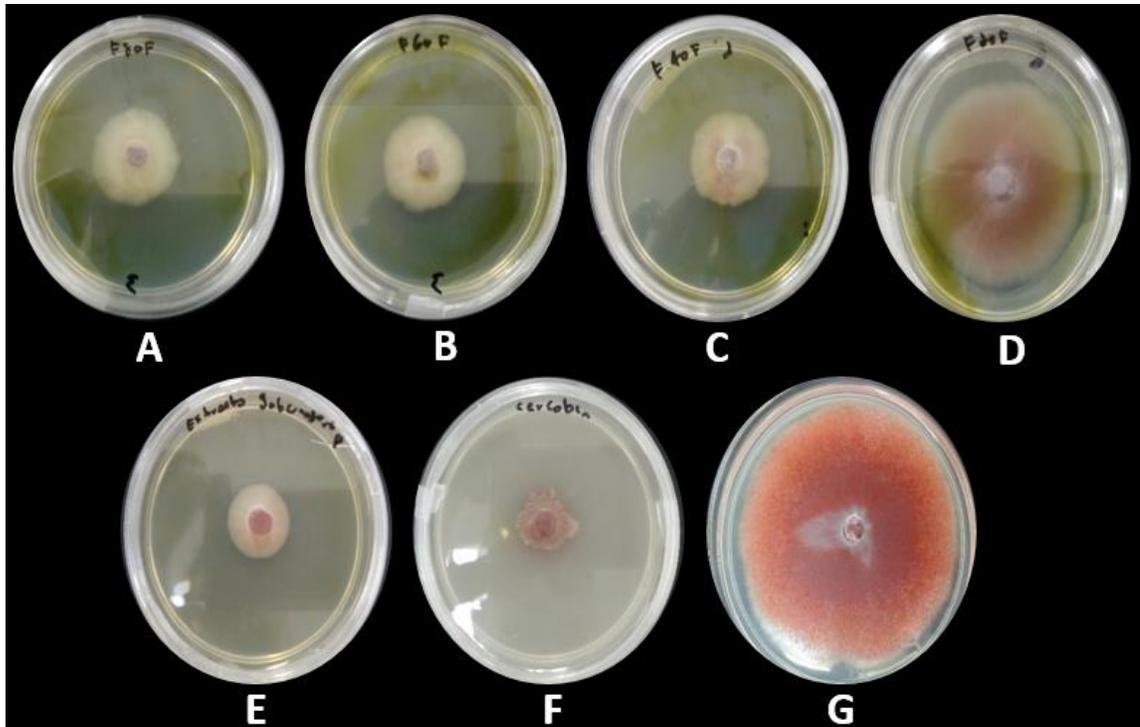


Figura 15. Efecto de los extractos metanólicos de *P. icosandra* sobre *F. oxysporum* en medio de cultivo PDA a las 144 h de crecimiento (a: 80 %, b: 60 %, c: 40 %, d: 20 %), e: extracto de gobernadora, f: tiofanato metílico, g: testigo absoluto.

*Tagetes lemmonii* presentó un PI de 70.7 % a la concentración de 80 % y fue estadísticamente similar que el testigo positivo orgánico PROGRANIC® Mega (extracto de gobernadora), pero con respecto al testigo positivo químico CERCOBIN® si hubo diferencia estadística significativa siendo este mejor. En las concentraciones de 60, 40 y 20 % existieron diferencia estadística significativa entre ellas, pero el PI fue inferior notablemente a los testigos positivos (Figura 16).

Tanto en *P. icosandra* como en *T. lemmonii* a las concentraciones mayores probadas hubo menos desarrollo de *F. oxysporum* con respecto al testigo absoluto (Figura 17) y tal vez aumentando la concentración cercana al 100 % se pueda superar o igualar el efecto de los fungicidas químico u orgánico. En ambos extractos, al disminuir la concentración el desarrollo del hongo aumentó.

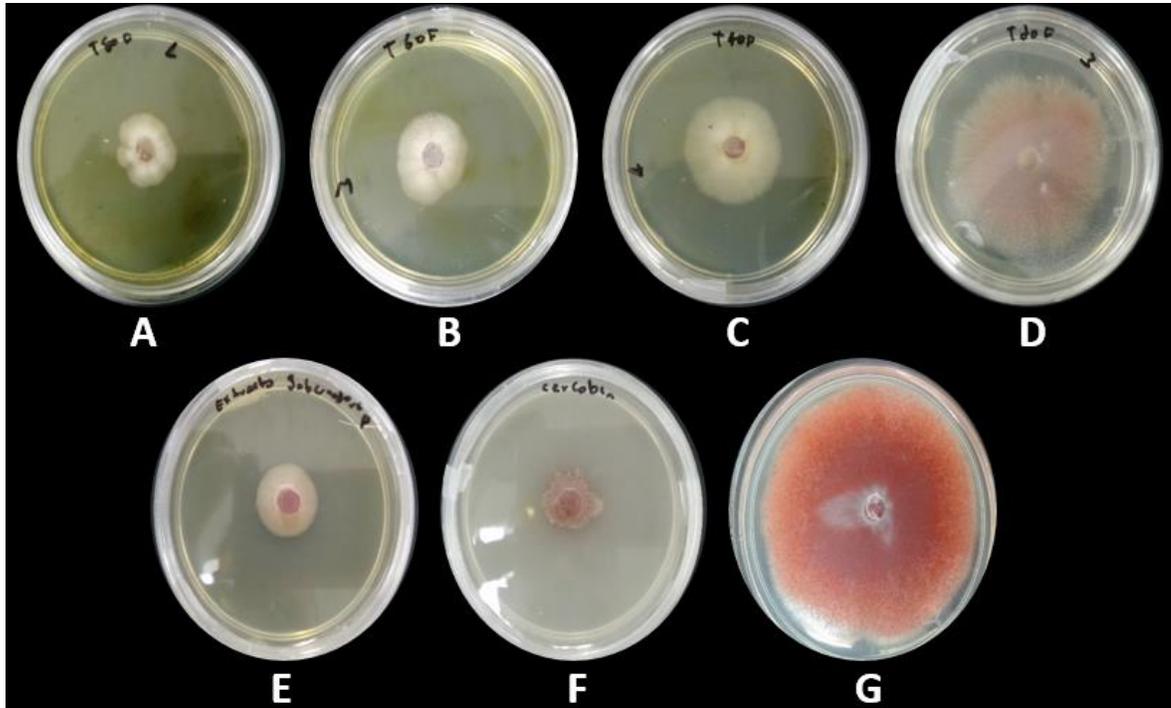


Figura 16. Efecto de los extractos metanólicos de *T. lemmonii* sobre *F. oxysporum* en medio de cultivo PDA a las 144 h de crecimiento (a: 80 %, b: 60 %, c: 40 %, d: 20 %), e: extracto de gobernadora, f: tiofanato metílico, g: testigo absoluto.

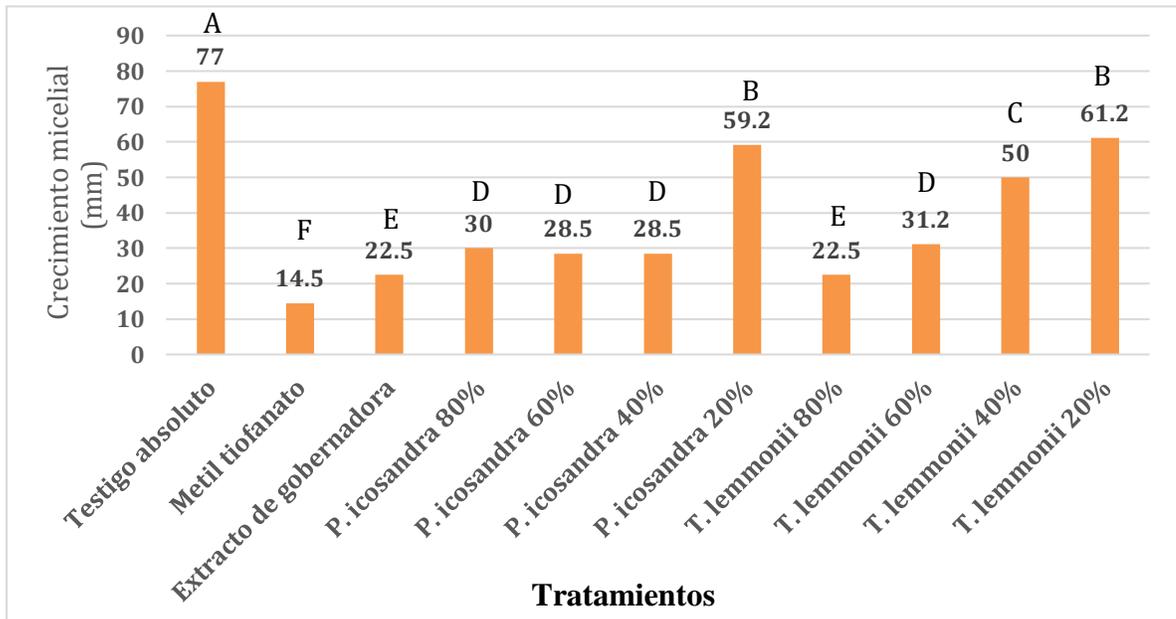


Figura 17. Efecto de los extractos metanólicos de plantas sobre el crecimiento micelial (mm) de *B. cinerea*. Barras con las mismas letras indican que las medias no fueron estadísticamente diferentes, usando la prueba de Tukey al 5 % de significancia.

#### 4.4.4.1 Concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) de los extractos metanólicos de *P. icosandra* y *T. lemmonii* evaluados contra *F. oxysporum*

Para *F. oxysporum*, la CI<sub>50</sub> del extracto metanólico de *P. icosandra* fue de 40.1%, mientras que para el extracto metanólico de *T. lemmonii* fue de 48.0 %, ambos valores son congruentes de acuerdo a los porcentajes de inhibición obtenidos (Cuadro 12).

Cuadro 12. Concentración Inhibitoria Media para los extractos metanólicos de *P. icosandra* y *T. lemmonii* en el crecimiento de *F. oxysporum*.

Extracto	CI <sub>50</sub> (%)
<i>P. icosandra</i>	40.1
<i>T. lemmonii</i>	48.0

#### 4.5 Análisis fitoquímico

Por cromatografía en capa fina se identificó la presencia de alcaloides y flavonoides en el extracto metanólico de *P. icosandra*; mientras que en *T. lemmonii* se encontraron flavonoides y terpenoides; para *A. mexicana* se detectaron flavonoides y terpenoides; en *C. xalapensis* hubo la presencia de alcaloides, terpenoides y flavonoides y en *F. vulgare* se presenciaron terpenoides y flavonoides (Cuadro 13).

Cuadro 13. Metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos de las especies vegetales evaluadas.

Especie	Alcaloides	Flavonoides	Terpenoides
<i>Phytolacca icosandra</i>	+	+	-
<i>Tagetes lemmonii</i>	-	+	+
<i>Argemone mexicana</i>	-	+	+
<i>Croton xalapensis</i>	+	+	+
<i>Foeniculum vulgare</i>	-	+	+

(+) = Presencia, (-) = Ausencia.

## 5 DISCUSIÓN

Existen factores que afectan directamente el rendimiento de la extracción como: los disolventes utilizados, el tiempo de extracción y otros factores que afectan la calidad fitoquímica de un extracto como lo son: la familia y género de la planta, estrés precosecha de la planta, estado fenológico, órgano o parte de la planta, el tiempo transcurrido desde la cosecha hasta su procesamiento, temperatura de extracción, temperatura y método de almacenamiento, entre otros, por lo que los resultados siempre serán variables (Bruneton, 2001).

Para el extracto metanólico de *Phytolacca icosandra*, la concentración de 80 % presentó el mayor efecto de inhibición (76.6 % de PIM) en *A. solani* y las demás concentraciones restantes también presentaron actividad superando el 60 % de PIM (Cuadro 7). No existe registro de esta especie vegetal con acción antifúngica para *A. solani*, sin embargo, hay información para otros hongos fitopatógenos. Juárez (2016) obtuvo un PIM máximo de 43.49 % a la concentración de 75 % de extracto metanólico de *P. icosandra* sobre *Colletotrichum fructicola*. En otro estudio realizado en Argentina se encontró que el extracto metanólico de otra especie de *Phytolacca* (*P. tetramera*) mostró actividad antifúngica en hongos oportunistas patógenos de humanos principalmente sobre *Trichophyton mentagrophytes* (Escalante *et al.*, 2002).

Sin embargo, numéricamente el fungicida Pirimetanil fue el tratamiento que tuvo un efecto superior al extracto de *P. icosandra* para inhibir el crecimiento de *A. solani*, dicha actividad antifúngica de esta sustancia en condiciones *in vitro* se debe a los mecanismos descritos por (Leroux y Gredt, 1996), por lo que es altamente eficaz para inhibir la germinación de los conidios y el alargamiento del tubo germinal en diferentes hongos fitopatógenos (Li y Xiao, 2008). Este fungicida es de los más usados para el control de tizón temprano y otras enfermedades en diferentes cultivos, sin embargo, se ha reportado resistencia de *A. solani* a esta sustancia.

No se encontraron diferencias significativas entre el fungicida pirimetanil y la concentración más alta probada del extracto metanólico de *P. icosandra*, por lo que esta planta podría ser una alternativa para el control de *A. solani*, como un método ecológico y eficaz contra este patógeno, reduciendo las desventajas que brinda el control químico, además se contribuye a la suma a la lista de plantas con actividad biológica contra este hongo.

Todas las concentraciones probadas del extracto metanólico de *P. icosandra* inhibieron 100 % el crecimiento de *B. cinerea* (Cuadro 9), este comportamiento concuerda con lo observado por Mecalco (2014) quien encontró en el extracto hexánico de *P. icosandra* un 100 % de inhibición de *Colletotrichum gloeosporioides* a la concentración de 50 %. Bajpai *et al.*, (2012) probaron el extracto metanólico de *P. americana* a una concentración de 3 000 ppm y obtuvieron un 85 % de efectividad en el control de *B. cinerea* en tomate *in vivo*, por lo que los autores sugieren que el extracto de esta especie se podría desarrollar como un agente de protección contra moho gris en tomate.

El extracto metanólico de *P. icosandra* superó en inhibición al fungicida fenhexamid (Cuadro 9) que es uno de los botriticidas más importantes, desafortunadamente la presión selectiva ejercida del control químico contra este patógeno induce el desarrollo de aislamientos resistentes a los fungicidas (Panbianco *et al.*, 2015), por lo que este resultado permite que el extracto de *P. icosandra* sea un aspirante para ensayar su efecto *in vivo* contra moho gris en tomate, y así generar una alternativa de manejo para esta enfermedad y prevenir los efectos negativos causados por los fungicidas sintéticos.

El hongo *F. oxysporum* presentó mayor sensibilidad al fungicida metiltiofanato que al extracto metanólico de *P. icosandra* (Cuadro 11) y aunque, este extracto a las concentraciones de 40, 60 y 80 % sobrepasaron el 60 % de PIM para *F. oxysporum*, no representa una buena opción para el control de este hongo, ya que sus características biológicas, como gran variabilidad genética y su amplia distribución dificulta el manejo de este patógeno (Rodríguez y Montilla, 2002),

por lo que se requiere un mayor porcentaje de inhibición para que una sustancia pueda ser considerada dentro de un plan de manejo de la enfermedad.

De manera general, el extracto metanólico de *P. icosandra* presentó actividad antifúngica sobre los tres hongos fitopatógenos evaluados (Cuadro 6). En las especies del género *Phytolacca* se han identificado una diversidad de metabolitos secundarios como triterpenos, flavonoides, esteroides, lignanos, taninos, alcaloides, entre otros (Montes, 2011).

Juárez (2015) atribuyó el efecto antifúngico sobre *C. fructicola* del extracto metanólico de *P. icosandra* a la presencia de alcaloides y flavonoides, y Mecalco (2014) asignó dicha actividad en *C. gloesporioides* a la existencia de saponinas en el extracto hexánico de *P. icosandra* (Treyvaud *et al.*, 2000). Por cromatografía en capa fina, en el presente estudio se encontró la presencia de alcaloides, ya que se observaron manchas de color marrón, lo cual coincide con lo indicado por Wagner y Bladt (1996) (Cuadro 13). El mecanismo de acción de los alcaloides consiste en la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos mediante intercalación con las pares de bases del ADN (Dodd *et al.*, 1989). La presencia de flavonoides en la especie por la aparición de coloraciones amarilla-naranjas y verde amarillas (Wagner y Bladt) (Cuadro 13) podrían explicar las formas para impedir el desarrollo de microorganismos: inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos (Wu *et al.*, 2013), y la otra, son causantes del daño a la membrana celular provocando cambios en la fluidez, lo que ocasiona la salida de algunos compuestos intracelulares (Tsuchiya y Linuma, 2000), por lo que, se le puede adjudicar a la acción combinada de estos metabolitos secundarios la actividad antifúngica del extracto metanólico de *P. icosandra*, aunque pudieron haber participado otros compuestos como péptidos antimicrobianos, los cuales no se analizaron en el presente estudio.

Diferentes trabajos se han dirigido para investigar los diferentes compuestos presentes en las plantas del género *Phytolacca* responsables de ejercer una acción contra hongos. En un trabajo realizado por Shao *et al.*, (1999) obtuvieron un péptido antifúngico de semillas de *P. americana* denominado PAFP-s, el cual

demostró un amplio espectro de actividad entre diversos hongos, esta proteína mostró similitud con un péptido antimicrobiano de semillas de *Mirabilis jalapa*. Por otro lado, Escalante *et al.* (2008) aislaron de bayas de *P. tetramera* un glucósido triterpenoide antiespumante que altera la morfología de levaduras y mohos, las cuales fueron similares a las producidas por enfumafungina, un inhibidor de la (1-3)- $\beta$ -D- glucanosintasa, una enzima que cataliza la síntesis de (1-3)- $\beta$ -D- glucano, uno de los principales polímeros de la pared celular en hongos.

Por otro lado, es muy poca la información que se ha documentado sobre la actividad contra hongos por *T. lemmonii*, aunque se ha reportado la actividad biológica de algunas especies de *Tagetes*, usado ampliamente en la medicina popular, también se ha usado como insecticida natural y fungicida.

Para el presente estudio, el extracto metanólico de *Tagetes lemmonii* mostró actividad antifúngica sobre *A. solani* y el mayor efecto de inhibición se observó en la concentración de 80 % (66.2 %) siendo superado solamente por el fungicida sintético pirimetanil (77.5 %) (Cuadro 7). En una investigación realizada a cabo por Singh *et al.* (2003) señalaron que el aceite esencial de *T. erecta* tiene actividad antifúngica contra *Aspergillus niger* y *A. terreus*, hongos pertenecientes al orden moniliales, grupo en el que se ubica a *A. solani*, dicha actividad fue atribuida a la presencia de 26 compuestos activos en el aceite, donde los principales constituyentes fueron (Z)- $\beta$ -ocimeno (42.2%), dihidrotagetona (14.3%), (Z)-tagetona (8.3%), limoneno (7.3%) y (E)-ocimenona (5.3%).

El aceite obtenido a partir de hojas de *T. minuta* y *T. filifolia* mostraron una fuerte fungitoxicidad inhibiendo completamente el crecimiento micelial de *Sclerotium cepivorum*, *Colletotrichum coccodes* y *Alternaria solani*. Los componentes activos se caracterizaron por CG/MS. Dos quimiotipos (ricos en ocimeno y en ocimenona) de *T. minuta* y un quimiotipo rico en (E)- enethole de *T. filifolia* exhibieron inhibición micelial a 5 000, 3 000 y 2 000 ppm, respectivamente (Zygodlo *et al.*, 1994).

Al respecto, Mares *et al.*, (2004) reportaron el efecto del extracto metanólico de *T. patula* (50 mg ml<sup>-1</sup>) en *Pythium ultimum* con un 51.4 % de inhibición, y el estudio de microscopía electrónica de barrido mostró que el extracto indujo alteraciones en las células fúngicas del patógeno.

*B. cinerea* presentó sensibilidad al extracto metanólico de *T. lemmonii* y en las concentraciones a 80 y 60 % se observó un porcentaje de inhibición mayor (100 %) de inhibición, inclusive superó al botriticida fenhexamid. Hay estudios que revelan el efecto de extractos de especies de *Tagetes* en *Botrytis*, como lo reportan Mares *et al.*, (2002) quienes al usar el extracto metanólico de 10 cultivares de *T. patula* inhibieron el desarrollo de *B. cinerea*, observaron consistencia en el control de este hongo, pues al aumentar la dosis, el porcentaje de inhibición fue mayor. La actividad antifúngica de *T. patula* también se ha reportado en diferentes trabajos realizados en China, estos resultados podrían sugerir que los compuestos en esta especie vegetal podrían servir de modelo para el diseño y desarrollo de algunos fungicidas para el futuro.

En *F. oxysporum* el extracto metanólico de *T. lemmonii* al 80 % presentó 70.7 % de porcentaje de inhibición, inferior del fungicida metiltiofanato (81.1 %), en las demás concentraciones probadas, el porcentaje de inhibición fue disminuyendo conforme la concentración fue disminuyendo (Cuadro 11), este hongo mostró mayor resistencia al extracto respecto a *B. cinerea* (Cuadro 6). Un comportamiento similar fue reportado por Mares *et al.* (2002) donde *F. moniliforme* fue más resistente al extracto metanólico de *T. patula* que *B. cinerea*, sin embargo, en el extracto del cultivar de *T. patula* número seis hubo un porcentaje de inhibición del 77.6 % a la concentración de 50 50 mg ml<sup>-1</sup> para este hongo, datos que concuerdan con lo observado en la presente investigación. Por otro lado, Thembo *et al.*, (2010) informaron que los extractos acuosos y orgánicos de *T. minuta* tienen actividad antifúngica en aislamientos de cuatro hongos de importancia agrícola, los extractos orgánicos mostraron actividad inhibidora del crecimiento contra la mayoría de los aislamientos de

*Fusarium*, estos autores indican que los constituyentes químicos de estos extractos de la especie podrían desarrollarse como posibles fungicidas.

Además de tener actividad contra hongos, los extractos vegetales de especies de *Tagetes* han mostrado actividad biológica en bacterias. Se ha reportado que el extracto metanólico de las flores de *T. patula* inhibió el crecimiento de *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. y *Micrococcus luteos*, siendo el primer reporte de la actividad antimicrobiana de extractos de *T. patula* (Faizi *et al.*, 2008).

Se han identificado aproximadamente 126 metabolitos secundarios en plantas de *Tagetes*, como derivados fenólicos, fenilpropanoides, derivados de tiofeno, derivados de benzofunano, triterpenoides, esteroides, alcaloides, flavonoides, carotenoides, y otros, responsables de propiedades insecticidas, nematocidas, bactericidas y fungicidas (Xu *et al.*, 2012). En el presente trabajo se identificó mediante cromatografía en capa fina la presencia de flavonoides y terpenoides en el extracto metanólico de hojas de *T. lemmonii*, según lo descrito por Wagner y Bladt (1996) (Cuadro 13). Mendoza (2015) identificó 31 compuestos presentes en el aceite esencial de *T. lemmonii*, los cuales fueron de naturaleza terpénica, siendo los más abundantes el anetol, *trans*-tagetona,  $\beta$ -ocimeno,  $\beta$ -cariofileno y 4-etil-4-metil-1-hexano, *cis*-tagetona, verbenona y *cis*-verbenona, el autor reporta 98 % de mortalidad de ninfas de *Diaphorina citri* al aplicar el aceite esencial a una concentración de 10 mg mL<sup>-1</sup>

De igual manera, Morita y Subagio (1957) encontró la existencia de flavonoides en el extracto metanólico de hojas y flores de *T. erecta*. Así mismo, Vasudevan *et al.* (1997) mencionan que tanto las flores como las hojas de *Tagetes* contienen terpenoides, y que la concentración y composición en los diferentes extractos varían de acuerdo a la especie.

El extracto metanólico de *T. lemmonii* exhibió actividad antifúngica sobre los tres hongos evaluados (Cuadro 6), y dicha función se le podría conferir a la presencia simultánea de flavonoides (Cuadro 13), pero más a los terpenoides

(Cuadro 13) que causan efectos tóxicos en la estructura y función de la membrana celular de los microorganismos (Sikkema *et al.*, 1995).

Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que esta especie de *Tagetes* se añade a la lista de plantas de este género con propiedades antifúngicas sobre hongos de importancia agrícola, lo que da una pauta para seguir realizando estudios relacionados a su actividad biológica y presencia de sus metabolitos secundarios.

Se ha reportado que los principales compuestos en la resina de *Larrea tridentata* son los lignanos fenólicos, saponinas, flavonoides, aminoácidos y minerales (Saldívar, 2003). Esta especie vegetal es aprovechada ampliamente para el desarrollo de fungicidas y bactericidas en la agricultura, y en México existen productos registrados de esta especie para el control de diversas enfermedades.

El fungicida comercial a base de extracto de *Larrea tridentata* no superó en porcentaje de inhibición a los extractos metanólicos de *P. icosandra* y *T. lemmonii* al 80 % en los tres hongos fitopatógenos probados (Cuadros 7, 9 y 11).

El análisis fitoquímico del extracto metanólico de hoja de *Argemone mexicana* mostró la presencia de flavonoides y terpenoides, en *Croton xalapensis* hubo alcaloides, flavonoides y terpenoides y en *Foeniculum vulgare* se identificó la presencia de flavonoides y terpenoides (Cuadro 6), sin embargo, ninguna de estas especies presentó actividad antifúngica (Cuadro 13).

El metanol es un disolvente polar, con el cual se pueden extraer varios tipos de metabolitos secundarios con diferente actividad antimicrobiana tales como alcaloides, glucósidos triterpénicos, taninos, lactonas sesquiterpénicas y compuestos fenólicos (Talibi *et al.*, 2014), aunque es difícil determinar el papel preciso de cada metabolito secundario. Los flavonoides son un grupo de compuestos orgánicos que se producen ampliamente en todas plantas y que

sirven de diversas funciones fisiológicas, es decir, poseen propiedades antioxidantes, protegen contra la radiación UV, proporcionan color en flores, frutos, hojas y algunos son insecticidas y fungicidas (Szultka *et al.*, 2013).

Los alcaloides se clasifican en diferentes grupos, están los alcaloides de indol terpenoides (TIA) que incluyen más de 3 000 compuestos con actividad antineoplásica y se sintetizan a partir de triptófano, algunos alcaloides de este tipo desempeñan un papel en la protección de las plantas contra plagas y patógenos (Facchini, 2001). Otro grupo, los alcaloides de bencilisoquinolina (BIA) se sintetizan a partir de la condensación de tirosina, contiene aproximadamente 2500 compuestos con propiedades farmacológicas como morfina (analgésico), codeína (supresor de la tos), papaverina (relajante muscular), sanguinarina y berberina (agente antimicrobiano), etc., y se encuentran distribuidos en diferentes familias de plantas. Un tercer grupo, los alcaloides de tropano incluyen hiosciamina y escopolamina, que se derivan de especies de plantas de *Hyoscyamus*, *Atropa* y *Datura*. Los alcaloides de purina se sintetizan a partir de los nucleótidos de la purina, siendo la cafeína y teobromina los más comunes (Ziegler y Facchini, 2008). Por lo tanto, la diversa actividad que presentan diversos tipos de alcaloides podrían explicar la actividad encontrada en el presente estudio en *P. icosandra*.

Por otro lado, los terpenos desempeñan un papel vital en la defensa vegetal contra insectos, patógenos y mamíferos, algunos son compuestos volátiles conocidos como aceites esenciales que participan en la señalización a polinizadores, y glicósidos terpénicos llamadas saponinas (Taiz y Zeiger, 2006).

Aunado a lo anterior, la diferente actividad de los extractos de las especies vegetales estudiadas en el presente trabajo se podría explicar por varios factores: la respuesta diferencial del hongo, patogenicidad, polaridad del disolvente usado y concentración, y mecanismos de resistencia por parte del patógeno (Díaz, 2016).

El presente estudio indica que la aplicación de extractos de plantas como agentes de control *in vitro* resultó ser eficaz en el manejo para los patógenos que dañan el cultivo de tomate y los extractos metanólicos de *P. icosandra* y *T. lemmonii* pueden ser una alternativa atractiva, ya que se componen de metabolitos secundarios con actividad biológica sobre hongos fitopatógenos en tomate, y su uso evita la aplicación de fungicidas químicos. Sin embargo, hace falta cotejar en estudios *in vivo*.

Tratando de extrapolar los valores de rendimiento y de CI<sub>50</sub> obtenidos para cada extracto con cada patógeno, se determinó la aplicación práctica que pueden tener estos extractos metanólicos, y en el Cuadro 14 se refleja su potencial para ser usados en campo en aplicaciones de material vegetal y de extracto en Kg por hectárea.

Cuadro 14. Valores para la aplicación práctica de los extractos metanólicos en campo.

<b>Especie</b>	<b>Patógeno</b>	<b>Cantidad de Material vegetal (Kg) / Ha</b>	<b>Cantidad de extracto (Kg) / Ha</b>
<i>P. icosandra</i>	<i>A. solani</i>	41	5.6
	<i>B. cinerea</i>	0.645	0.88
	<i>F. oxysporum</i>	586.60	80
<i>T. lemmonii</i>	<i>A. solani</i>	245.34	68
	<i>B. cinerea</i>	137.10	38
	<i>F. oxysporum</i>	346.30	96

La mayoría de los disolventes no pueden utilizarse en el contexto de sistemas de producción orgánica porque su uso no está permitido, pero si en la producción convencional. Por esta razón, es necesario buscar disolventes que permitan extraer más y diferentes compuestos, también estos solventes deben ser reconocidos como seguros para ser utilizados bajo sistemas de producción orgánica. La eficiencia de los solventes convencionales en la extracción

fitoquímica se debe a sus propiedades de polaridad (Castillo *et al.*, 2010). Se sabe que el metanol puede tener efectos adversos en la salud humana por lo que, si se piensa explotar de manera masiva estos recursos naturales para el desarrollo de fungicidas botánicos, se debe de considerar el uso de solventes más económicos y menos perjudiciales a la salud de los consumidores.

## 6 CONCLUSIONES

De las cinco especies vegetales evaluadas por su actividad antifúngica, la presencia de los grupos químicos fue específica, sin embargo, solamente *P. icosandra* (alcaloides y flavonoides) y *T. lemmonii* (flavonoides y terpenoides) inhibieron significativamente el desarrollo micelial de los hongos.

Al aumentar la concentración de extractos de *P. icosandra* y *T. lemmonii* provocaron que el crecimiento micelial disminuyera. *B. cinerea* fue el hongo más sensible a la aplicación de los extractos mientras que *F. oxysporum* fue más resistente.

El extracto metanólico al 80 % de *P. icosandra* fue el mejor tratamiento en la inhibición micelial de *A. solani*, efecto similar al producto comercial químico y superó al producto orgánico. El extracto de *T. lemmonii* a la concentración de 80 % tuvo menor efecto que el control químico pero similar al control orgánico.

Los extractos de *P. icosandra* y de *T. lemmonii* al 60 y 80 % inhibieron en 100 % a *B. cinerea*, efecto similar o mayor que el del fungicida químico y orgánico, respectivamente.

En el caso de *F. oxysporum*, el extracto de *T. lemmonii* al 80 % mostró mayor actividad antifúngica que *P. icosandra*, pero su efecto no superó a los controles químico y orgánico.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, R., Gupta, S. K., Agrawal, S. S., Srivastava, S., & Saxena, R. (2008). Oculohypotensive effects of *Foeniculum vulgare* in experimental models of glaucoma. *Indian J. Physiol. Pharmacol*, 52(1), 77-83.
- Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology. 5th eds. *Elsevier Academic Press. USA*, 8, 1-40.
- Amaral, D. O. J. D., Lima, M. M. D. A., Resende, L. V., & Silva, M. V. D. (2008). Differential gene expression, induced by salicylic acid and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infection, in tomato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(8), 1017-1023.
- Amini, J., & Sidovich, D. (2010). The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with Fusarium wilt of tomato. *Journal of Plant Protection Research*, 50(2), 172-178.
- Angeles Martinez, O., Garcia Mateos, M. R., Rodriguez Perez, E., Sanchez Alvarez, E., & Soto Hernandez, M. Toxicidad de extractos vegetales para el control de *Trialeurodes vaporariorum* W. (Homoptera: Aleyroridae) en laboratorio y en cultivo de tomate en invernadero. University of Puerto Rico, San Juan (Puerto Rico).
- Bahraminejad, S., Amiri, R., & Abbasi, S. (2015). Anti-fungal properties of 43 plant species against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 48(4), 336-344.
- Bajpai, V. K., Baek, K. H., Kim, E. S., Han, J. E., Kwak, M. H., Oh, K. H., ... & Choi, G. J. (2012). *In Vivo* Antifungal Activities of the Methanol Extracts of Invasive Plant Species Against Plant Pathogenic Fungi. *The Plant Pathology Journal*, 28(3), 317-321.

- Baka, Z. A., & Rashad, Y. M. (2016). Alternative control of early blight of tomato using plant extracts from *Acacia nilotica*, *Achillea fragrantissima* and *Calotropis procera*. *Phytopathologia Mediterranea*, 55(1), 121.
- Balandrin, M. F., Klocke, J. A., Wurtele, E. S., & Bollinger, W. H. (1985). Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science(Washington)*, 228(4704), 1154-1159.
- Basu, P. K. (1974). Measuring early blight, its progress and influence on fruit losses in nine tomato cultivars. *Can Plant Dis Surv*, 54(2), 45-51.
- Benner, J. P. (1993). Pesticidal compounds from higher plants. *Pest Management Science*, 39(2), 95-102.
- Bennett, R. N., & Wallsgrave, R. M. (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New phytologist*, 127(4), 617-633.
- Berry, P. E., Yatskievych, K., & BK (Ed.) HOLST. (1995). Flora of the Venezuelan Guayana (Vol. 1). St. Louis: Missouri Botanical Garden.
- Brahmachari, G., Gorai, D., & Roy, R. (2013). *Argemone mexicana*: chemical and pharmacological aspects. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(3), 559-575.
- Bravo, L. L., Bermúdez, T. K., & Montes, B. R. (1997). Identificación de alcaloides de *Cestrum nocturnum* y su efecto sobre crecimiento y esporulación de *Fusarium moniliforme*. Memorias del VI Congreso Nacional de Micología. IX Jornadas Científicas. Tapachula. Chiapas, México. *Resumen*, 35.
- Bruneton, J. B., & Bruneton, J. G. (2001). Farmacognosia: fitoquímica plantas medicinales. Acribia,

- Cano R. P. (2004). Producción orgánica de tomate bajo invernadero en la comarca lagunera. Memorias del IV Simposio Nacional de Horticultura. Invernaderos: Diseño, Manejo y Producción Torreón, Coah, México, octubre 13, 14 y 15 del 2004.
- Carotenuto, G., Carrieri, R., Tarantino, P., Alfieri, M., Leone, A., De Tommasi, N., & Lahoz, E. (2015). Fungistatic activity of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. bark extracts against fungal plant pathogens and investigation on mechanism of action in *Botrytis cinerea*. *Natural product research*, 29(23), 2251-2255.
- Castillo, F., Hernández, D., Gallegos, G., Mendez, M., Rodríguez, R., Reyes, A., & Aguilar, C. N. (2010). *In vitro* antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 324-328.
- Chaerani, R., Groenwold, R., Stam, P., & Voorrips, R. E. (2007). Assessment of early blight (*Alternaria solani*) resistance in tomato using a droplet inoculation method. *Journal of General Plant Pathology*, 73(2), 96-103.
- Chopra, R. N., & Chopra, R. N. (1969). Supplement to glossary of Indian medicinal plants.
- CNPO. (2010). Consejo Nacional de Producción Orgánica Página web <http://www.cnpo.org.mx>.
- Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop protection*, 22(1), 39-44.
- Datar, V. V., & Mayee, C. D. (1982). Conidial dispersal of *Alternaria solani* in tomato. *Indian phytopathology*.

- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ... & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430.
- Debieu, D., Bach, J., Hugon, M., Malosse, C., & Leroux, P. (2001). The hydroxylanilide fenhexamid, a new sterol biosynthesis inhibitor fungicide efficient against the plant pathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Pest management science*, 57(11), 1060-1067.
- Delgado, E., García-Mateos, M. R., Ybarra-Moncada, M. C., Luna-Morales, C., & Martínez-Damián, M. T. (2012). Propiedades entomotóxicas de los extractos vegetales de *Azadirachta indica*, *Piper auritum* y *Petiveria alliacea* para el control de *Spodoptera exigua* Hübner. *Rev. Chapingo Ser. Hortic*; 18 (1): 55-69.
- Diaz, M. M. A. 2016. Actividad antifúngica y fitotóxica de los extractos vegetales de *Tulbaghia violácea*, *Piper auritum*, *Capsicum chinense*, *Raphanus sativus*, *Brassica napobrassica*, *Dieffenbachia amoena*, *Neriun oleander*. Tesis Doctorado. Instituto de Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, México.
- Dik, A. J., & Wubben, J. P. (2007). Epidemiology of *Botrytis cinerea* diseases in greenhouses. In *Botrytis: biology, pathology and control* (pp. 319-333). Springer Netherlands.
- Dodd, R. H., Ouannes, C., Robert-Gero, M., & Potier, P. (1989). Hybrid molecules: growth inhibition of *Leishmania donovani* promastigotes by thiosemicarbazones of 3-carboxy-beta-carbolines. *Journal of medicinal chemistry*, 32(6), 1272-1276.
- Edwards, R., & Gatehouse, J. A. (1999). Secondary metabolism. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Eds. J Lea and C Leegood, 193-217.

- Escalante, A. M., Santecchia, C. B., López, S. N., Gattuso, M. A., Ravelo, A. G., Delle Monache, F., ... & Zacchino, S. A. (2002). Isolation of antifungal saponins from *Phytolacca tetramera*, an Argentinean species in critic risk. *Journal of ethnopharmacology*, 82(1), 29-34.
- Facchini, P. J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual review of plant biology*, 52(1), 29-66.
- Fairchild, K. L., Miles, T. D., & Wharton, P. S. (2013). Assessing fungicide resistance in populations of *Alternaria* in Idaho potato fields. *Crop Protection*, 49, 31-39.
- Faizi, S., Siddiqi, H., Bano, S., Naz, A., Lubna, Mazhar, K., ... & Khan, S. A. (2008). Antibacterial and Antifungal Activities of Different Parts of *Tagetes patula*.: Preparation of Patuletin Derivatives. *Pharmaceutical Biology*, 46(5), 309-320.
- FAO. (2002). Agroinformación - El cultivo del tomate. 2ª parte. El origen del tomate.
- FAO. (2015). Página web de la FAO. Producción a nivel mundial. Disponible en: [www.fao.org/statistics/es/](http://www.fao.org/statistics/es/).
- Fasio, J. A. C., Rodríguez, T. D. J. M., Estrada, R. S. G., Ortega, J. E. C., Zequera, I. M., & Barajas, A. J. S. (2003). Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder y Hansen, en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(2), 123-127.
- Finney, D.J.1952. Análisis Probit. Cambridge University Press. Cambridge, Inglaterra. 230p.
- Flor, H. H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual review of phytopathology*, 9(1), 275-296.

- Gao, H., Beckman, C. H., & Mueller, W. C. (1995). The nature of tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in polygenically field-resistant marglobe tomato plants. *Physiological and molecular plant pathology*, 46(5), 401-412.
- García, E.R.S. 2001. Determinación de la raza de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* causante de marchitamiento en plantas de tomate (híbrido Sun 0289) cultivadas en el lote de rancho viejo. Informe técnico CIAD/DUC/IT/006/ 01. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Culiacán, Sinaloa, México. 11 p.
- Gordon, T. R., Okamoto, D., & Jacobson, D. J. (1989). Colonization of muskmelon and nonsusceptible crops by *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and other species of *Fusarium*. *Phytopathology*, 79(10), 1095-1100.
- Grayer, R. J., & Harborne, J. B. (1994). A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982–1993. *Phytochemistry*, 37(1), 19-42.
- Grigolli, J. F. J., Kubota, M. M., Alves, D. P., Rodrigues, G. B., Cardoso, C. R., Silva, D. J. H. D., & Mizubuti, E. S. G. (2011). Characterization of tomato accessions for resistance to early blight. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 11(2), 174-180.
- Gurgel, L. A., Sidrim, J. J. C., Martins, D. T., Cechinel Filho, V., & Rao, V. S. (2005). *In vitro* antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. *Journal of ethnopharmacology*, 97(2), 409-412.
- Hammond-Kosack, K. E., & Jones, J. D. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, 8(10), 1773.

- Hernández, A.L.A., Montes, B.R. y Bravo L.L. 1996. Efecto de polvos y aceites esenciales en el desarrollo micelial de *Alternaria porri* y en la protección de la cebolla. Memorias del XXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Guadalajara, Jalisco. 159.
- Jabeen, K., Noureen, K., Naz, S., Iqbal, S., & Hanif, S. (2014). fungistatic effects of *Melia azedarach* l. against early blight of potato. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 26(2), 219-224.
- Jackson R.S. (2014). *Botrytis*. Brock University, St Catharines, ON, Canada. Elsevier.
- Javaid, A. R. S. H. A. D., & Bashir, A. N. I. L. A. (2015). Radish extracts as natural fungicides for management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, the cause of tomato wilt. *Pak. J. Bot*, 47, 321-324.
- Ji, J. J., Zhang, X. F., Wang, W. Q., & Zhang, J. L. (2012). Research progress on control of tomato gray mold. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 28, 109-113.
- Jiménez Borjas, J.L. (2014). Plagas y enfermedades en solanáceas, invernadero y campo abierto. Manual técnico. 2da Edición. 400 p.p.
- Jing, Z., Li-Ting, Y., En-Lin, Y., Hai-Xin, D., Huo-Chun, Y., Zheng-Ke, Z., Chao, Y., Ying- Qian, L. y Gang, F. 2014. Antifungal Activity of Compounds Extracted from Cortex 94 *Pseudolaricis* against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 4905-4910.
- Jones J.B. 2001. Plagas y enfermedades del tomate. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. p.p. 17-18.
- Juárez Vázquez S.B. 2016. Manejo de la antracnosis (*Colletotrichum fructicola*) con extractos orgánicos en frutos de aguacate Hass en poscosecha.

Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. Posgrado en Protección Vegetal. 120 p.p.

- Junior, S. F. P., Alves, V. L., Moura, F. S., Vieira, L. F., Conserva, L. M., & Lemos, R. P. (2006). Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16(3), 397-402.
- Katan, J., & DeVay, J. E. (1991). Soil solarization. cRC Press.
- Kumar, R., Dubey, N. K., Tiwari, O. P., Tripathi, Y. B., & Sinha, K. K. (2007). Evaluation of some essential oils as botanical fungitoxicants for the protection of stored food commodities from fungal infestation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(9), 1737-1742.
- Kwon, Y. S., Choi, W. G., Kim, W. J., cKim, W. K., Kim, M. J., Kang, W. H., & Kim, C. M. (2002). Antimicrobial constituents of *Foeniculum vulgare*. *Archives of pharmacal research*, 25(2), 154-157.
- Larena, I., Sabuquillo, P., Melgarejo, P., & De Cal, A. (2003). Biocontrol of *Fusarium* and *Verticillium* wilt of tomato by *Penicillium oxalicum* under greenhouse and field conditions. *Journal of Phytopathology*, 151(9), 507-512.
- Latha, P., Anand, T., Ragupathi, N., Prakasam, V., & Samiyappan, R. (2009). Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. *Biological Control*, 50(2), 85-93.
- Leiminger, J. H., Adolf, B., & Hausladen, H. (2014). Occurrence of the F129L mutation in *Alternaria solani* populations in Germany in response to Qol application, and its effect on sensitivity. *Plant pathology*, 63(3), 640-650.

- Leroux, P. (2007). Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In *Botrytis: Biology, pathology and control* (pp. 195-222). Springer Netherlands.
- Leroux, P., & Gredt, M. (1996). *In vitro* methods for monitoring pyrimethanil resistance of *Botrytis cinerea* in grapevine. *Bull. OEPP/EPPO Bull*, 26, 186-188.
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2008). *The Fusarium laboratory manual*. John Wiley & Sons.
- Letourneau D, van Bruggen AHC. (2006). Crop protection. In *Organic Agriculture: A Global Perspective*, ed. P Kristiansen, A Taji, J Reganold, pp. 93–121. Clayton, Aust.: CSIRO Publ.
- Li, H. X., & Xiao, C. L. (2008). Baseline sensitivities to fludioxonil and pyrimethanil in *Penicillium expansum* populations from apple in Washington State. *Postharvest biology and technology*, 47(2), 239-245.
- Lin, L. (2009). Studies on the effective component for antitussive from *Tagetes erecta* L. *Heilongjiang University of Chinese Medicine: Harbin*.
- Linares J. J. (2014). Crecimiento de la agricultura orgánica en Mexico. *Revista, Productores de Hortalizas*, edición de enero 2014. P.p 21.
- Lopes, C. A., & Santos, J. D. (1994). *Doenças do tomateiro*. EMBRAPA-CNPQ; EMBRAPA-SPI.
- Ma, Z., & Michailides, T. J. (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 24(10), 853-863.

- Ma, Z., Yan, L., Luo, Y., & Michailides, T. J. (2007). Sequence variation in the two-component histidine kinase gene of *Botrytis cinerea* associated with resistance to dicarboximide fungicides. *Pesticide biochemistry and physiology*, 88(3), 300-306.
- Maiero, M., Ng, T. J., & Barksdale, T. H. (1990). Genetic resistance to early blight in tomato breeding lines. *HortScience*, 25(3), 344-346.
- Malandrakis, A., Markoglou, A., & Ziogas, B. (2011). Molecular characterization of benzimidazole-resistant *B. cinerea* field isolates with reduced or enhanced sensitivity to zoxamide and diethofencarb. *Pesticide biochemistry and physiology*, 99(1), 118-124.
- Mares, D., Tosi, B., Poli, F., Andreotti, E., & Romagnoli, C. (2004). Antifungal activity of *Tagetes patula* extracts on some phytopathogenic fungi: ultrastructural evidence on *Pythium ultimum*. *Microbiological research*, 159(3), 295-304.
- Mares, D., Tosi, B., Romagnoli, C., & Poli, F. (2002). Antifungal activity of *Tagetes patula* extracts. *Pharmaceutical biology*, 40(5), 400-404.
- Mathur, K., & Shekhawat, K. S. (1986). Chemical control of early blight in kharif sown tomato. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, 16(2), 235-236.
- McGovern, R. J. (2015). Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection*, 73, 78-92.
- Mecalco Ruíz Y. 2014. Extractos vegetales de *Opuntia ficus-indica*, *Phytolacca icosandra*, *Arundo donax* y *Sida acuta* para el control *in vitro* de *Colletotrichum gloesporioides*. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Fitotecnia. Instituto de Horticultura. Posgrado en Biotecnología Agrícola. 99 p.p.

- Méndez Zúñiga S.M. 2015. Extractos de aguacate criollo para inhibir el desarrollo de hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Posgrado en Tecnología Agroalimentaria. 72 p.p.
- Mendoza García E. E. (2015). Compatibilidad de extractos vegetales con el parasitoide *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) en el control de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). Colegio de Posgraduados. Instituto de Fitosanidad, Entomología y Acarología.
- Mendoza Zamora C. (1999). Diagnóstico de enfermedades fungosas. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo.
- Mohammadhosseini, M., Sarker, S. D., & Akbarzadeh, A. (2017). Chemical composition of the essential oils and extracts of *Achillea* species and their biological activities: A review. *Journal of Ethnopharmacology*.
- Montes, B. R., Cruz, C. V., & Peralta, D. (1992, August). Estudios fitoquímicos de plantas antifúngicas y su espectro de acción. In *Memorias del XIX Congreso Nacional de Fitopatología*. Saltillo, Coahuila, México (p. 209).
- Montes, E. G. (2011). Estudio Fitoquímico de las Especies: *Phytolacca rugosa* (Phytolaccaceae), *Phytolacca icosandra* (Phytolaccaceae), *Cestrum ruizteranianum* (Solanaceae) y *Ganophyllum giganteum* (Sapindaceae). (Doctoral dissertation, Université de Bourgogne).
- Montes-Belmont, R., & Flores, M. H. E. (2000). Tratamiento de semillas de sorgo con aceites esenciales para el combate de *Fusarium moniliforme*. XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Puerto Vallarta, Jalisco. p.

- Montes-Belmont, R., Cruz-Cruz, V., Martínez-Martínez, G., Sandoval-García, G., García-Licon, R., Zilch-Domínguez, S., ... & Carvajal-Moreno, M. (2000). Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 18(22), 125-131.
- Morita, N., & Subagio, A. (1957). Flavonoids of the flowers and leaves of *Tagetes erecta*. *Journal of Pharmacy Society of Japan*, 77, 31-38.
- O'Neill, T. M., Shtienberg, D., & Elad, Y. (1997). Effect of some host and microclimate factors on infection of tomato stems by *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 81(1), 36-40.
- Panebianco, A., Castello, I., Cirvilleri, G., Perrone, G., Epifani, F., Ferrara, M., ... & Vitale, A. (2015). Detection of *Botrytis cinerea* field isolates with multiple fungicide resistance from table grape in Sicily. *Crop Protection*, 77, 65-73.
- Pasche, J. S., Wharam, C. M., & Gudmestad, N. C. (2004). Shift in sensitivity of *Alternaria solani* in response to QoI fungicides. *Plant Disease*, 88(2), 181-187.
- Peres, M. T., Delle Monache, F., Cruz, A. B., Pizzolatti, M. G., & Yunes, R. A. (1997). Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *Journal of ethnopharmacology*, 56(3), 223-226.
- Rahman, M. M., Alam, M. J., Sharmin, S. A., Rahman, M. M., Rahman, A., & Alam, M. F. (2009). *In Vitro* antibacterial activity of *Argemone mexicana* L.(Papaveraceae). *CMU J. Nat. Sci*, 8(1), 77-84.
- Ramírez, V.J. 1998. Enfermedades de la raíz en tomate. pp. 29-49. En: O.J. Cruz, R. García E. y A. Carrillo F. (eds.). Enfermedades de las Hortalizas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 255 p.

- Ramyabharathi, S. A., Meena, B., & Raguchander, T. (2012). Induction of chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase PR proteins in tomato through liquid formulated *Bacillus subtilis* EPCO 16 against *Fusarium* wilt. *Journal of Today's Biological Sciences: Research & Review*, 1(1), 50-60.
- Rather, M. A., Dar, B. A., Sofi, S. N., Bhat, B. A., & Qurishi, M. A. (2012). *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arabian Journal of Chemistry*.
- Ravikumar, M. C., & Garampalli, R. H. (2013). Antifungal activity of plants extracts against *Alternaria solani*, the causal agent of early blight of tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 46(16), 1897-1903.
- Reyes, R. S.; Gomez, G.; Moreno, M.; Jiménez, R. 1998. "Flavonoids and isoflavonoides with antifungal properties from *Platymiscium yucatanum* Heart Wood", *Holzforschung* 52: 459-462.
- Ribera, A., Cotoras, M., & Zúñiga, G. E. (2008). Effect of extracts from in vitro-grown shoots of *Quillaja saponaria* Mol. on *Botrytis cinerea* Pers. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1803.
- Ríos, D., Santos, B., Díaz, D., García, N. (2003). Ensayos de cultivares de tomate de exportación en Tenerife: II. Comportamiento en postcosecha. *Agrícola Vergel: Fruticultura, Horticultura, Floricultura*, (262), 504-511.
- Rodríguez, D. A., & Montilla, J. O. (2002). Disminución de la marchitez causada por *Fusarium* en tomate con extracto de *Citrus paradisi*.
- Rzedowski G.C., Rzedowski J. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2ª. Ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán, México. 465 p.
- Rzedowski, G. C. de, J. Rzedowski y colaboradores, 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a. ed., 1a reimp., Instituto de Ecología, A.C. y

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad,  
Pátzcuaro (Michoacán).

SAGARPA, (2014). Estudio de oportunidades de mercado e inteligencia comercial y estudio de logística internacional de tomate. Disponible en: [http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios\\_promercardo/TOMATE.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercardo/TOMATE.pdf)

Saldívar, R. H. L. (2003). Estado actual del conocimiento sobre las propiedades biocidas de la gobernadora (*Larrea tridentata* (DC) Coville). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(2), 214-222.

Santos C. M. A. (2006). Evaluación del rendimiento de aceite esencial de hinojo (*Foeniculum vulgare* Miller) procedente de dos niveles altitudinales de Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

Senatore, F., Napolitano, F., Mohamed, M. A. H., Harris, P. J. C., Mnkeni, P. N. S., & Henderson, J. (2004). Antibacterial activity of *Tagetes minuta* L.(Asteraceae) essential oil with different chemical composition. *Flavour and fragrance journal*, 19(6), 574-578.

Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H., & Rocha-Sosa, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355-362.

Sharma, A., Rajendran, S., Srivastava, A., Sharma, S., & Kundu, B. (2016). Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*.

Shao, F., Hu, Z., Xiong, Y. M., Huang, Q. Z., Wang, C. G., Zhu, R. H., & Wang, D. C. (1999). A new antifungal peptide from the seeds of *Phytolacca*

*americana*: characterization, amino acid sequence and cDNA cloning. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1430(2), 262-268.

SIAP. Servicio de información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. 2016. Estadística de producción de tomate rojo. México.

Sikkema, J., De Bont, J. A., & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological reviews*, 59(2), 201-222.

Singh, G., Singh, O. P., De Lampasona, M. P., & Catalan, C. A. (2003). Studies on essential oils. Part 35: chemical and biocidal investigations on *Tagetes erecta* leaf volatile oil. *Flavour and fragrance journal*, 18(1), 62-65.

Singh, S., Srivastava, R., & Choudhary, S. (2010). Antifungal and HPLC analysis of the crude extracts of *Acorus calamus*, *Tinospora cordifolia* and *Celestrus paniculatus*. *Journal of Agricultural Technology*, 6(1), 149-158.

Snyder, W. C., & Hansen, H. N. (1940). The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*, 64-67.

Soylu, S., Yigitbas, H., Soyly, E. M., & Kurt, Ş. (2007). Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of applied microbiology*, 103(4), 1021-1030.

Srivastava, A., & Srivastava, M. (1998). Fungi toxic effect of some medicinal plants (on some fruit pathogens). *Philippine Journal of Science (Philippines)*.

Szultka, M., Buszewski, B., Papaj, K., Szeja, W., & Rusin, A. (2013). Determination of flavonoids and their metabolites by chromatographic techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 47, 47-67.

Takken, F., & Rep, M. (2010). The arms race between tomato and *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 11(2), 309-314.

- Talibi, I., Boubaker, H., Boudyach, E. H., Ait Ben Aoumar, A. (2014). Alternative methods for the control of postharvest citrus diseases. *Journal of Applied Microbiology*, 1-17.
- Thembo, K. M., Vismer, H. F., Nyazema, N. Z., Gelderblom, W. C. A., & Katerere, D. R. (2010). Antifungal activity of four weedy plant extracts against selected mycotoxigenic fungi. *Journal of applied microbiology*, 109(4), 1479-1486.
- Tlalpal Bolaños B. (2010). Enfermedades fungosas y bacterianas en el cultivo de jitomate (*Solanum esculentum*). En, Jitomate, Tecnología para su producción en invernadero. Colegio de Posgraduados. 65-94 p.p.
- Traina, M. E., Fazzi, P., Macrì, C., Ricciardi, C., Stazi, A. V., Urbani, E., & Mantovani, A. (1998). *In vivo* studies on possible adverse effects on reproduction of the fungicide methyl thiophanate. *Journal of Applied Toxicology*, 18(4), 241-248.
- Treyvaud V, Marston A, Dyatmiko W, Hostettmann K.2000. Molluscicidal saponins from *Phytolacca icosandra*. Institut de Pharmacognosie et Phytochimie, Université de Lausanne, Switzerland. *Phytochemistry* 55(6):603-9.
- Tsuchiya, H., & Iinuma, M. (2000). Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine*, 7(2), 161-165.
- United States Dep. Agric. (USDA). (2011). *National Organic Program Handbook*. Washington, DC: USDA Agric. Mark. Serv. <http://www.ams.usda.gov/rules-regulations/organic/handbook>.
- Vale, F. D., Zambolim, L., Chaves, G. M., & Correia, L. G. (1992). Avaliação fitossanitária da cultura do tomateiro em regiões produtoras de Minas Gerais e Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira*, 17(2), 211.

- Van Bruggen AHC. (1995). Plant disease severity in high-input compared to reduced-input and organic farming systems. *Plant Dis.* 79:976–84.
- Vasudevan, P., Kashyap, S., & Sharma, S. (1997). *Tagetes*: a multipurpose plant. *Bioresource Technology*, 62(1-2), 29-35.
- Wagner, H., Bladt, S. 1996. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2d. Ed. Springer Verlag. New York. 384 p.
- Williams, L. A. D., Rosner, H., Conrad, J., Moller, W., Beifuss, U., Chiba, K., ... & Kraus, W. (2002). Selected secondary metabolites from phytolaccaceae and their biological/pharmaceutical significance. *Research Signpost. In: Recent Res Devel in Phytochem*, 6, 13-68.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & van Kan, J. A. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular plant pathology*, 8(5), 561-580.
- Wu, T., Zang, X., He, M., Pan, S., & Xu, X. (2013). Structure–activity relationship of flavonoids on their anti-*Escherichia coli* activity and inhibition of DNA gyrase. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(34), 8185-8190.
- XU, L. W., Juan, C. H. E. N., QI, H. Y., & SHI, Y. P. (2012). Phytochemicals and their biological activities of plants in *Tagetes* L. *Chinese Herbal Medicines*, 4(2), 103-117.
- Yang, X., Ma, X., Yang, L., Yu, D., Qian, Y., & Ni, H. (2009). Efficacy of *Rheum officinale* liquid formulation on cucumber powdery mildew. *Crop Protection*, 28(12), 1031-1035.
- Yilar, M., & Kadioglu, I. (2016). Antifungal Activities of some *Salvia* Species Extracts on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) Mycelium Growth *In-vitro*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 26(1), 115.

- You, J., Zhang, J., Wu, M., Yang, L., Chen, W., & Li, G. (2016). Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. *Biological Control*, 101, 31-38.
- Ziegler, J., & Facchini, P. J. (2008). Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 735-769.
- Zygadlo, J. A., Guzman, C. A., & Grosso, N. R. (1994). Antifungal properties of the leaf oils of *Tagetes minuta* L. and *T. filifolia* Lag. *Journal of Essential Oil Research*, 6(6), 617-621.