



**Proyecto:** Fondo Sectorial CONACYT-CONAFOR 2018-1 A-S-67865

“Monitoreo, evaluación de daños, manejo preventivo y control de la secadera y pudrición de raíz causadas por *Fusarium* spp., y las moscas fungosas *Bradysia* y *Lycoriella*”

## Alternativas de manejo para la secadera y mosca fungosa



Dra. Silvia Edith García Díaz  
Dr. Omar Alejandro Pérez Vera  
Dr. Víctor Hugo Marín Cruz  
Dr. Jairo Cristóbal Alejo  
M. C. Patricia Fernández Guzmán  
Dr. David Cibrián Tovar

Dr. Juan Estéban Barranco Florido  
Tesisista M.C. Miriam Guadalupe Huerta Vázquez  
Ing. Andrea Yoatzin Ladrillero Miguel  
Tesisista Lic. Pablo Martínez Gil  
Tesisista Lic. Adrián López López  
Tesisista Lic. Brizeida Barrios Merino

## ÍNDICE

<b>Producto 4. UNA MEMORIA DOCUMENTAL DE LOS TRATAMIENTOS UTILIZADOS COMO ALTERNATIVAS DE MANEJO PARA LA SECADERA Y MOSCA FUNGOSA.</b> .....	5
<b>Subproducto 2. UNA MEMORIA DOCUMENTAL DE LOS TRATAMIENTOS UTILIZADOS PARA DEFINIR LAS MEJORES ALTERNATIVAS DE MANEJO DE CONTROL PARA LA SECADERA Y MOSCA FUNGOSA.</b> .....	5
OBJETIVOS .....	5
DEFINICIONES .....	5
<b>Actividad 1.6. ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i> DE <i>Trichoderma</i> spp. CONTRA <i>Fusarium</i> spp. A NIVEL LABORATORIO.</b> Jairo Cristóbal Alejo .....	7
METODOLOGÍA .....	7
Variables respuesta medidas .....	7
a) Competencia.....	7
b) Micoparasitismo .....	8
c) Antibiosis.....	9
Efectividad biológica <i>in vitro</i> de fungicidas contra <i>Fusarium</i> spp. ....	9
Diseño experimental y análisis de resultados.....	10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	11
Variables respuesta medidas: .....	11
a) Competencia.....	11
b) Micoparasitismo .....	14
c) Antibiosis.....	17
CONCLUSIONES .....	19

RECOMENDACIONES .....	19
LITERATURA CITADA.....	19

**Actividad 1.7. ESTUDIO ANTIFÚNGICO DE EXTRACTOS VEGETALES PARA CONTROL DE *Fusarium oxysporum* Y *F. circinatum* EN *Pinus cembroides*.**

Patricia Fernández Guzmán.....	21
METODOLOGÍA .....	21
Extractos Vegetales:.....	21
Colecta de plantas.....	21
Procesamiento de las plantas .....	21
Preparación de extractos botánicos .....	21
Análisis de compuestos fitoquímicos de extractos acuosos.....	22
Prueba in vitro de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre <i>Fusarium oxysporum</i> .....	22
Porcentaje de inhibición.....	23
Concentraciones inhibitorias al 50% (CL50).....	23
Preparación del inóculo .....	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	25
Fitoquímicos identificados en los extractos acuosos.....	25
Actividad antifúngica de extractos vegetales in vitro sobre el crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>F. circinatum</i> .....	27
Concentración inhibitoria al 50% (CI50) de los extractos vegetales.....	40
CONCLUSIONES .....	44
LITERATURA CITADA.....	44

**Actividad 1.8. CONTROL QUÍMICO *IN-VITRO* DE *Fusarium circinatum* Y *F. oxysporum* AISLADOS DE PINO EN MÉXICO.** Omar Alejandro Pérez-Vera, Jairo Cristóbal Alejo, Silvia Edith García-Díaz y David Cibrián-Tovar ..... 48

METODOLOGÍA .....	48
Aislamiento, purificación e identificación de los hongos .....	48
Preparación del PDA + fungicidas .....	48
Evaluación de la sensibilidad <i>in vitro</i> de aislados de <i>Fusarium</i> spp. a fungicidas .....	50
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	50
Crecimiento micelial de <i>Fusarium circinatum</i> y <i>F. oxysporum</i> en PDA + fungicidas .....	50
Sensibilidad <i>in vitro</i> de aislados de <i>Fusarium</i> spp., a fungicidas .....	58
CONCLUSIONES .....	61
RECOMENDACIONES .....	61
LITERATURA CITADA .....	62

**Actividad 1.9. EFECTIVIDAD BIOLÓGICA Y QUÍMICA A NIVEL LABORATORIO DE MOSCA FUNGOSA NEGRA *Bradysia* Y *Lycoriella*.** Víctor Hugo Marín Cruz, Juan Esteban Barranco Florido, Pablo Martínez Gil, Miriam Guadalupe Huerta Vazquez, Andrea Yoatzin Ladrillero Miguel y David Cibrián Tovar ..... 64

RESUMEN .....	64
METODOLOGÍA .....	65
Recolecta de material y cría de insectos .....	65
Producción de bioinsecticida de <i>Beauveria bassiana</i> .....	65
Activación <i>Beauveria bassiana</i> : .....	65
Condiciones de fermentación: .....	66

Extracción de conidios, enzimas y metabolitos: .....	67
Proceso de semipurificación del extracto crudo enzimático de <i>B. bassiana</i> . ..	67
Ensayos enzimáticos realizados al extracto crudo .....	68
Determinación de proteínas: .....	68
Determinación de actividad Lipolítica: .....	68
Determinación de actividad proteolítica de Pr1 (Subtilisina): .....	69
Determinación de actividad proteolítica de Pr2 (Tripsina):.....	69
Determinación de actividad endoquitinolítica: .....	70
Determinación de actividad exoquitinolítica: .....	70
Bioensayo 1: Evaluación de controles biológicos e insecticidas químicos. ....	71
Diseño experimental .....	73
Bioensayo 2: Control de <i>B. impatiens</i> en <i>Pinus devoniana</i> en invernadero. ....	74
Diseño experimental .....	75
Análisis estadístico .....	75
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	76
Cría de insectos .....	76
Producción de bioinsecticida de <i>Beauveria bassiana</i> .....	77
Ensayos enzimáticos realizados al extracto crudo .....	78
Bioensayo 1: Evaluación de controles biológicos e insecticidas químicos.....	79
Bioensayo 2: Control de <i>B. impatiens</i> en <i>Pinus devoniana</i> en invernadero ....	83
CONCLUSIONES .....	85

<b>Actividad 1.10. CONTROL BIOLÓGICO Y QUÍMICO DE <i>Fusarium circinatum</i> A NIVEL DE INVERNADERO.</b> Silvia Edith García Díaz, Omar Alejandro Pérez Vera, Brizeida Barrios Merino y Adrián López López .....	90
METODOLOGÍA .....	90
Desinfección, tratamiento e inoculación de la semilla de <i>Pinus cembroides</i> con <i>Fusarium</i> spp. ....	90
Impregnación de la semilla de pino con fungicidas y <i>Trichoderma</i> spp. ....	90
Sustrato y siembra de semilla de pino .....	91
Diseño experimental .....	91
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	92
Porcentajes de germinación .....	92
Fungicidas .....	92
<i>Trichoderma</i> spp.....	96
Porcentajes de plántula enferma .....	98
Fungicidas .....	98
<i>Trichoderma</i> spp.....	102
CONCLUSIONES .....	108
Fungicidas .....	108
<i>Trichoderma</i> spp.....	108
LITERATURA CITADA.....	109

**Nombre del proyecto:** “Monitoreo, evaluación de daños, manejo preventivo y control de la secadera y pudrición de raíz causadas por *Fusarium* spp., y las moscas fungosas *Bradysia* y *Lycoriella*”.

**Producto 4. UNA MEMORIA DOCUMENTAL DE LOS TRATAMIENTOS UTILIZADOS COMO ALTERNATIVAS DE MANEJO PARA LA SECADERA Y MOSCA FUNGOSA.**

**Subproducto 2. UNA MEMORIA DOCUMENTAL DE LOS TRATAMIENTOS UTILIZADOS PARA DEFINIR LAS MEJORES ALTERNATIVAS DE MANEJO DE CONTROL PARA LA SECADERA Y MOSCA FUNGOSA.**

## OBJETIVOS

1. Evaluar y validar alternativas de manejo para la secadera y mosca fungosa.
2. Evaluar la efectividad de control de mosco fungoso de diferentes alternativas biológicas y químicas a nivel laboratorio y en invernadero.

## DEFINICIONES

**Antagonismo:** es la inhibición del crecimiento de un microorganismo, debido al desarrollo, alimentación y ocupación de espacio de otro microorganismo. Los organismos antagónicos actúan por antibiosis, lisis, reacciones inmunológicas, competencia, parasitismo y prelación.

**Antibiosis:** es la producción sustancias por parte de un microorganismo y que son tóxicas para otros microorganismos.

**CL<sub>50</sub>:** es la concentración de una sustancia que debe producir la muerte del 50% de los organismos expuestos a dicha sustancia durante un periodo determinado, durante la exposición o en un plazo definido.

**Compuesto fitoquímico:** son sustancias producidas por las plantas que protegen la integridad de sus células. Pueden tener actividades antifúngicas contra patógenos.

**Conidios:** es una espora asexual inmóvil formada directamente a partir de una hifa o célula conidiógena o esporógena.

**Control biológico:** uso de enemigos naturales para disminuir la población de organismos plaga, ya sea de forma temporal o permanente.

**Dosis baja:** se emplea como preventivo o cuando las condiciones ambientales favorecen el desarrollo de la enfermedad.

**Dosis media y alta:** se emplea cuando hay presencia de síntomas, de acuerdo a su incidencia y severidad.

**Enzimas:** son moléculas de proteínas que tienen la capacidad de facilitar y acelerar las reacciones químicas que tienen lugar en los tejidos vivos, disminuyendo el nivel de la "energía de activación" propia de la reacción.

**Extracto crudo:** solución de enzimas y metabolitos secundarios, obtenidos a partir de la cosecha con agua de una fermentación sólida, sin purificar.

**Fermentación sólida:** cultivo de microorganismos en soportes sólidos o semisólidos en ausencia de agua libre, ya sea en vehículos inertes o sobre sustratos insolubles.

**Hongo entomopatógeno:** son hongos que tienen la capacidad de infectar y causar la muerte a insectos plaga.

**In vitro:** del latín: dentro del vidrio, se refiere al empleo de tubos de ensayo, cajas Petri o recipientes de vidrio o plástico, para realizar ensayos dentro de un ambiente controlado.

**Insecticida químico:** sustancia tóxica para los insectos, producida de forma sintética.

**Metabolitos secundarios:** son compuestos químicos sintetizados por los hongos entomopatógenos que cumplen funciones no esenciales en ellos, de forma que su ausencia no es letal para el organismo, sin embargo, su producción les da una ventaja con respecto a otros organismos.

**Micoparasitismo:** es la acción de un microorganismo que parasita a otro o se alimenta de otro, puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos.

**Mortalidad acumulada:** es la suma de tasa de mortalidad diaria.

**Mortalidad corregida:** es el porcentaje de mortalidad de un tratamiento, al cual se le descontó la mortalidad inherente de cada población.

**ppm:** las partes por millón (ppm) es una unidad de medida de concentración que mide la cantidad de unidades de una sustancia que hay por cada millón de unidades del conjunto.



## **Actividad 1.6. ANTAGONISMO *IN VITRO* DE *Trichoderma* spp. CONTRA *Fusarium* spp. A NIVEL LABORATORIO.**

Jairo Cristóbal Alejo. Yucatán, [jairoca54@hotmail.com](mailto:jairoca54@hotmail.com)

*Trichoderma* actúa por hiperparasitismo, mediante la cual parasita hongos patógenos que se encuentran en el suelo; es decir, lo utiliza como alimento y lo destruye; también compete por espacio y nutrientes con los hongos patógenos (Trabanino *et al.*, 2003). Es capaz de producir sustancias tóxicas para las colonias de patógenos. De acuerdo con lo anterior, el objetivo de este trabajo, es evaluar tres cepas comerciales y cuatro nativas de *Trichoderma* contra *Fusarium circinatum* y *F. oxysporum*.

### **METODOLOGÍA**

#### **Biocontrol *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium* spp.**

Con el propósito de evaluar el biocontrol de *in vitro* de *Fusarium* spp., se consideraron cinco cepas nativas de diferentes especies de *Trichoderma*; *T. erinaceum* (chapingo), *T. asperellum* (Ta13-17), *T. erinaceum* (Te 10-15), *T. virens* (Tv 27-08) y *T. virens* (Tv 32-09), además se incluyeron testigos control, para cada cepa del hongo antagonístico. Para el caso del hongo fitopatógeno, se tuvieron 22 cepas de *Fusarium* spp., aislados de plantas de *Pinus* spp., con la enfermedad, provenientes de diferentes viveros dedicadas a la producción de plantas para reforestación; tres cepas identificadas como *Fusarium oxysporum* (SF10, SF13 y SF20) y 19 correspondieron a *F. circinatum* (SF02, SF04, SF05, SF06, SF17, SF19, SF22, SF29, SF32, SF35, SF41, SF52, SF55, SF56, SF58, SF59, SF60, SF61 y SF65), las variables respuestas consideradas para cada enfrentamiento dual fueron: competencia, micoparasitismo y antibiosis.

#### **VARIABLES RESPUESTA MEDIDAS**

##### **a) Competencia**

Para los bioensayos, previamente se pusieron a desarrollar las cepas de *Trichoderma* aisladas de suelo y hospedantes como endófitas durante 5 días; así como las cepas de *Fusarium* spp., durante 7 días. Una vez desarrolladas, en cajas Petri con medio de cultivo PDA; se colocó un disco de 5 mm de diámetro de PDA

con el micelio de *Trichoderma*, en un extremo de la caja y de modo opuesto, se colocó un disco del patógeno, dejando una distancia entre ellos de 6 cm, arreglados en un diseño completamente al azar. Cada especie de *Trichoderma* y cepa de *Fusarium* constituyeron un tratamiento con cuatro repeticiones, mismas cajas se utilizaron como testigos solo con el fitopatógeno para tener referencia del crecimiento sin la confrontación. Las cajas se mantuvieron a una temperatura de  $30-35 \pm 1$  °C. La toma y registro de datos de la competencia se comenzó a partir del segundo día de la siembra para calcular la inhibición del crecimiento micelial (ICR) con la fórmula propuesta por Ezziyyani *et al.* (2004):

$$PICR = \frac{(R1 - R2)}{R1} 100$$

Dónde:

PICR: porcentaje de inhibición del crecimiento radial.

R1: radio del patógeno testigo.

R2: radio del patógeno enfrentado.

### b) Micoparasitismo

El grado de micoparasitismo ejercido por las especies de *Trichoderma* sobre el crecimiento del fitopatógeno se estimó con una escala de cinco clases (Bell *et al.*, 1982) proporcionándole valores en porcentaje donde: 1=100%, 2=92.05%, 3=50%, 4=7.95% y 5=0% (Mora-Aguilera *et al.*, 2003) (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Escala de estimación de micoparasitismo (Bell *et al.*, 1982).

Clases	Valor (%)	Descripción
1	100	<i>Trichoderma</i> sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio
2	92.05	<i>Trichoderma</i> sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio.
3	50	<i>Trichoderma</i> y el patógeno crecen aproximadamente la mitad de la superficie y ninguno domina al otro.

4	7.95	El patógeno coloniza las dos terceras partes de la superficie del medio y resiste la invasión por <i>Trichoderma</i> .
5	0	El patógeno sobrecrece completamente a <i>Trichoderma</i> y ocupa la superficie total del medio.

### c) Antibiosis

Para estimar la presencia de metabolitos, se dejó crecer a *Trichoderma* spp., en medio líquido de papa más dextrosa por 21 días, posteriormente se filtró con una gasa estéril. El filtrado se colocó en tubos Falcón de 50 mL y se centrifugaron por 25 minutos a 3,000 rpm. El líquido separado, se pasó a un frasco de plástico de 500 mL y las esporas sedimentadas se conservaron en refrigeración en tubos Falcón de 50 mL.

El filtrado se dejó libre es esporas mediante un filtro millipore de 0.22  $\mu\text{m}$  y se preparó medio de cultivo con PDA, agregando el filtrado con una proporción de volumen 1:1, después de esterilizar el PDA y antes de que gelificara, se adicionó el filtrado. Una vez gelificado el medio, se sembró en el centro de la caja Petri un disco de micelio de 5 mm de cada una de las cepas de *Fusarium* spp., de 7 días de crecimiento (Michel-Aceves *et al.*, 2004). Cada cepa del hongo fitopatógeno se consideró como tratamiento con cuatro repeticiones, con sus respectivos testigos.

Los tratamientos se distribuyeron en un diseño experimental completamente al azar. Se incubaron a una temperatura de 30-35 $\pm$ °C y se midió el radio de crecimiento del patógeno a partir del día siguiente de establecido el experimento, posteriormente las mediciones se realizaron cada tres días hasta que los testigos sin el filtrado de *Trichoderma* spp., llenaron la caja. El porcentaje de inhibición del crecimiento radial se estimó con la fórmula propuesta por Ezziyyani *et al.* (2004).

### Efectividad biológica *in vitro* de fungicidas contra *Fusarium* spp.

Los ensayos de efectividad *in vitro* de fungicidas, se realizaron en dilución en medio de cultivo PDA estéril, los fungicidas empleados fueron tres sistémicos; Sportk® 45 CE (procloraz), Solaris® Bio 250 EW (tebuconazo), Cabrio® C (Boscalid + pyraclostrobin) y uno de origen biológico, Serenade® Max (*Bacillus subtilis*); estos se mezclaron con el medio PDA previamente estéril, en dosis baja, recomendada y alta (Cuadro 2), posteriormente, se agitaron para homogenizar las mezclas y se dosificaron en cajas de Petri en condiciones asépticas, se incluyó un testigo de cada hongo sin fungicida.

**Cuadro 2.** Fungicidas y dosis para la efectividad *in vitro* contra *Fusarium* spp.

Tratamiento	Dosis*		
	Baja	Recomendada	Alta
Sportk® 45 CE	0.5	1.5	2.0
Solaris® Bio 250 EW	0.5	1.5	2.0
Cabrio® C	0.5	1.5	2.0
Serenade® Max	0.5	1.5	2.0
Testigo	0.0	0.0	0.0

\*Los fungicidas Sportk® 45 CE y Solaris® Bio 250 EW la dosis fue mL L<sup>-1</sup>, mientras que Cabrio® C y Serenade® fue en g L<sup>-1</sup>.

En cada caja de Petri se sembró un disco de micelio de 7 mm diámetro de los 22 aislados de *Fusarium* spp. posteriormente las cajas se sellaron para conservarlas en la estufa de cultivo a 28 °C, se midió el crecimiento micelial cada 24 h hasta que el testigo sin aplicación del producto cubrió por completo la caja Petri. La efectividad del producto sobre cada hongo se estimó con la fórmula de Abbott (1925). Cada fungicida tuvo cuatro repeticiones con sus respectivos testigos; sin la aplicación del fungicida.

$$E = \frac{(\text{Test} + \text{Trat})}{\text{Test}} 100$$

Donde:

E = efectividad (%),

Test = crecimiento micelial del testigo (cm)

Trat = crecimiento micelial del tratamiento (cm)

100 = constante.

### Diseño experimental y análisis de resultados

El diseño experimental para el biocontrol de *Fusarium* con las cepas nativas *Trichoderma* y el estudio de la efectividad biológica de fungicidas fueron sometidos a un diseño experimental completamente al azar. Con los datos de porcentaje de competencia, micoparasitismo, antibiosis por *Trichoderma* spp., e inhibición de

crecimiento micelial por la efectividad de fungicidas, se realizaron análisis de varianza previa transformación de datos mediante la función  $y = \arcsin(\sqrt{y/100})$ ; la separación de medias se realizó con el método de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Los análisis estadísticos se realizaron con ayuda del paquete estadístico SAS Ver. 9. 4.

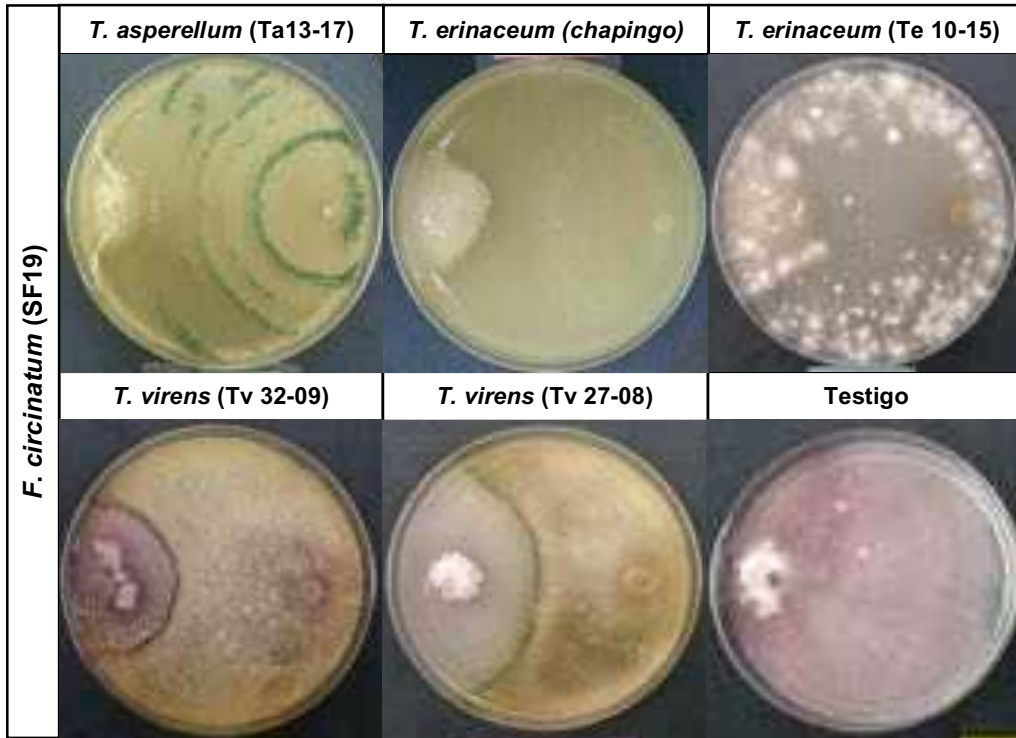
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VARIABLES RESPUESTA MEDIDAS:

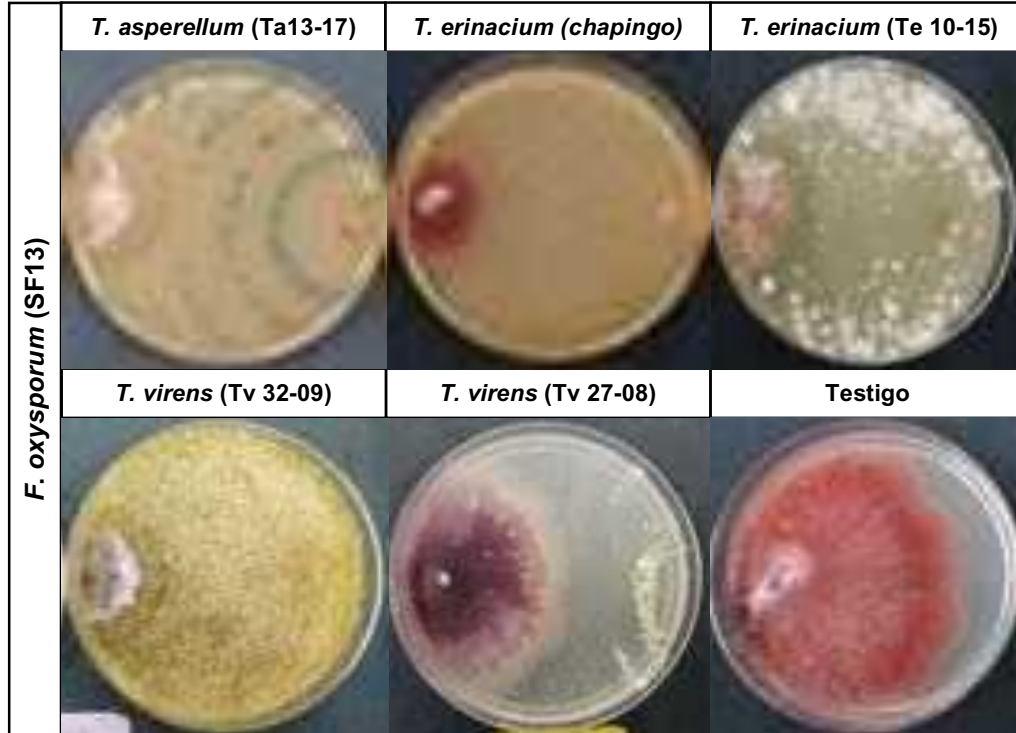
#### a) Competencia

En la actividad inhibitoria, los enfrentamientos duales entre *Trichoderma asperellum* (Ta13-17), *T. erinaceum* (chapingo), *T. erinaceum* (Te 10-15), *T. virens* (Tv 27-08) y *T. virens* (Tv 32-09) contra 22 aislados *Fusarium* spp. hubo diferencias significativas ( $P \leq 0.01$ ). En general, la inhibición del fitopatógeno fue de 21.0-83.4%; con *T. erinaceum* (Te 10-15) se obtuvo el mayor rango de inhibición con 61.3-83.4%, seguido por *T. virens* (Tv 27-08) con 52.5-72.6%, *T. asperellum* (Ta13-17) con 69.5-48.6%, *T. virens* (Tv 32-09) y *T. erinaceum* (chapingo) con 51.5-68.2% y 21.0-62.2% en el mismo orden. Los aislados correspondientes a las especies de *Fusarium oxysporum* fueron los aislados con mayor inhibición (Figura 2).

De los 22 aislados de *Fusarium* spp., en 12 aislados se obtuvo menor porcentaje de inhibición del 21.0-48.7%, esto representó un 52.2% de los aislados, el resto (47.8%; 11 aislados) fueron inhibidos con 52.5-83.4%. La especie de *T. erinaceum* (Te 10-15) en enfrentamiento dual con *F. oxysporum* (SF13) obtuvo mayor inhibición con 83.4%; para *T. virens* (Tv 27-08) con el mismo aislado ejerció un 72.6%, con *T. asperellum* (Ta13-17) el mayor porcentaje se obtuvo con *F. circinatum* (SF02) con 69.5%, con *T. virens* (Tv 32-09) y *T. erinaceum* (chapingo) los mayores porcentajes de inhibición fueron de 68.2 y 62.2% con los aislados de *F. circinatum*, SF06, SF17, y SF22, en el mismo orden (Figura 1) (Cuadro 3).



**Figura 1.** Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium circinatum* (SF19) con cinco especies de *Trichoderma*.



**Figura 2.** Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* (SF13) con cinco especies de *Trichoderma*.

**Cuadro 3.** Inhibición del crecimiento micelial (%) de aislados nativos *Trichoderma* spp. contra aislados de *Fusarium* spp.

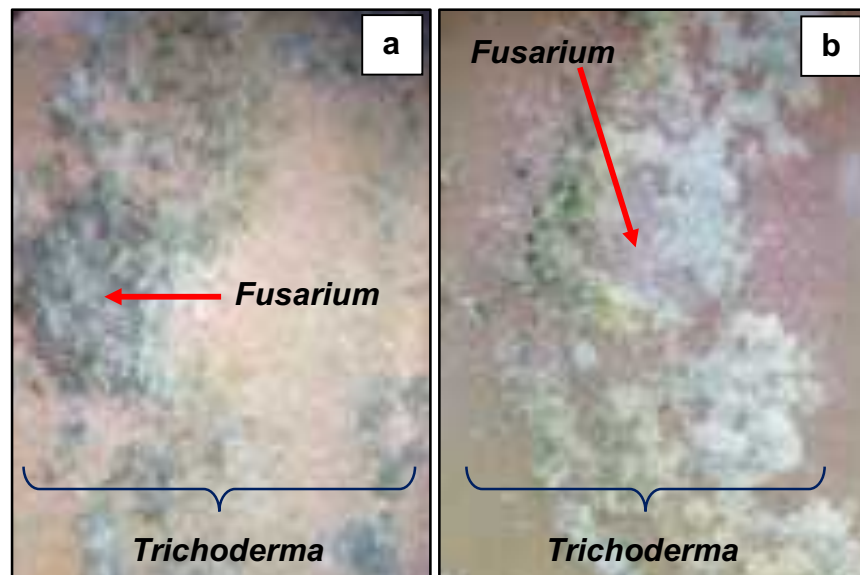
Antagonista	Aislados de especies de <i>Fusarium</i>																					
	SF02	SF04	SF05	SF06	SF10	SF13	SF17	SF19	SF20	SF22	SF29	SF32	SF35	SF41	SF52	SF55	SF56	SF58	SF59	SF60	SF61	SF65
<i>T.erinaceum</i> (chapingo)	52.5d	48.7c	54.3c	34.8c	25.5d	47.6d	61.2b	61.8b	59.9c	62.2b	27.4c	58.0b	39.2c	51.8c	32.8c	45.9d	21.0d	32.3c	32.4c	48.2c	51.6c	46.9c
<i>T.asperellum</i> (Ta13-17)	64.2b	49.3c	54.3c	64.1ab	66.3b	51.0c	66.5a	60.4bc	54.8d	61.6bc	55.4b	57.3b	56.9b	69.5a	59.1b	48.6cd	56.0bc	49.7b	60.2b	55.6bc	57.8b	51.2b
<i>T.erinaceum</i> (Te 10-15)	69.3a	82.7a	67.4a	68.4a	80.8a	83.4a	68.4a	69.0a	81.1a	66.4a	67.4a	65.9a	67.1a	67.2a	68.7a	65.2a	61.3a	68.7a	69.0a	68.4a	67.7a	67.115a
<i>T. virens</i> (Tv 27-08)	57.4c	72.5b	58.6b	56.2b	56.7c	72.6b	57.9b	57.6c	71.5b	58.6c	61.2ab	58.1b	57.6b	59.0b	58.3b	60.0b	58.2ab	67.0a	58.3b	60.2ab	58.0b	52.5b
<i>T. virens</i> (Tv 32-09)	67.3a	51.5c	67.2a	68.2a	65.0bc	52.3c	68.2a	67.7a	61.3c	67.5a	67.5a	66.9a	65.7a	66.8a	58.1b	52.1c	54.2c	66.8a	67.7a	57.1bc	57.1b	67.1a
Testigo	0.0e	0.0d	0.0d	0.0d	0.0e	0.0e	0.0c	0.0d	0.0e	0.0d	0.0d	0.0c	0.0d	0.0d	0.0d	0.0e	0.0e	0.0d	0.0d	0.0d	0.0d	0.0e

Medias con la misma letra dentro de columnas no son significativamente diferentes, Tukey ( $P \leq 0.05$ )

Los aislados SF10, SF13 y SF20 pertenecen a la especie de *Fusarium oxysporum*, los aislados restantes son de la especie *Fusarium circinatum*.

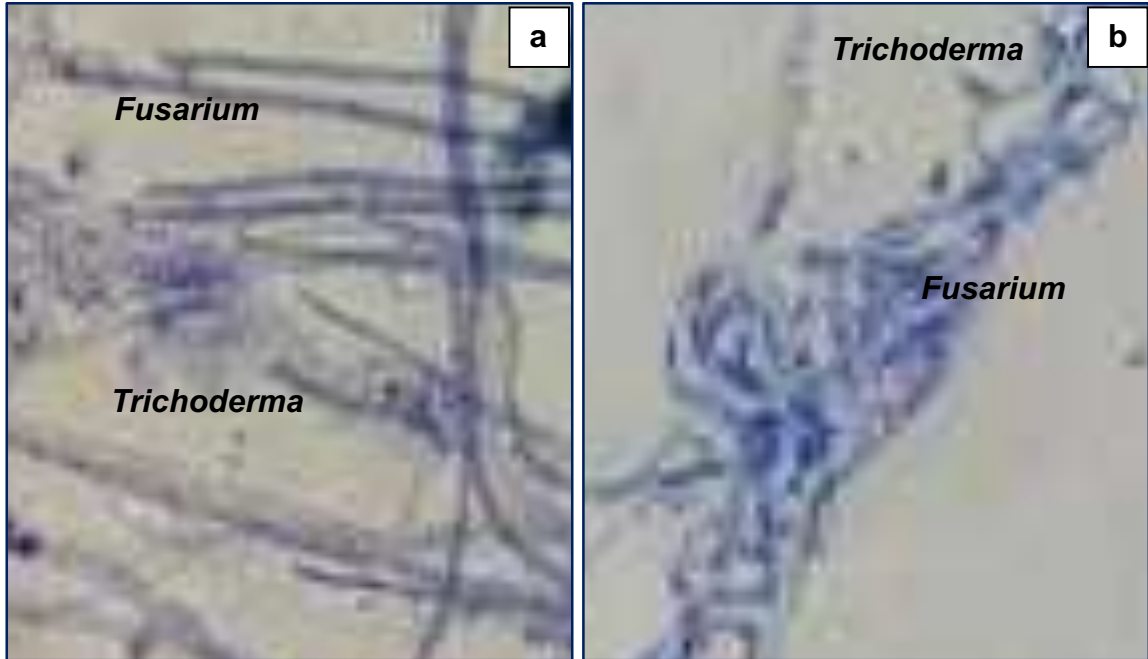
### b) Micoparasitismo

El micoparasitismo ejercido por las cinco cepas de *Trichoderma*, contra los aislados de *Fusarium* spp., se determinó a los 15 días de enfrentamiento dual. Para esta variable se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0.01$ ). En general, se observó un micoparasitismo del 50-100%; las especies de *T. asperellum* (Ta13-17), *T. erinaceum* (Te 10-15) y *T. virens* (Tv 32-09) presentaron el 100% de micoparasitismo ya que estas especies colonizaron al fitopatógeno y limitaron su crecimiento radial (Figuras 3 y 4). Con *T. erinaceum* (chapingo) el porcentaje de micoparasitismo fue del 75% sobre los 23 aislados del *Fusarium* spp. esta especie antagonista, permitió crecimiento durante los primeros días de enfrentamiento, aunque al final de la evaluación limitó el crecimiento del fitopatógeno, y no presentó colonización ni sobrecrecimiento en éste (Cuadro 4).



**Figura 3.** Colonización de *Trichoderma asperellum* (Ta13-17) sobre especies de *F. ciccimatum* (SF19): **a)** inicio de la esporulación; **b)** esporulación total.





**Figura 4.** Micoparasitismo de *Trichoderma asperellum* (Ta13-17) sobre especies de *F. ciccimatum* (SF19): **a)** interacción de hifas, **b)** lisis de hifas.

**Cuadro 4.** Micoparasitismo (%) de aislados nativos de *Trichoderma* contra aislados de *Fusarium* spp.

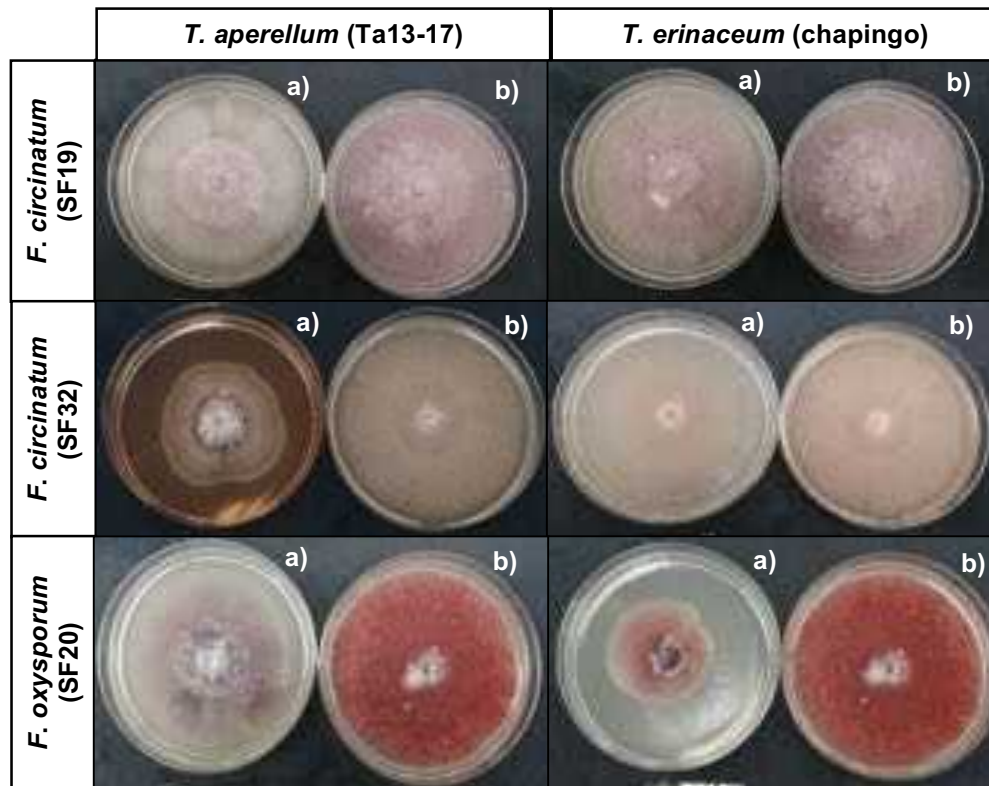
Antagonista	Aislados de especies de <i>Fusarium</i>																					
	SF02	SF04	SF05	SF06	SF10	SF13	SF17	SF19	SF20	SF22	SF29	SF32	SF35	SF41	SF52	SF55	SF56	SF58	SF59	SF60	SF61	SF65
<i>T.erinaceum</i> (chapingo)	75 b	75 b	75 b	75 b	75 b	75 b	75 b	75 b	75 b	75 b	75 b	75 b	75 b	75 b	75 b	75 b	75 b	75 b	75 b	75 b	75 b	75 b
<i>T.asperellum</i> (Ta13-17)	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a
<i>T.erinaceum</i> (Te 10-15)	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a
<i>T. virens</i> (Tv 27-08)	50c	50c	50c	50c	50c	50c	50c	50c	50c	50c	50c	50c	50c	50c	50c	50c	50c	50c	50c	50c	50c	50c
<i>T. virens</i> (Tv 32-09)	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a
Testigo	0d	0d	0d	0d	0d	0d	0d	0d	0d	0d	0d	0d	0d	0d	0d	0d	0d	0d	0d	0d	0d	0d

Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Tukey ( $P \leq 0.05$ )

Los aislados SF10, SF13 y SF20 pertenecen a la especie de *Fusarium oxysporum*, los aislados restantes son de la especie *Fusarium circinatum*.

**c) Antibiosis**

La antibiosis se evaluó con las especies de *T. asperellum* (Ta13-17) y *T. erinaceum* (chapingo) sobre los 23 aislados de *Fusarium*, la evaluación fue con los filtrados de cultivos líquidos de ambas especies antagónicas en dilución en agar. Los resultados mostraron diferencias ( $P \leq 0.01$ ) entre las dos especies evaluadas, con *T. asperellum* (Ta13-17) los porcentajes de inhibición de crecimiento micelial fue 2.4-10.9%, mientras que con *T. erinaceum* (chapingo) mostró un rango de inhibición de 3.7-38.6%, estos rangos de inhibición lo presentaron sobre las especies de *F. oxysporum* (SF20) y *F. circinatum* (SF32 Y SF61), por lo que estos aislados mostraron mayor sensibilidad a los metabolitos no volátiles que *T. asperellum* (Ta13-17) y *T. erinaceum* (chapingo) produjeron en el medio de cultivo líquido (Cuadro 5 y Figura 5).



**Figura 5.** Antibiosis de especies de *Trichoderma* en aislados de especies de *Fusarium*: **a)** hongo en filtrado fúngico en dilución en agar; **b)** tratamiento Testigo (sin filtrado fúngico).

**Cuadro 5.** Antibiosis (%) in vitro de aislados nativos de *Trichoderma* contra aislados de *Fusarium* spp.

Antagonista	Aislados de especies de <i>Fusarium</i>																					
	SF02	SF04	SF05	SF06	SF10	SF13	SF17	SF19	SF20	SF22	SF29	SF32	SF35	SF41	SF52	SF55	SF56	SF58	SF59	SF60	SF61	SF65
<i>T. erinaceum</i> (chapingo)	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	38.6a	0a	0a	27.6a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	3.7a	0a
<i>T. asperellum</i> (Ta13-17)	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	10.9b	0a	0a	4.8b	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	2.4a	0a
Testigo	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0c	0a	0a	0c	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0b	0a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes, Tukey ( $p \leq 0.05$ )

Los aislados SF10, SF13 y SF20 pertenecen a la especie de *Fusarium oxysporum*, los aislados restantes son de la especie *Fusarium circinatum*.

Los niveles de competencia, micoparasitismo y antibiosis que causan una inhibición contra aislados de *Fusarium* spp. (Suárez *et al.*, 2008; Reyes *et al.*, 2012), es resultado de la capacidad competitiva de *Trichoderma*, ya que posee mejor tasa de incorporación de nutrientes, eficiencia en su metabolismo y mayor crecimiento cuando se enfrenta a otros hongos; asociado también a la producción de enzimas como celulasas, quitinasas, glucanasas y proteasas, que se incorporan al medio de cultivo lo que les permite aprovechar mejor los nutrientes del medio y privar al patógeno de estos recursos (Michel-Aceves *et al.*, 2012).

## CONCLUSIONES

La cepa de *T. erinaceum* (Te 10-15), mostró la mayor capacidad de competencia contra la mayoría de los aislados de *Fusarium* spp. Aunque la cepa de *T. asperellum* (Ta 13 17), ejerció el mejor micoparasitismo contra los aislados del hongo fitopatógeno.

Ningún filtrado proveniente de medio líquido de cepas de *Trichoderma* spp., tuvo el 100 % de antibiosis en los aislados de *Fusarium* spp.

## RECOMENDACIONES

Las cepas *T. erinaceum* (Te 10-15) y *T. asperellum* (Ta 13 17), son promisorias para su validación en vivero para el control de la secadera causada por *Fusarium* spp.

## LITERATURA CITADA

- Affokpon, A., Coyne, L. D., Dossou, A. R., Lawouin, L. Coosemans, J. 2011. Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems. *Soil Biology and Biochemistry*. 43 (3): 600-608.
- Agrios, G. 2005. *Plant pathology*. Fifth edition. Academic Press. New York, USA. 922 p.
- Bell, D., H. Well, C. Markham. 1982. "In vitro" antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72: 379-382.
- Erasmus A, Lennox C L, Korsten L, Lesar K, Fourie P H, 2015. Imazalil resistance in *Penicillium digitatum* and *P. italicum* causing citrus postharvest green and blue mould: Impact and options. *Postharvest Biology and Technology*. 10, 66-76

- Ezziyyani M., C. S. Pérez, M. E. Requena, L. Rubio y M. E. Candela. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* – Ziyani, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por "*Phytophthora capsici*". An Biol., 26: 69-78.
- Michel-Aceves A., S. M. Otero-Sánchez, D. O. Rebolledo, G. R. Lezama. 2004. Producción y Actividad Antibiótica del 6 pentil-a-pirona de *Trichoderma* spp., Sobre Especies de *Fusarium*. Revista Mexicana de Fitopatología. 22:1 14-21.
- Michel-Aceves A., M. A. Otero-Sánchez, R. D. Martínez-Rojero, R. Ariza-Flores, A. Barrios-Ayala, y A. Rebolledo-Martínez. 2012. Control biológico in vitro de enfermedades fungosas en tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. AIA. 12: 43-54.
- Suárez M., C. Fernández B., N. Valero, R. Gámez C., A. Páez R. 2008. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. Revista Colombiana de Biotecnología, 10: 35-43.
- Abbott W S, 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology. 18, 265-267.
- Trabanino R, Kuniyoshi C, Michel M. 2003. Manual de agentes de control biológico. [Internet]. Tegucigalpa (Honduras): Centro de control biológico para Centroamérica, Biblioteca Wilson Popenoe- Zamorano.
- Reyes A., J. Cristóbal A., E. Sánchez, J. Tun S. 2012. Inhibición del crecimiento in vitro de *Fusarium* sp. aislado de chile habanero (*Capsicum chinensis*) con hongos antagonistas. Fitosanidad. 16:3 161-165.

## **Actividad 1.7. ESTUDIO ANTIFÚNGICO DE EXTRACTOS VEGETALES PARA CONTROL DE *Fusarium oxysporum* Y *F. circinatum* EN *Pinus cembroides*.**

Patricia Fernández Guzmán. Coahuila, [forespaty\\_17@hotmail.com](mailto:forespaty_17@hotmail.com)

Extractos de *Larrea tridentata*, *Agave lechuguilla* y *Lippia graveolens*, han sido reportados como fungicidas que afectan el desarrollo de varios hongos patógenos. Por esta razón, se ha evaluado el efecto de extractos acuosos contra *Fusarium circinatum* y *F. oxysporum* que causan el Damping off en plantas forestales producidos en vivero.

### **METODOLOGÍA**

#### **Extractos Vegetales:**

##### **Colecta de plantas**

Las plantas de *Larrea tridentata*, *Agave lechuguilla* y *Lippia graveolens*, fueron colectadas en el municipio General Cepeda, Coahuila, México; durante los meses de abril y mayo de 2019, cerca de la carretera estatal 105 localizada en las coordenadas 25°21'40.55" N y 101°28'08.68" O a una altitud 1,507 msnm. Las plantas se colocaron en bolsas negras de plástico con una etiqueta de identificación, (nombre científico, fecha y lugar de colecta), posteriormente de trasladaron al laboratorio de Fitopatología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

##### **Procesamiento de las plantas**

El material vegetal se secó a temperatura ambiente bajo sombra durante aproximadamente una semana hasta peso constante. Posteriormente, cada muestra se limpió cuidadosamente para separar las hojas y tallos en el caso del orégano, a partir de las cuales se realizaron los extractos.

##### **Preparación de extractos botánicos**

Los extractos fueron obtenidos a partir de hojas secas, las cuales se molieron mecánicamente hasta obtener un tamaño de partícula de 0.5 a 1 mm. El polvo obtenido se utilizó para la preparación de extractos utilizando agua como solvente, a 100 g de material molido se le agregaron 500 mL de agua y se mantuvo por 72 h en agitación constante en una parrilla eléctrica (Thermo Scientific) a una temperatura de 50 °C, posteriormente se filtró con ayuda de una

bomba de vacío utilizando papel filtro Whatman número 1, el filtrado obtenido (extracto crudo) se colocó en un recipiente cubierto con papel aluminio para evitar la posible pérdida de actividad de algunos de sus compuestos y se colocó en una cámara de secado durante 72 horas, finalmente se recuperó en forma sólida para prepararse a una concentración de 2000 mg/mL.

La concentración de los extractos se determinó utilizando la técnica de diferencia en peso seco. Para esto se pesó un vial previamente tarado (P1), al cual se le agregó un mL de extracto, se pasó a una estufa a 50 °C hasta que se obtuvo el peso seco constante del vial (P2). Una vez obtenidos estos pesos, se utilizó la fórmula  $P2-P1$  para obtener la diferencia en el peso, la cual corresponde a la cantidad en mg/mL que se obtuvo en cada uno de los extractos, finalmente el extracto obtenido se colocó en un recipiente protegido de la luz (Ojeda *et al.*, 2011). El procedimiento se repitió con cada una de las muestras de cada planta.

### **Análisis de compuestos fitoquímicos de extractos acuosos**

Para la identificación de los fitoquímicos presentes en los extractos crudos acuosos se utilizaron los extractos en polvo a una concentración de 2000 mg/L. Las determinaciones fueron cualitativas por colorimetría, se identificaron: alcaloides (Reacción de Dragendorf y Sonneschain), glicósidos cianogénicos (Reacción de Gringenard), azúcares reductores (Reacción de Feling y Benedic); saponinas (Prueba de espuma), esteroides y terpenos (Reacción de Libermann Bouchard), taninos (Reacción de gelatina y  $FeCl_3$ ), quinonas (Reacción de Hidróxido de amonio y Borntrager), cumarinas (Reacción de Erlich y de Hidróxido de amonio), purinas y carotenoides ( $H_2SO_4$  y  $FeCl_3$ ), carbohidratos (Prueba de Molisch's) y flavonoides (Prueba de Shinoda y de NaOH) mediante los métodos de Sahgal *et al.* (2009) y Usman *et al.* (2009).

### **Prueba in vitro de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre *Fusarium oxysporum***

La metodología utilizada fue mediante la técnica de microdilución en placa, adaptada de las técnicas propuestas por Masoko *et al.* (2005) y Gabrielson *et al.* (2002). Los tratamientos que se usaron fueron los siguientes: extractos acuosos de hojas de *A. lechuguilla*, hojas de *L. tridentata*; hojas y tallo de *L. graveolens*.

El procedimiento para realizar el bioensayo fue el siguiente:

1. Se colocaron 100  $\mu$ L de medio líquido sabouraud en todos los pozos de la placa.
2. Se preparó una solución de cada extracto a una concentración de 2000 mg/L, usando como solvente agua; posteriormente se colocaron 100  $\mu$ L de los extractos preparados a 2000 mg/L en la columna cinco, se mezclaron y se volvió a tomar 100  $\mu$ L, y se transfirieron a la columna seis,



y así sucesivamente realizando diluciones seriadas al 50 %, teniendo como resultado concentraciones de 2000 mg/L, 1000 mg/L, 500 mg/L y 250 mg/L.

3. El siguiente paso fue agregar 40 µL de 2,3,5- cloruro de trifeniltetrazolio como revelador de crecimiento a todos los pozos.
4. Finalmente, a partir de la columna dos a todos los pozos se les colocó 10 µL de una solución de esporas de *F. oxysporum* o *F. circinatum* a una concentración de  $1 \times 10^8$ .

Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento; se incubaron a 30 °C por 72 h y finalmente se realizó una lectura de absorbancia a 490 nm en un espectro fotómetro Multiskan Go (Thermo Scientific).

### Porcentaje de inhibición

De las lecturas obtenidas con el espectrofotómetro se determinó el porcentaje de inhibición, tomando el promedio de las cuatro repeticiones, considerando que la inhibición es el inverso del crecimiento, lo que fue calculado mediante las siguientes fórmulas (Moreno – Limón *et al.* 2011):

$$\% \text{ de crecimiento} = \frac{(A - B)}{C} 100$$

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \% \text{ de crecimiento}$$

Donde:

A= Absorbancia tratamiento

B= Absorbancia testigo negativo

C= Absorbancia testigo positivo

### Concentraciones inhibitorias al 50% (CL50)

La CL<sub>50</sub> de los diferentes extractos se determinaron con los valores de las concentraciones que inhibieron el 50 % del crecimiento de cada microorganismo (*Fusarium circinatum* y *F. oxysporum*), mediante un análisis Probit en el programa SAS versión 9.1. Posteriormente se realizó un análisis de varianza, y la prueba de comparación múltiple Tukey al 0.05 % de significancia.

### Preparación del inóculo

Se seleccionaron 32 cepas de los aislamientos obtenidos en el laboratorio de patología forestal, UACH, DiCiFo para ser evaluados (Cuadro 6). Cada una de las especies de hongo fueron cultivadas sobre placas con PDA a  $25 \pm 2$  °C por siete días en cajas Petri. Una vez crecidas las colonias fueron cubiertas con 10 mL de agua destilada estéril, se agitaron durante tres minutos y con un asa

bacteriológica estéril, se frotó la superficie del hongo, de manera firme y suave. La suspensión obtenida se vació directamente a un tubo de ensayo estéril para posteriormente realizar en conteo de esporas y realizar la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos.

**Cuadro 6.** Aislamientos de *Fusarium* spp. para ser evaluados con los extractos.

ESTADO	VIVERO	HOSPEDANTE	CLAVE	IDENTIFICACIÓN
Chihuahua	El Forestal	<i>Pinus engelmanni</i>	SFV64	<i>F. oxysporum</i>
Chihuahua	El Forestal	<i>Pinus cembroides</i>	SFV65	<i>F. circinatum</i>
Zacatecas	Tlaltenango	<i>Pinus cembroides</i>	SFV55	<i>F. circinatum</i>
Durango	Cielo azul	<i>Pinus arizonica</i>	SFV13	<i>F. oxysporum</i>
Durango	Francisco Villa	<i>Pinus engelmanni</i>	SFV17	<i>F. circinatum</i>
Durango	Francisco Villa	<i>Pinus arizonica</i>	SFV19	<i>F. circinatum</i>
Durango	Francisco Villa	<i>Pinus cembroides</i>	SFV20	<i>F. oxysporum</i>
México	Temamatla	<i>Pinus cembroides</i>	SFV02	<i>F. circinatum</i>
México	Teoran Jilotepec	<i>Pinus greggii</i>	SFV08	<i>F. circinatum</i>
México	Teoran Jilotepec	<i>Pinus leiophylla</i>	SFV10	<i>F. oxysporum</i>
Hidalgo	Militar, Zimapán	<i>Prosopis laevigata</i>	SFV50	<i>F. circinatum</i>
Hidalgo	Militar, Zimapán	<i>Pinus cembroides</i>	SFV52	<i>F. circinatum</i>
Puebla	Teotlalco, Vicente guerrero	<i>Pinus oaxacana</i>	SFV35	<i>F. circinatum</i>
Puebla	Teotlalco, Vicente guerrero	<i>Pinus pseudostrobus</i>	SFV38	<i>F. circinatum</i>
Puebla	El Rincón, Chignahuapan	<i>Pinus greggii</i>	SFV40	<i>F. circinatum</i>
Puebla	El Rincón, Chignahuapan	<i>Pinus teocote</i>	SFV41	<i>F. circinatum</i>
Puebla	Chignahuapan	<i>Pinus teocote</i>	SFV44	<i>F. oxysporum</i>
Querétaro	Ignacio perez, Amealco	<i>Pinus cembroides</i>	SFV11	<i>F. circinatum</i>
Oaxaca	Tamazulapa	<i>Pinus oaxacana</i>	SFV56	<i>F. circinatum</i>
Oaxaca	Tamazulapa	<i>Pinus devoniana</i>	SFV58	<i>F. circinatum</i>
Oaxaca	El Pocito	<i>Pinus oaxacana</i>	SFV59	<i>F. circinatum</i>
Oaxaca	El Pocito	<i>Pinus devoniana</i>	SFV60	<i>F. circinatum</i>
Chiapas	Cintalapa	<i>Pinus oocarpa</i>	SFV61	<i>F. circinatum</i>
Jalisco	Masvin	<i>Pinus douglasiana</i>	SFV03	<i>F. circinatum</i>
Jalisco	Masvin	<i>Pinus devoniana</i>	SFV04	<i>F. oxysporum</i>
Jalisco	Providencia, Sayula	<i>Pinus devoniana</i>	SFV06	<i>F. circinatum</i>
Michoacán	Atzimba, Zinapécuaro	<i>Pinus montezumae</i>	SFV21	<i>F. circinatum</i>
Michoacán	Atzimba, Zinapécuaro	<i>Pinus devoniana</i>	SFV22	<i>F. circinatum</i>
Veracruz	La Gloria, Perote	<i>Pinus greggii</i>	SFV24	<i>F. circinatum</i>
Veracruz	Militar, Perote	<i>Pinus hartwegii</i>	SFV29	<i>F. circinatum</i>
Veracruz	Militar, Perote	<i>Pinus montezumae</i>	SFV31	<i>F. circinatum</i>
Veracruz	Militar, Perote	<i>Pinus cembroides</i>	SFV32	<i>F. circinatum</i>

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Fitoquímicos identificados en los extractos acuosos

Los fitoquímicos identificados se muestran en el (Cuadro 7). Los extractos de hojas de *L. tridentata* presentaron flavonoides, saponinas y glucósidos cianogénicos; en el caso del extracto de hojas de *A. lechuguilla* se identificaron saponinas triterpenoides y esteroidales, así como taninos; en *L. graveolens* se observaron taninos, cumarinas, flavonoides como flavonones, flavononas y flavonas. Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Martínez *et al.* (2012, 2013) quienes observaron los mismos componentes fitoquímicos en extractos de *L. tridentata*. En *A. lechuguilla*, Sidana *et al.* (2016) observaron más de 141 saponinas esteroidales de interés farmacológico y Castillo *et al.* (2010) reportaron la presencia de taninos. Finalmente, se coincide con Cruz *et al.* (2011) reportando la presencia de cumarinas, y Güereca *et al.* (2007) detectaron flavonoides como flavonones, flavonas y flavononas en extractos acuosos y etanólicos de hoja y tallo de *L. graveolens*; Hernández-Castillo *et al.* (2010) mencionan la presencia de taninos. El análisis fitoquímico mostró que los extractos de estas especies contienen compuestos con actividad antifúngica como los alcaloides, flavonoides, taninos y saponinas; estos afectan a los patógenos de diferentes maneras; en el caso de los alcaloides podría deberse a la presencia de nitrógeno en su estructura como amina o amida; los flavonoides por la presencia en su estructura de hidroxilos fenólicos que penetran la membrana celular, se combinan y precipitan las proteínas protoplasmáticas desnaturalizándolas y actuando como venenos protoplasmáticos (Ruiton, 1998); los taninos forman complejos con enzimas y otras proteínas provocando la inhibición de sus funciones, por lo que pueden inhibir el transporte de electrones a través de las membranas, y alterar iones como el hierro y el cobre, inhibiendo la actividad de algunas enzimas que son esenciales para la vida de los microorganismos (Scalbert and Williamson, 2000); y las saponinas forman complejos con esteroides, proteínas y fosfolípidos de membranas citoplásmicas (Stuardo y San Martín, 2008). Su mecanismo de acción es variable; por ejemplo, la toxicidad de los fenoles en microorganismos se atribuye a inhibición enzimática por oxidación de compuestos; el modo de acción de los 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 ADN, y de las lecitinas y polipéptidos se conoce que pueden formar canales iónicos en la membrana microbiana o causar la inhibición competitiva por adhesión de proteínas microbianas a los polisacáridos receptores del hospedero (Cowan, 1999).

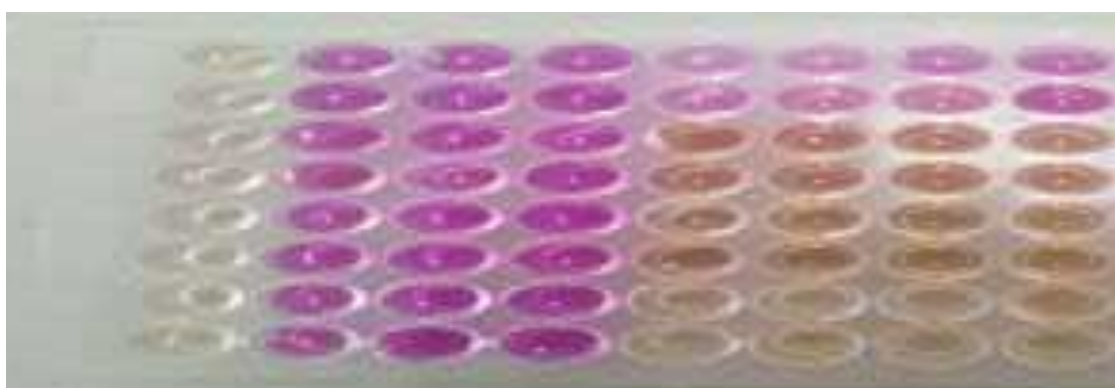
**Cuadro 7.** Fitoquímicos identificados en los extractos vegetales.

Extractos vegetales	A	C	F	Gc	Az	S	T	Q	C	P	Ca	F1	F2	F3	F4	S1	S2	T1	T2	T3	T4	Q1	Q2	Q3
<i>Larrea tridentata</i> hoja	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
<i>Agave lechuguilla</i> hoja	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
<i>Lippia graveolens</i> hoja	-	+	+	-	+		+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>Lippia graveolens</i> tallo	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-

+ = Fitoquímico presente, - = Fitoquímico ausente ; A = alcaloides, C = Carbohidratos, F = Flavonoides, GC = Glicosidos Cianogenicos, AZ = Azucares Reductores, S = Saponinas, T = Taninos, Q = Quinonas, Cu = Cumarinas, P = Purinas, Ca = Carotenoides, F1 = Flavonones, F2 = Flavonas, F3 = Flavononas, F4 = Chalconas, S1 = Triterpenoides, S2 = Esteroidal, T1 = Gelatina, T2 = Derivados Acido Galico, T3 = Derivados Catecoles, T4 = Fenoles, Q1 = Antraquinonas, Q2 = Benzoquinonas, Q3 = Antranas

### Actividad antifúngica de extractos vegetales in vitro sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* y *F. circinatum*

En general los extractos de *L. tridentata* y *L. graveolens* hoja y tallo presentaron actividad antifúngica para cada uno de los microorganismos. En la Figura 6 se puede apreciar un ejemplo de la microplaca con cada tratamiento contra *F. oxysporum* (SF04); en la columna 1 donde se aplicó medio de cultivo (M) más revelador (R), no todos los pozos presentan coloración; en la columna 2 donde se colocó medio más revelador más la concentración de esporas hay presencia de color, al igual que en las columnas 3 y 4 donde además de agregar todo lo que se le colocó a la columna tres, se le agregó el solvente extractante agua (s), a partir de la columna cinco en las filas 1 y 2, se colocó el extracto *A. lechuguilla* de mayor a menor, las diferentes concentraciones a estudiar (2000mg/L, 1000mg/L, 500mg/L y 250 mg/L) donde los pozos de igual manera presentan color violeta, lo cual nos indica que hay crecimiento de los microorganismos a diferencia de las concentraciones de los extractos de *Lippia graveolens* tallo y hoja (*L. g. h* y *L.g.t.*) y *L. tridentata* hoja (*L.t. h.*) que no presentan coloración, lo que nos indica que hay inhibición de crecimiento del microorganismo así como también considerando sus respectivas lecturas de absorbancia para cada tratamiento que confirman que los pozos que no presentan coloración, el extracto inhibió el crecimiento del hongo y viceversa.



**Figura 6.** Efecto inhibitorio de extractos vegetales vs *F. oxysporum* (SF04).

Columna 1:M+R,columna 2:M+R+H,Columna 3:M+R+H+S,columna 4:M+R+H+S,Columna 5: Fila 1 y 2 Extracto *A. l.* 2000 mg/L, Columna 6:Fila 1 y 2 Extracto *A. l.* 1000 mg/L, Columna 7 :Fila 1 y 2 Extracto *A. l.* 500 mg/L, Columna 8 :Fila 1 y 2 Extracto *A. l.* 250 mg/L, Columna 5:Fila 3 y 4 Extracto *L.t.* 2000 mg/L, Columna 6:Fila 3 y 4 Extracto *L.t.* 1000 mg/L, Columna 7 :Fila 3 y 4 Extracto *L.t.* 500 mg/L, Columna 8 :Fila 3 y 4 Extracto *L.t.* 250 mg/L; Columna 5:Fila 5 y 6 Extracto *L.g..h* 2000 mg/L, Columna 6:Fila 5 y 6 Extracto *L.g.h* 1000 mg/L, Columna 7 :Fila 5 y 6 Extracto *L.g. h* 500 mg/L, Columna 8 :Fila 5 y 6 Extracto *L.g.h* 250 mg/L; Columna 5:Fila 7 y 8 Extracto *L.g.t* 2000 mg/L, Columna 6:Fila 7 y 8 Extracto *L.g.t* 1000 mg/L, Columna 7 :Fila 7 y 8 Extracto *L.g. t* 500 mg/L, Columna 8 :Fila 7 y 8 Extracto *L.g.t* 250 mg/L;

En las Figuras 7-28, se observa que los porcentajes de inhibición con extractos de *L. tridentata* y *L. graveolens* hoja fluctuaron entre 90 % y 98 % en la concentración más alta (2000 mg/L) afectando el crecimiento de los patógenos; con los extractos de *L. graveolens* tallo se obtuvieron porcentajes de 60 % hasta 89 % de inhibición a la concentración de 2000 mg/L; sin embargo con el extracto de *A. lechuguilla* hoja presentaron porcentaje de inhibición baja a la

concentración más alta 2000 mg/L; de igual manera se puede observar que el porcentaje de inhibición disminuye conforme baja la concentración de cada uno de los extractos.

Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Velásquez (1981), quien indica que en estudios *in vitro* de fracciones etanólicas de *L. tridentata* a dosis de 2,000 ppm, se observó la inhibición de crecimiento de *Cytospora* sp. 15 días después de la inoculación; este hongo es el estado asexual de *Eutypa armeniacae* agente causal del brazo muerto de la vid; además se observó que inhibió la germinación de las ascosporas de *E. armeniacae* a la misma dosis, pero con extractos en base a etanol y cloroformo. De igual forma Rivera-Castañeda *et al.* (2001) observaron una inhibición total en la germinación de telioesporas de *Tilletia indica* tratadas con extractos de *L. tridentata* a una concentración de 500 mg/mL, las teliosporas tratadas con este extracto no mostraron viabilidad cuando se transfirieron a medio de cultivo fresco, por lo que el extracto de gobernadora mostró su potencial como agente de control.

En cuanto a *Lippia graveolens* coincidimos con Méndez *et al.* (2011), quienes mencionan que se obtuvo un porcentaje de inhibición del 60 % con extractos acuosos de *L. graveolens*; Jasso de Rodríguez *et al.* (2011) reportan que los extractos etanólicos y hexánicos de *L. graveolens* presentaron un efecto antifúngico sobre *Rhizopus stolonifer* inhibiendo el 100 % del crecimiento. Hernández *et al.* (2008) mencionaron sobre la actividad antifúngica por parte de aceite esencial de *L. graveolens* sobre *Fusarium sporotrichum*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes*, *F. moniliforme* y *Rhizoctonia solani*. Finalmente, los resultados encontrados con *A. lechuguilla* son muy similares a los reportados por Castillo *et al.* (2010), quien menciona que al realizar ensayos con extractos acuosos de *A. lechuguilla* sobre *R. solani* no presentó ningún efecto en la inhibición del patógeno.

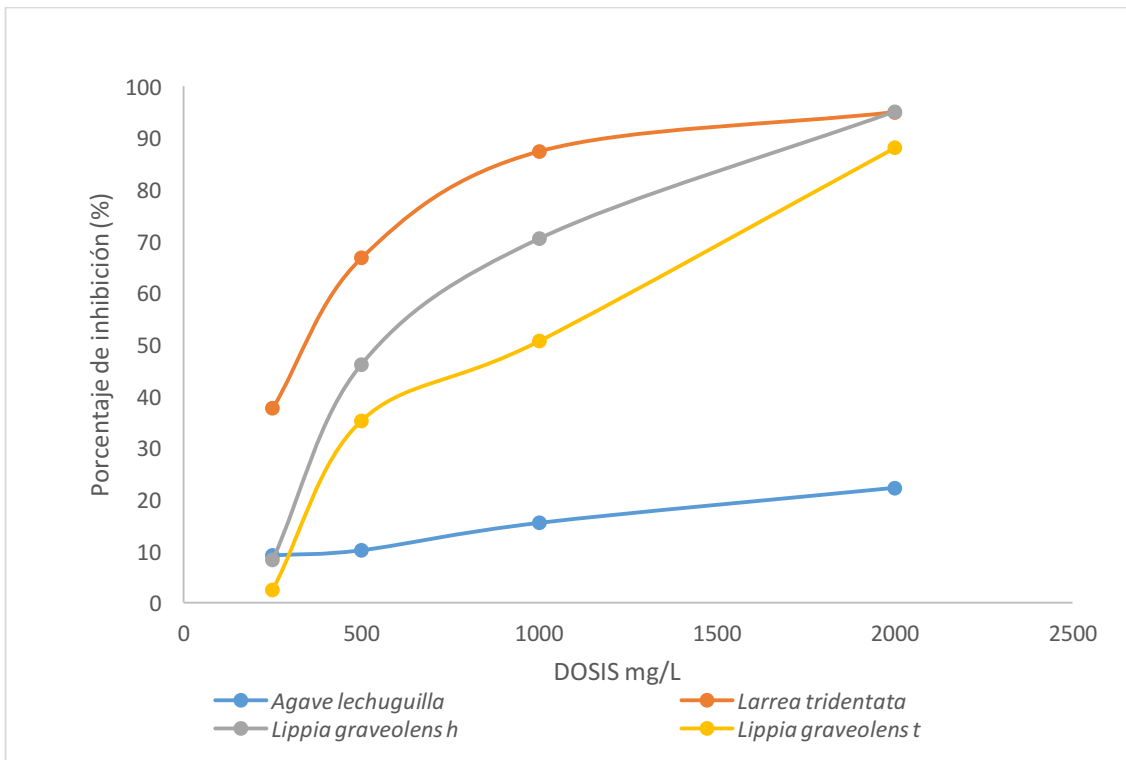


Figura 7. Porcentaje de inhibición de extractos vs *F. circinatum* (SF41).

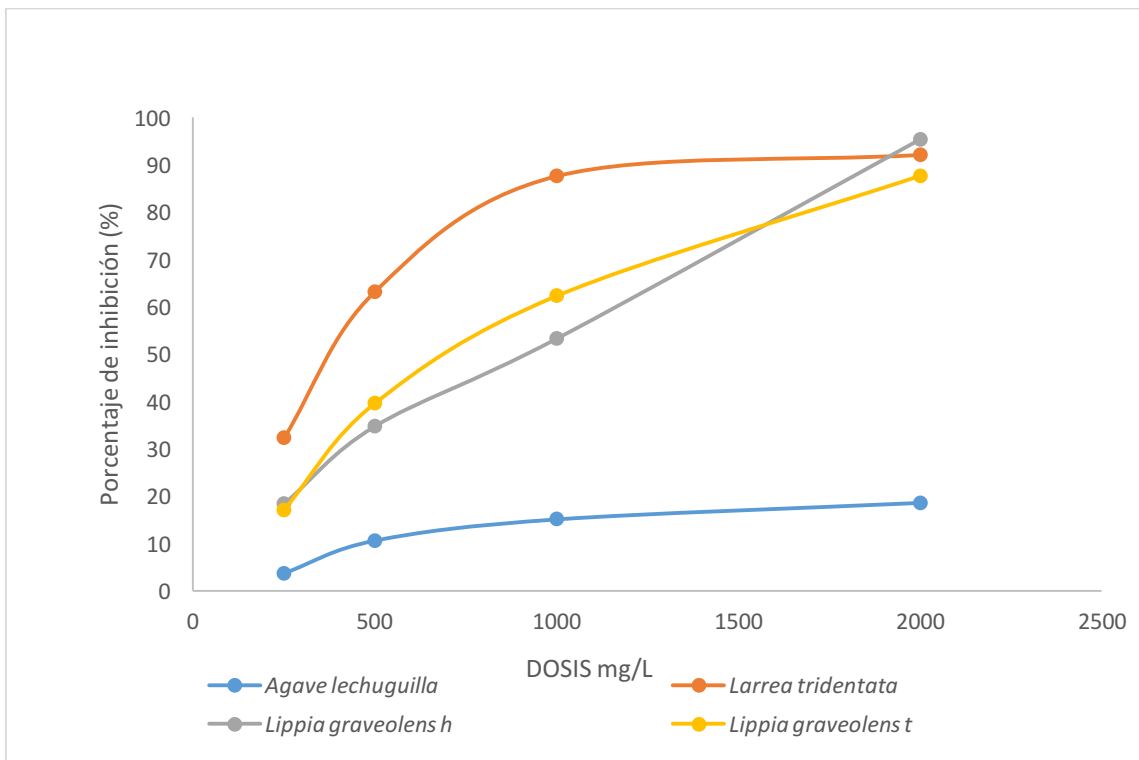


Figura 8. Porcentaje de inhibición de extractos vs *F. circinatum* (SF35).

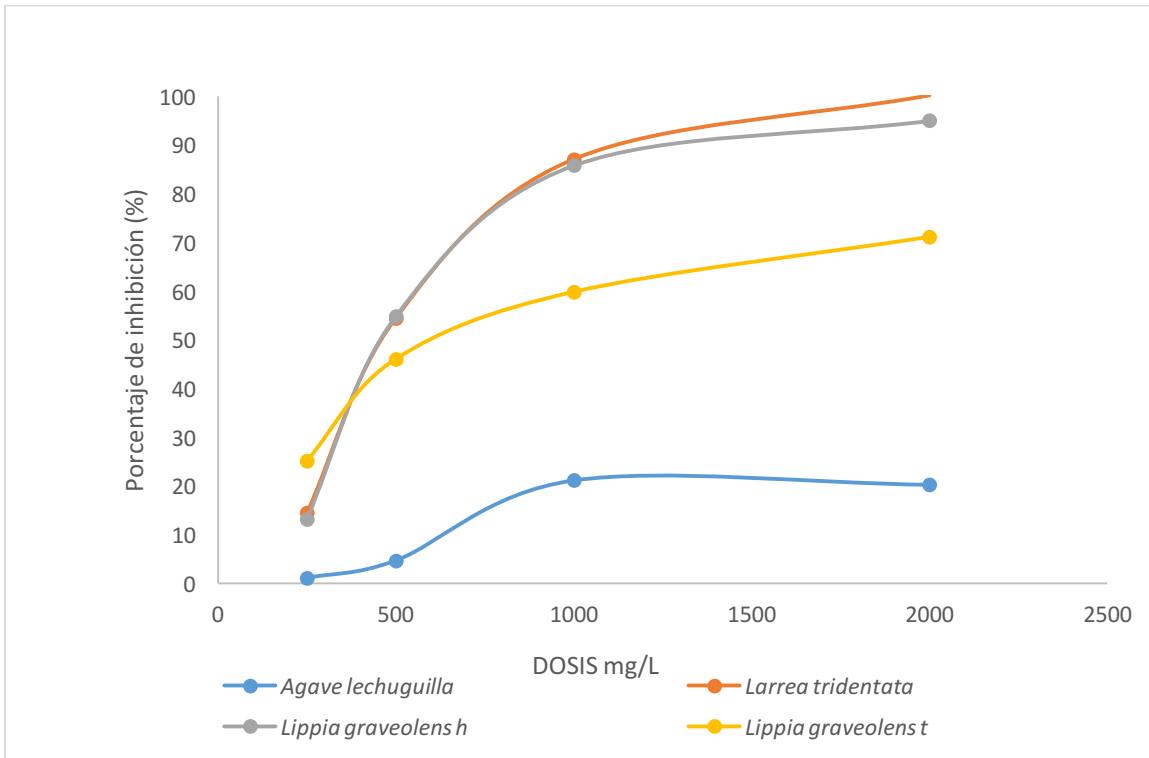


Figura 9. Porcentaje de inhibición de extractos vs *F. circinatum* (SF61).

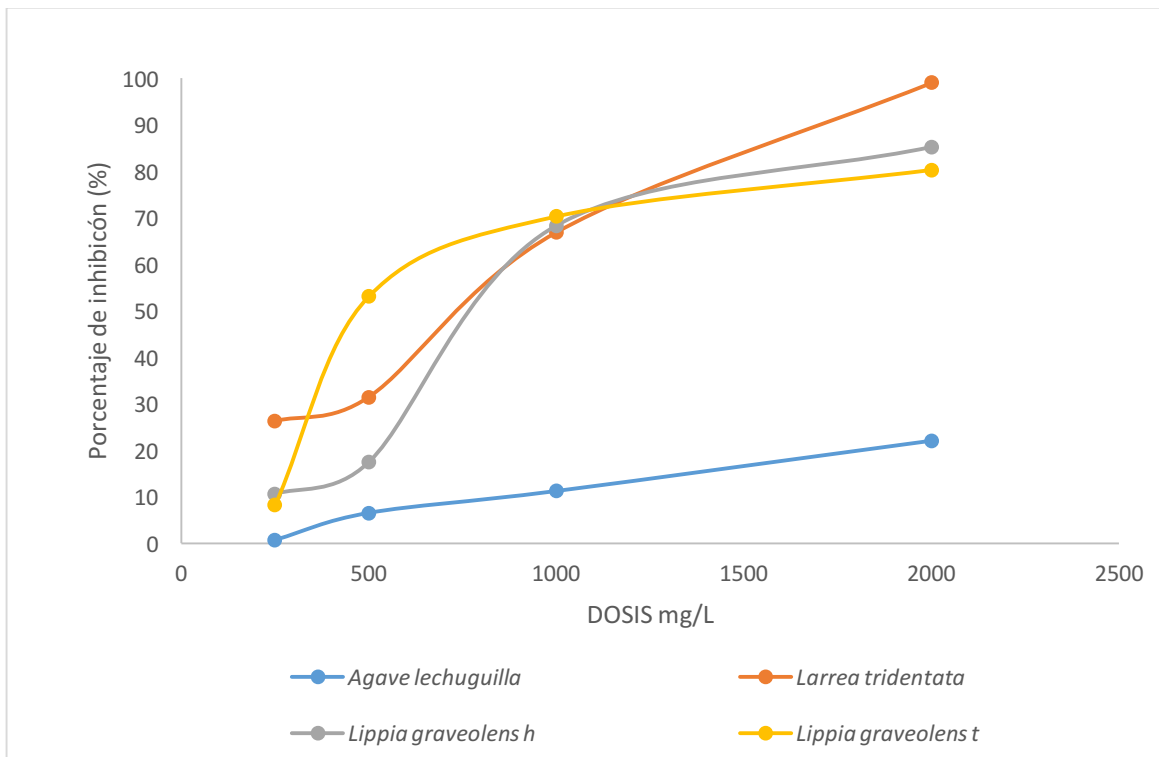


Figura 10. Porcentaje de inhibición de extractos vs *F. circinatum* (SF11).



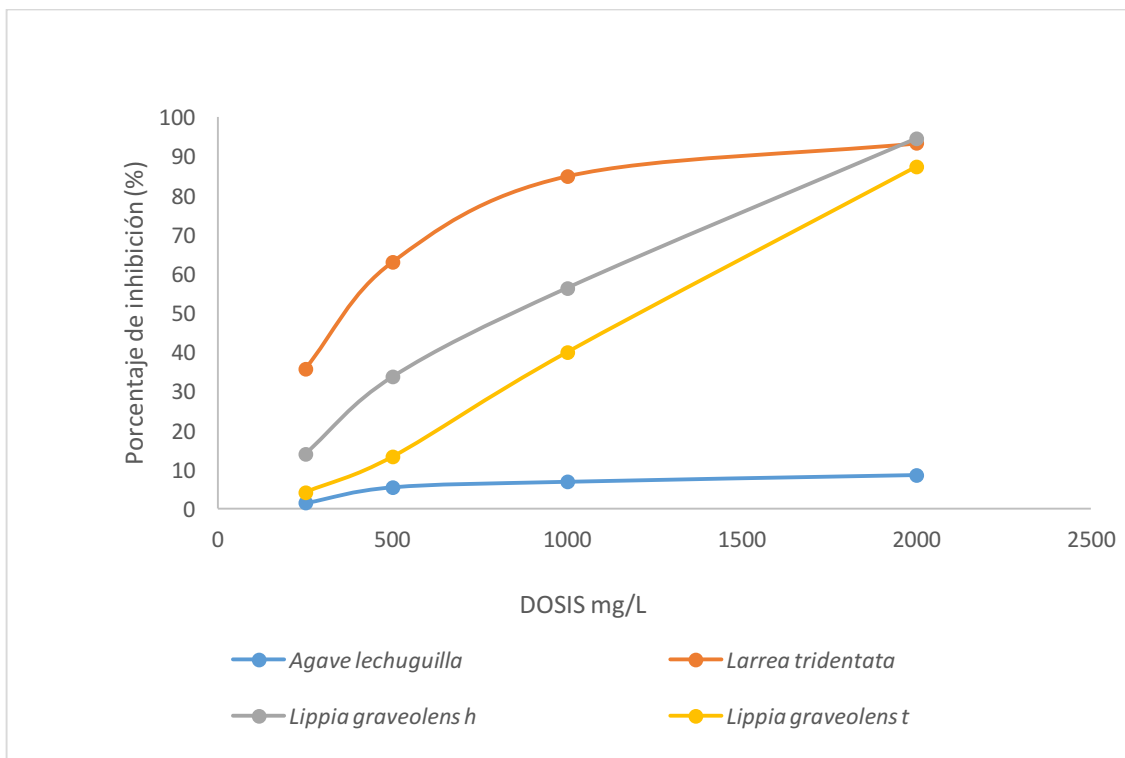


Figura 11. Porcentaje de inhibición de extractos vs *F. oxysporum* (SF13).

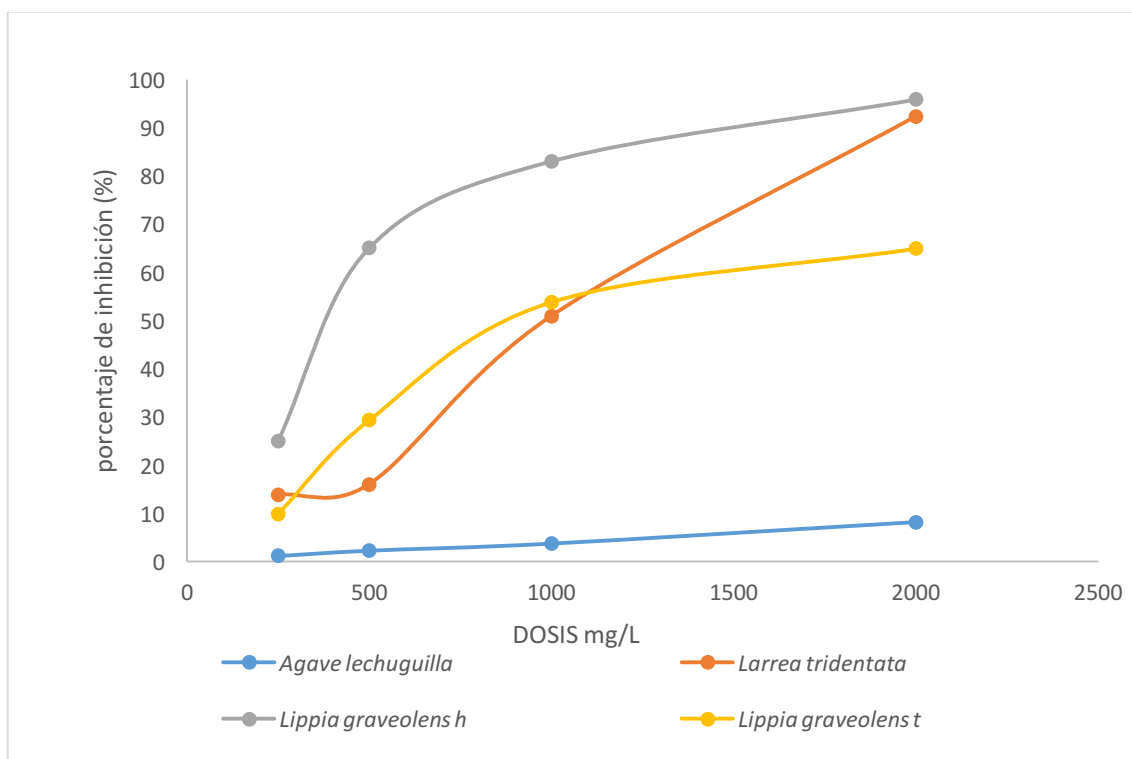


Figura 12. Porcentaje de inhibición de extractos vs *F. circinatum* (SF65).

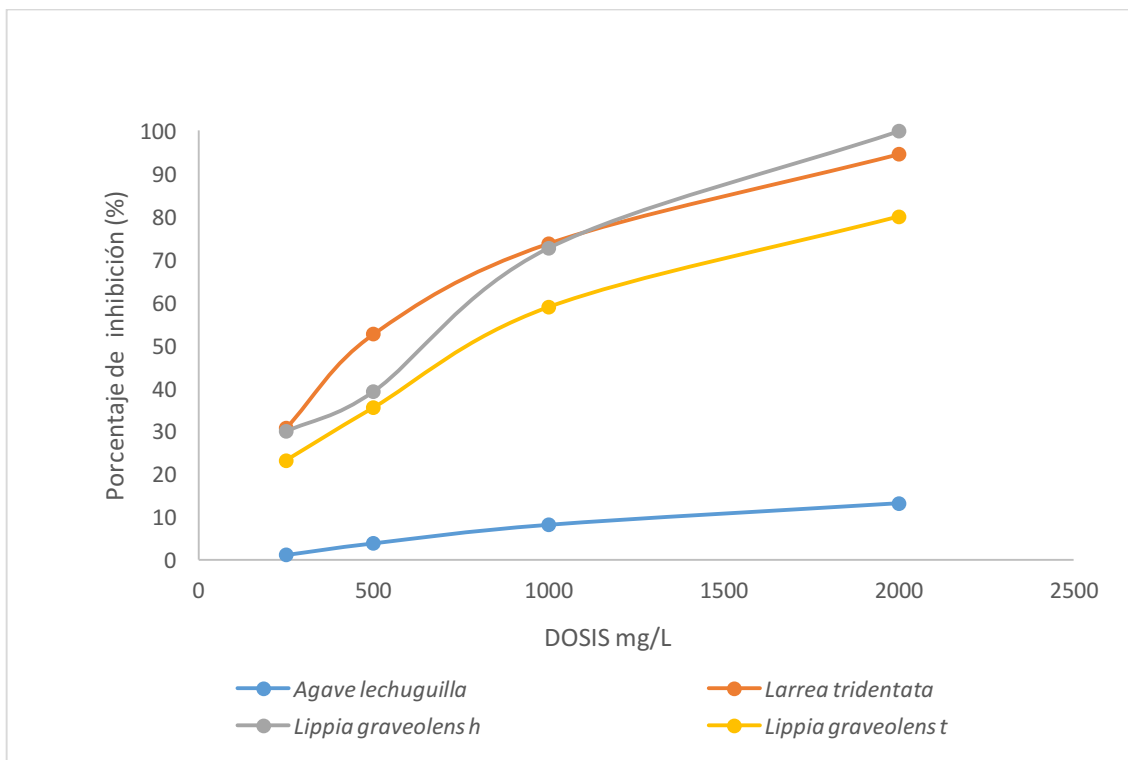


Figura 13. Porcentaje de inhibición de extractos vs *F. circinatum* (SF19).

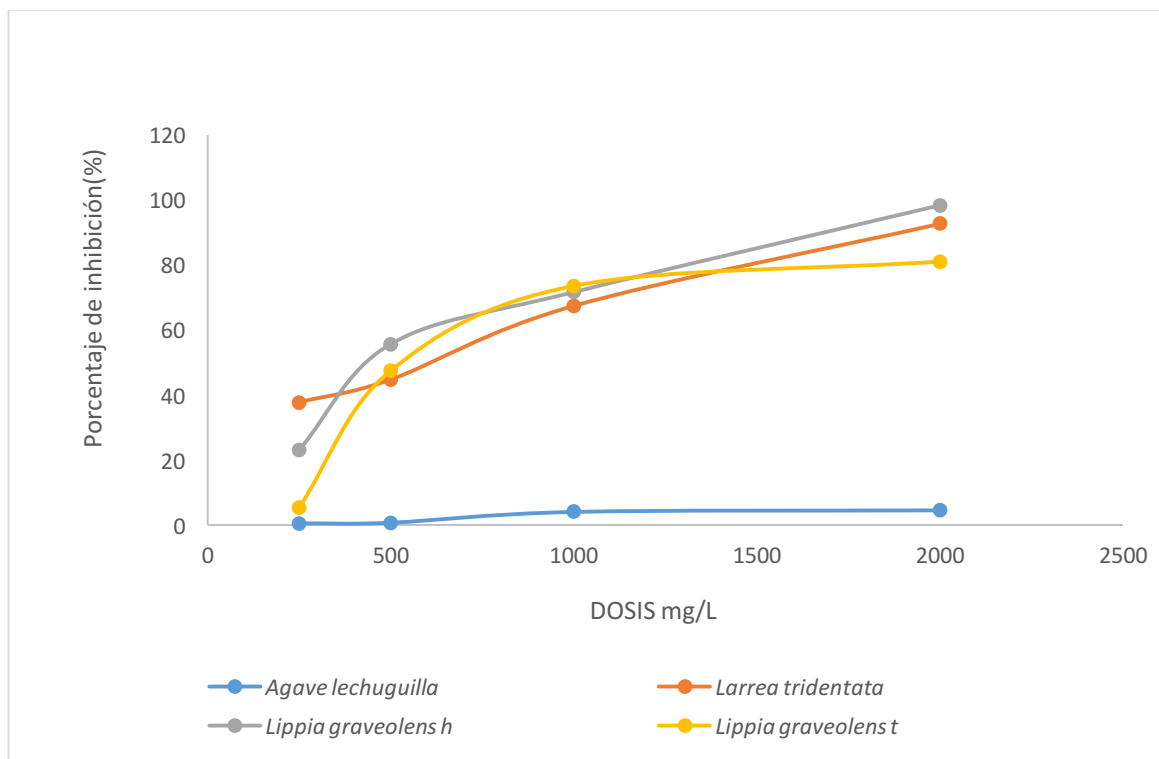


Figura 14. Porcentaje de inhibición de extractos vs *F. circinatum* (SF58).

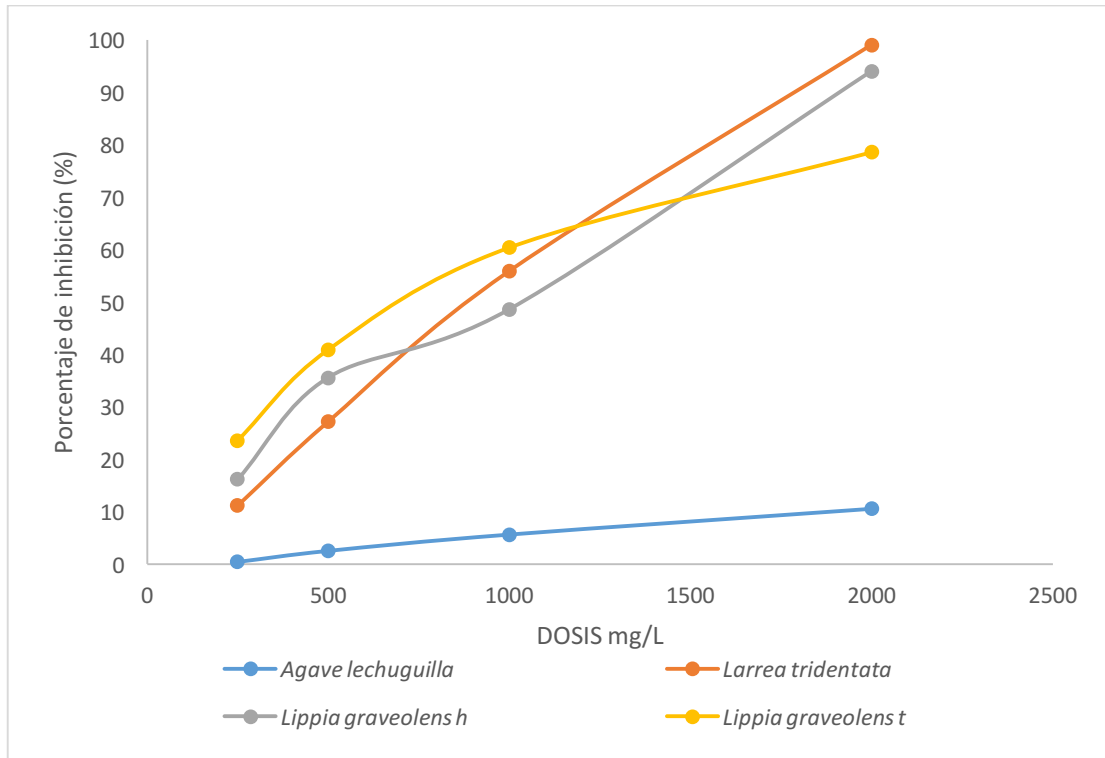


Figura 15. Porcentaje de inhibición de extractos vs *F. oxysporum* (SF04).

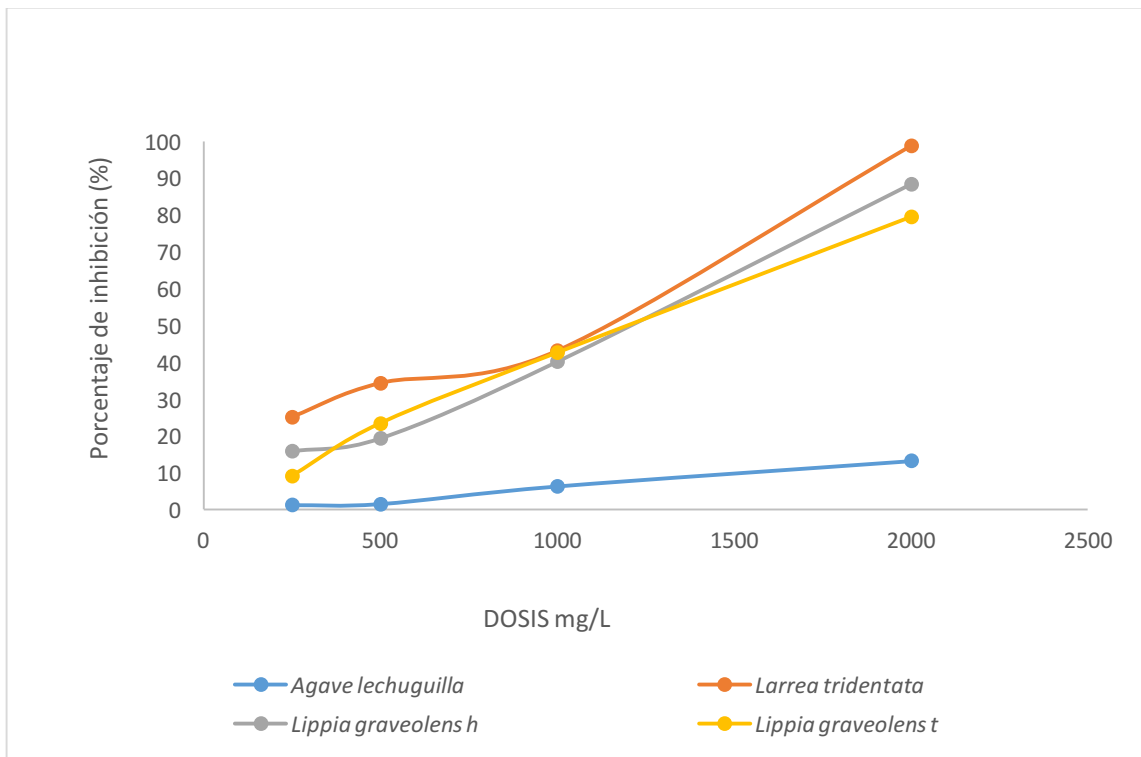


Figura 16. Porcentaje de inhibición de extractos vs *F. circinatum* (SF06).

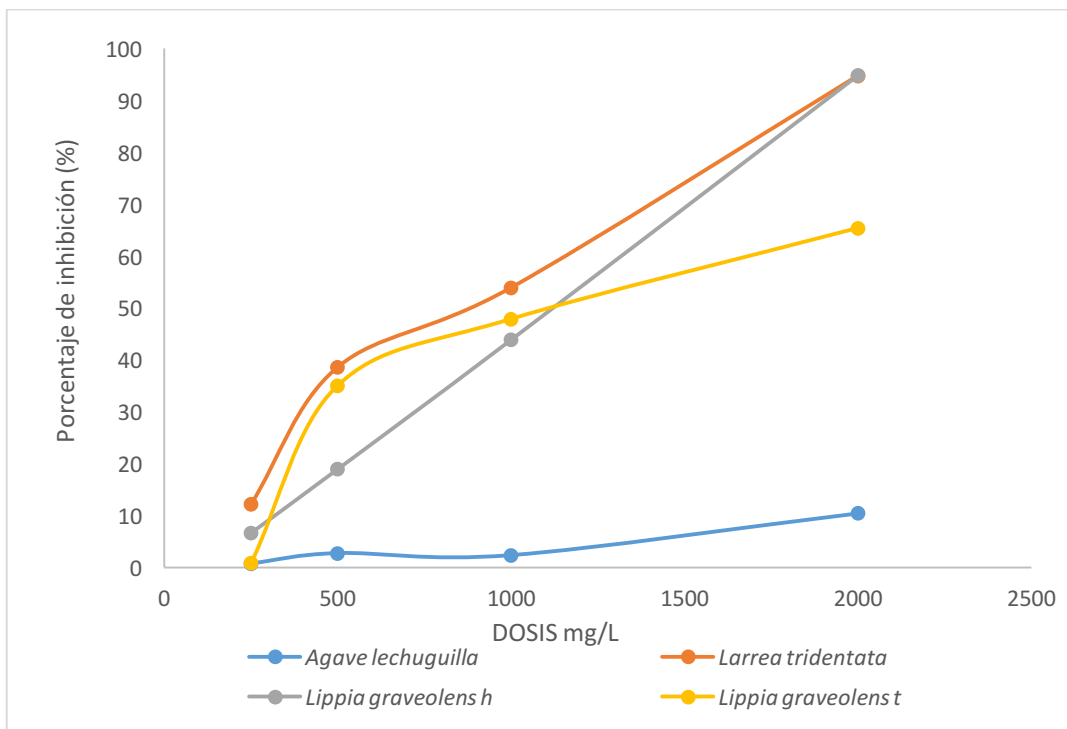


Figura 17. Porcentaje de inhibición de extractos vs *F. oxysporum* (SF20).

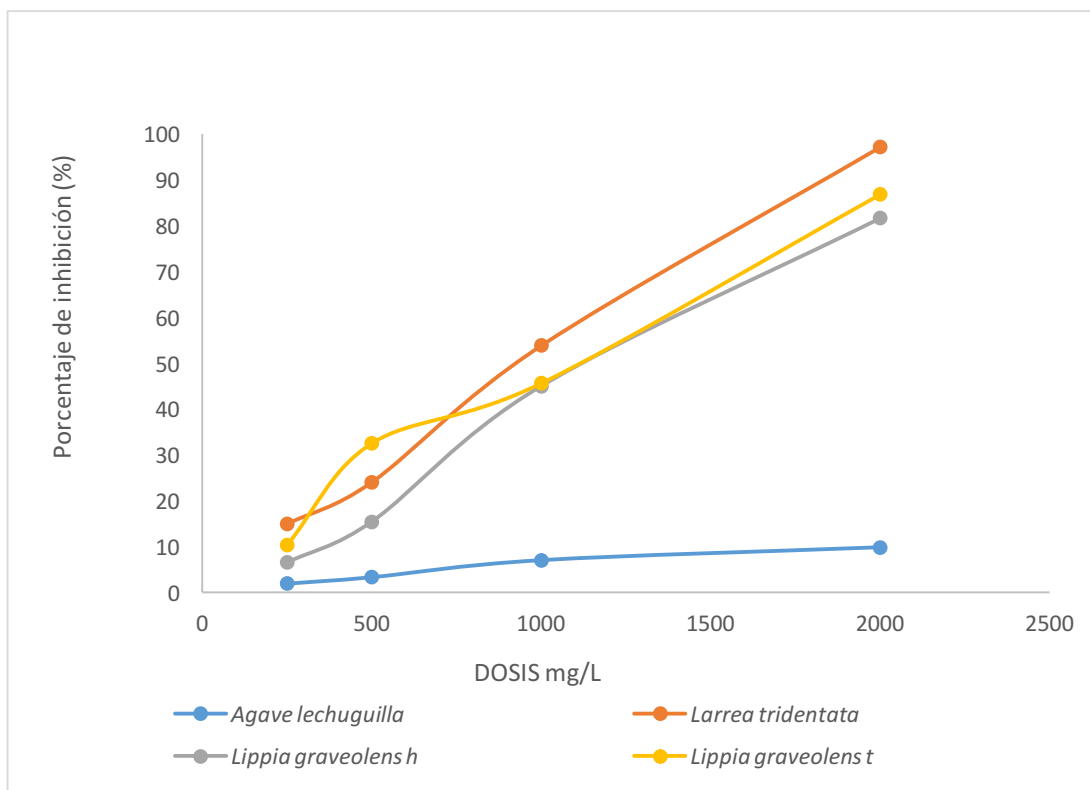


Figura 18. Porcentaje de inhibición de extractos vs *F. circinatum* (SF60).

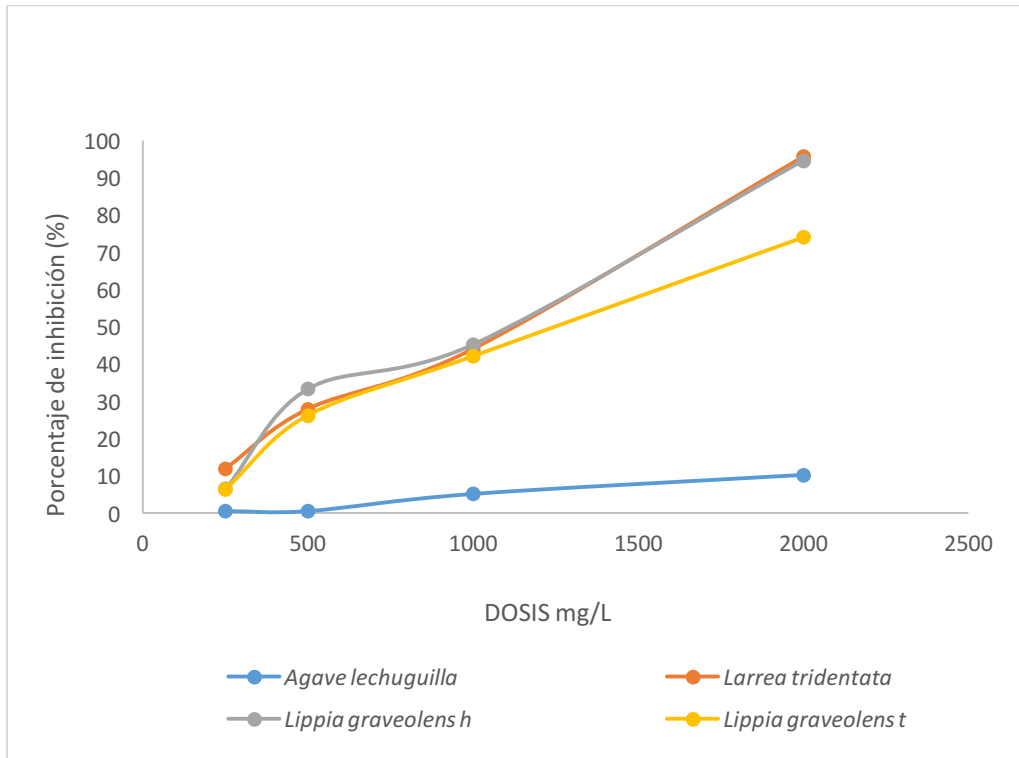


Figura 19. Porcentaje de inhibición de extractos vs *F. circinatum* (SF02).

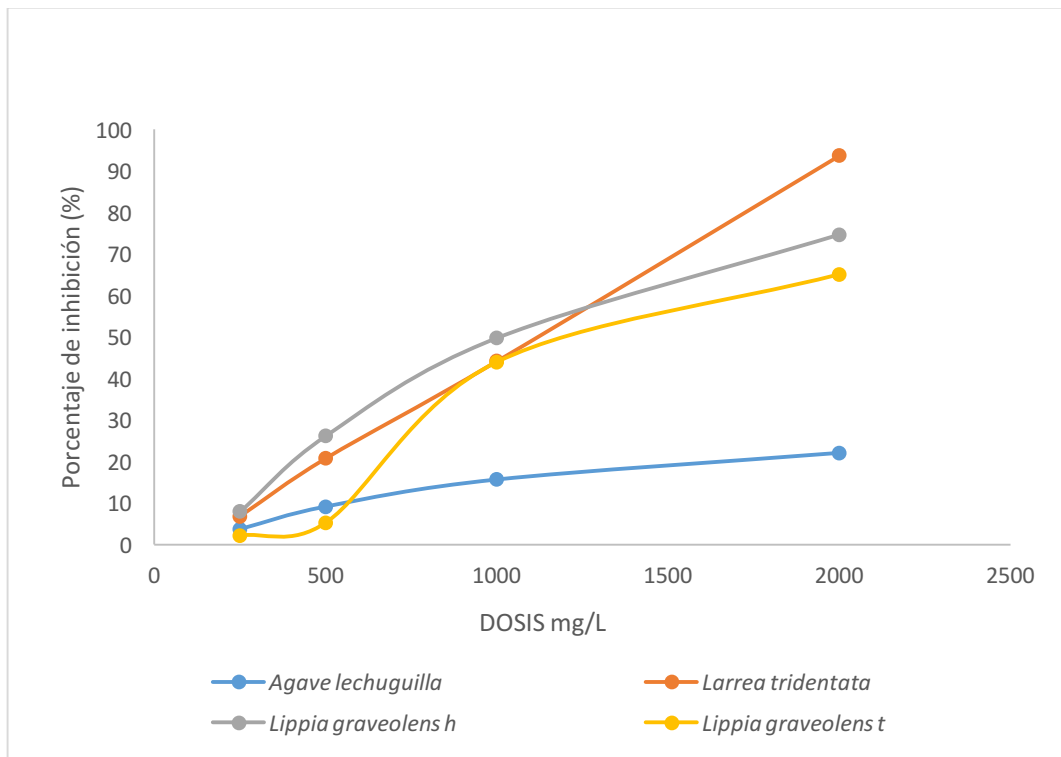
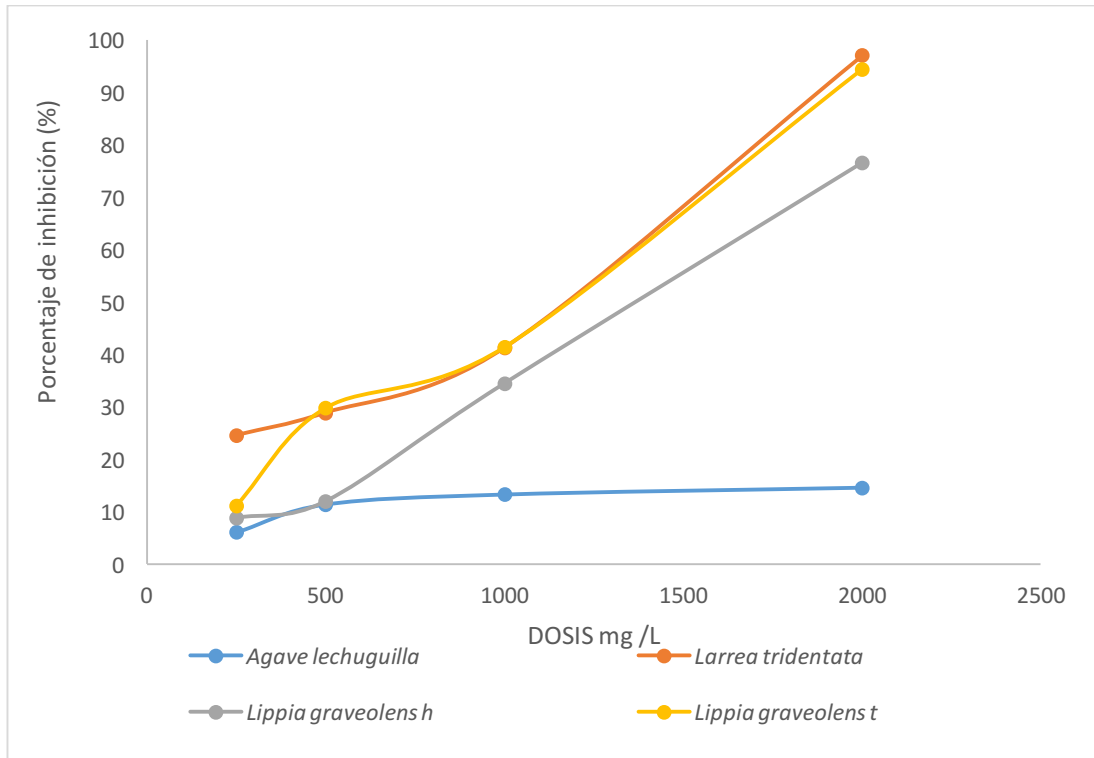
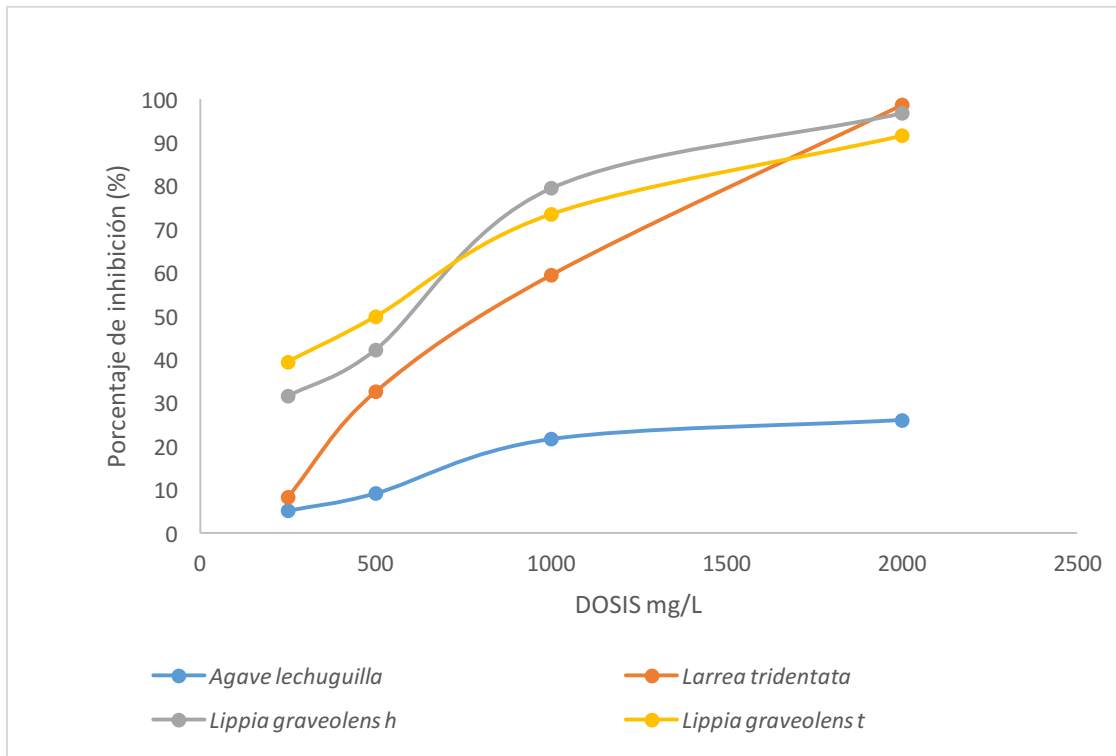


Figura 20. Porcentaje de inhibición de extractos vs *F. circinatum* (SF59).



**Figura 21.** Porcentaje de inhibición de extractos vs *F. oxysporum* (SF10).



**Figura 22.** Porcentaje de inhibición de extractos vs *F. circinatum* (SF22).

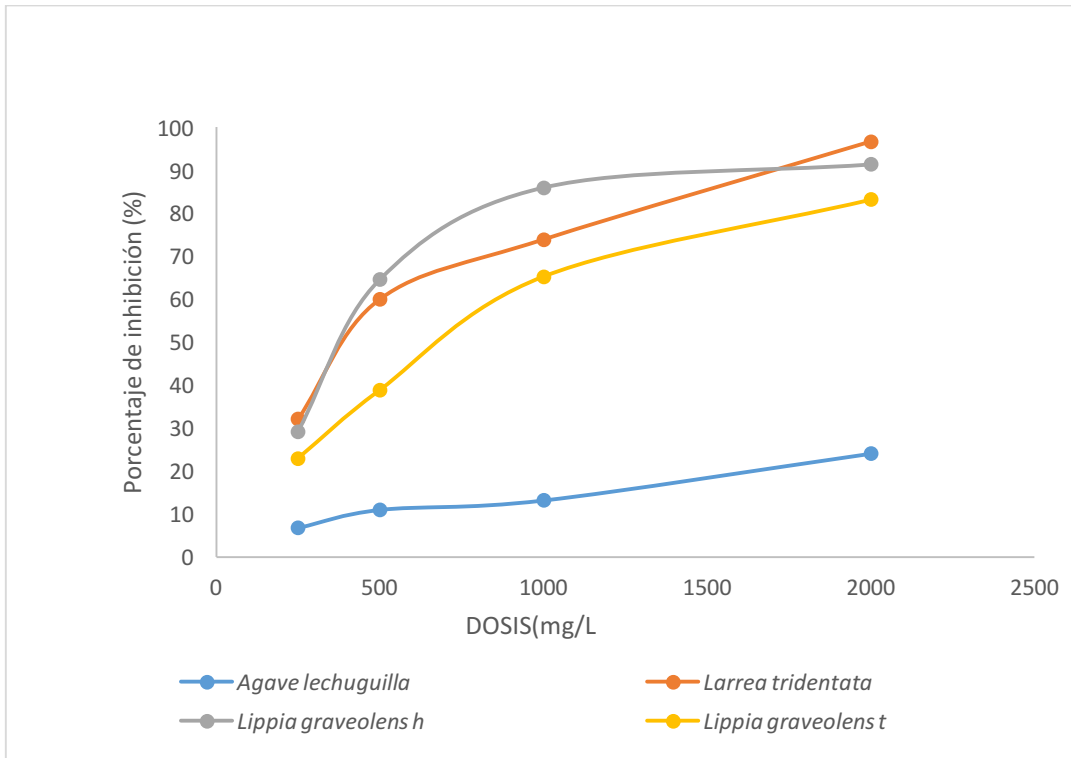


Figura 23. Porcentaje de inhibición de extractos vs *F. circinatum* (SF17).

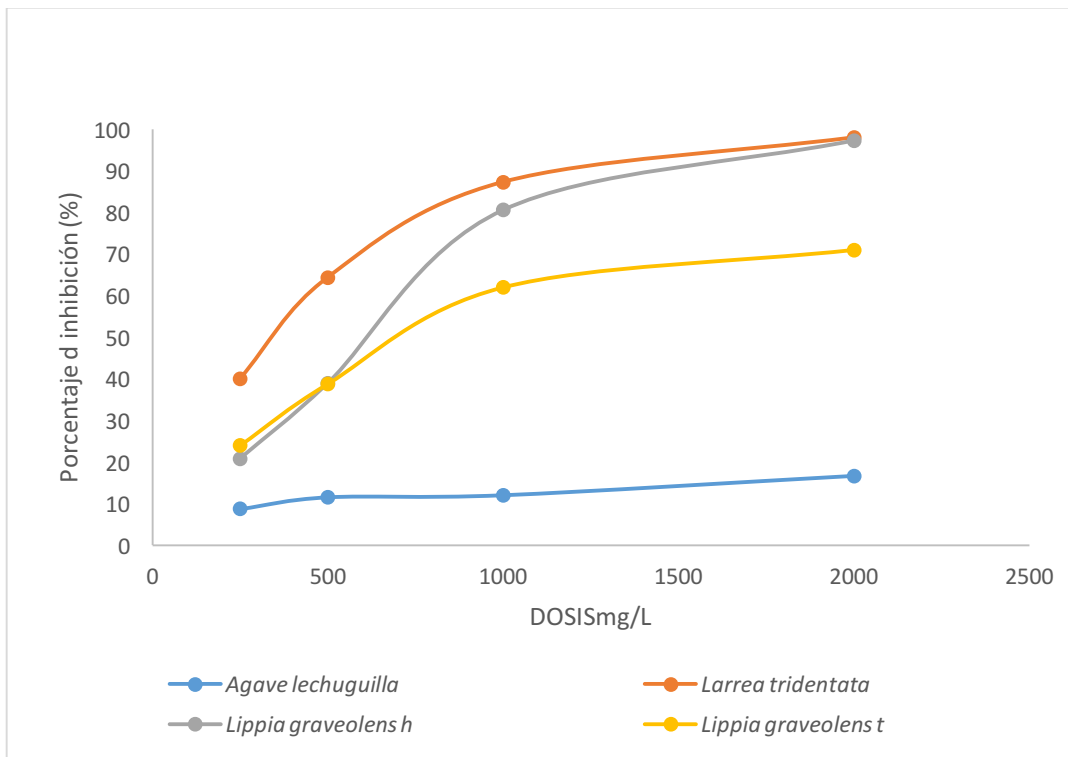


Figura 24. Porcentaje de inhibición de extractos vs *F. circinatum* (SF32).

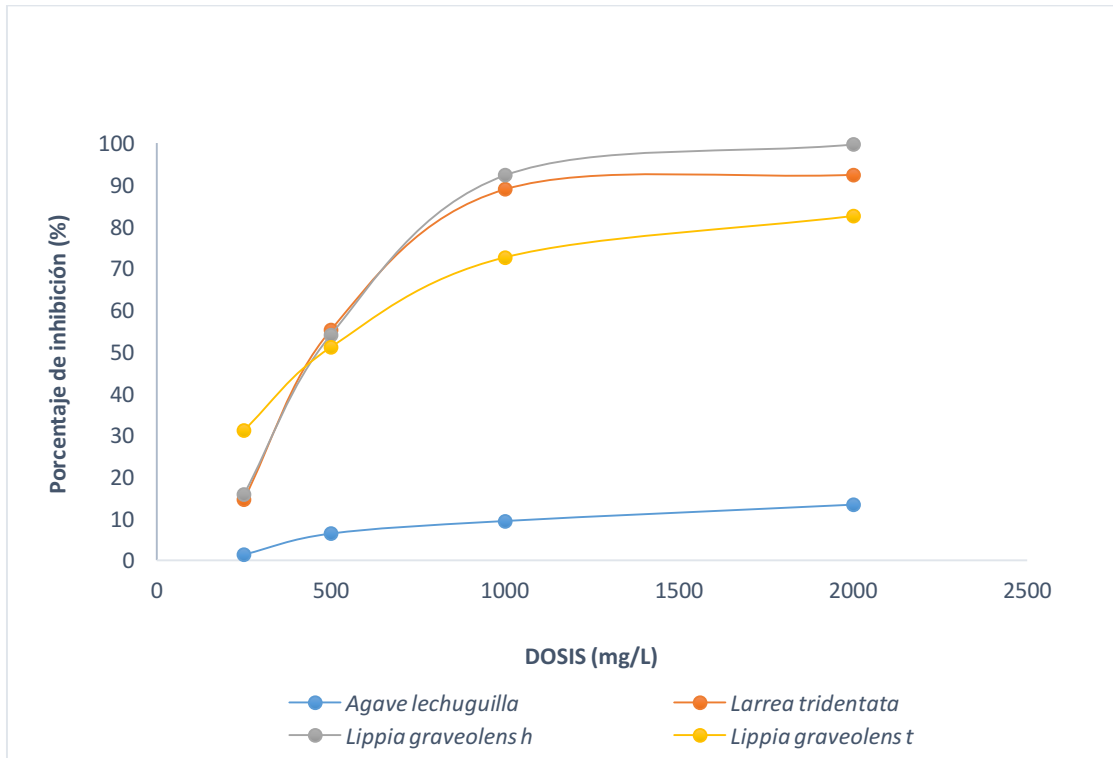


Figura 25. Porcentaje de inhibición de extractos vs *F. circinatum* (SF56).

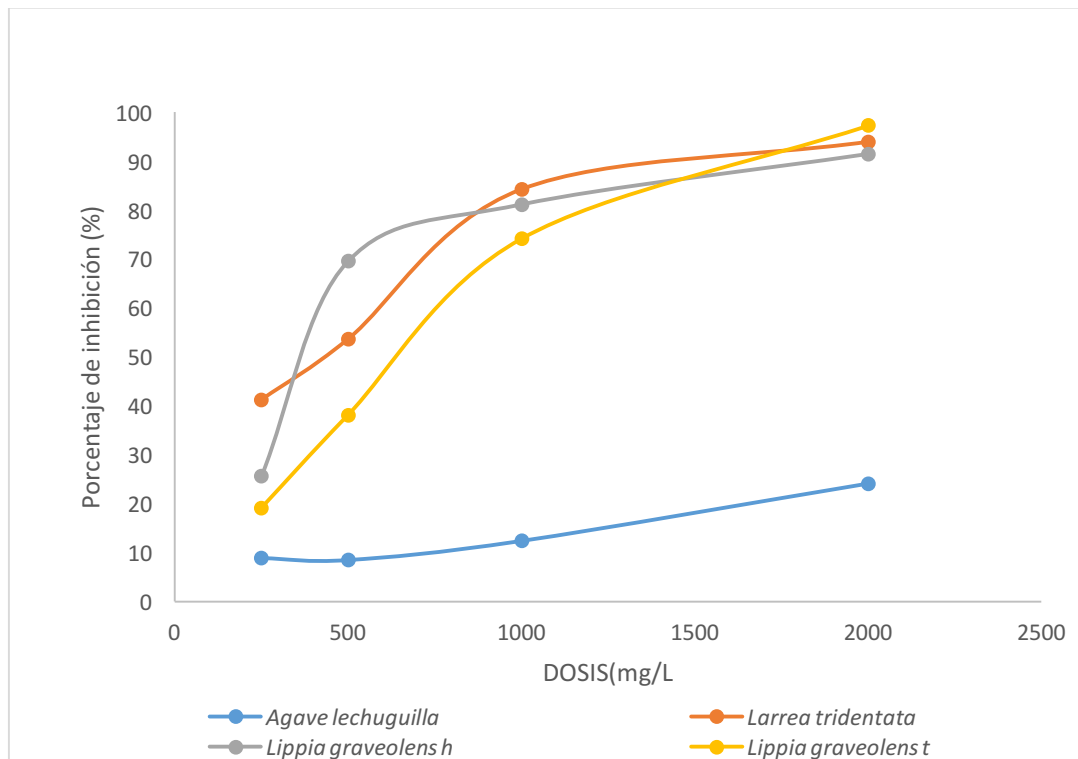


Figura 26. Porcentaje de inhibición de extractos vs *F. circinatum* (SF52).



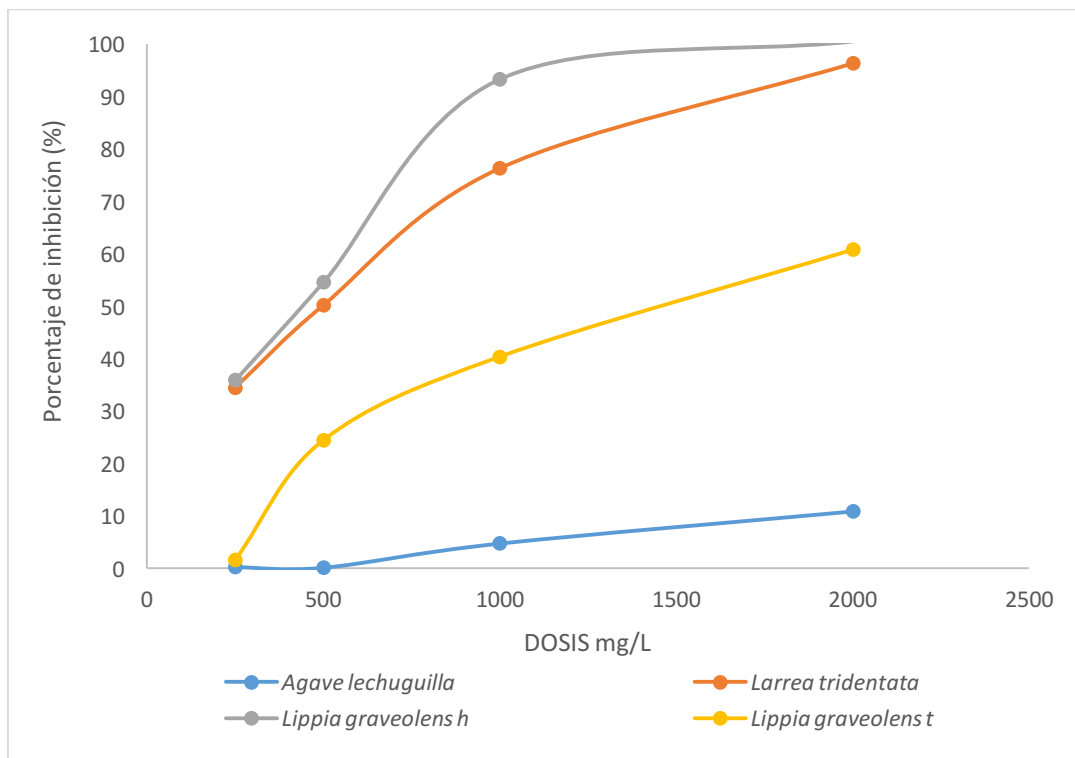


Figura 27. Porcentaje de inhibición de extractos vs *F. circinatum* (SF55).

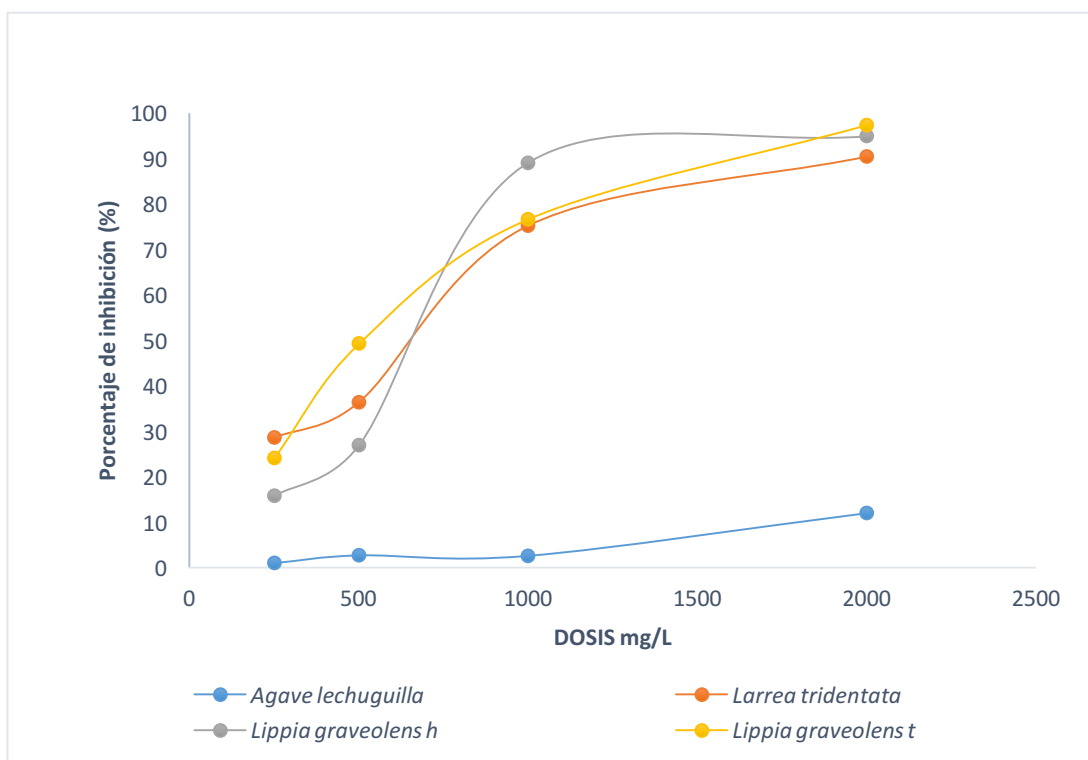


Figura 28. Porcentaje de inhibición de extractos vs *F. circinatum* (SF29).

### **Concentración inhibitoria al 50% (CI50) de los extractos vegetales**

El análisis de varianza mostró que existen diferencias significativas en las CL50 (Cuadro 8); para los extractos acuosos, se obtuvo una CL50 diferente para cada cepa fúngica, la más baja la presentó el extracto de *L. tridentata* hoja con 176 mg/L para *F. circinatum* (SF41) y *L. graveolens* hoja con 376 mg/L para *F. circinatum* (SF52); Caceres-Rueda de León *et al.* (2013), observaron una CL50 de 200 µg/L con extractos acuosos de *L. graveolens* sobre *F. oxysporum* y difieren de lo reportado por Hernández *et al.* (2010), quienes determinaron la CL50 de 1930 µg/L con extractos etanólicos de *L. graveolens* sobre *Rhizoctonia solani*.

Como se puede apreciar en el estudio realizado y en los descritos anteriormente, la CL<sub>50</sub> son diferentes para cada extracto, existen varios factores que pueden influir tales como son: la composición y el método de obtención de cada extracto, ya que cada uno presenta diferentes componentes activos, esto también depende de la parte de la planta utilizada, así como la volatilidad, solubilidad y complejidad de los solventes utilizados. Dunford y Vázquez, (2005) mencionan que los resultados pueden variar debido a las condiciones del proceso de extracción empleadas para la obtención de los productos vegetales (extractos, aceites y oleorresinas), ya que dependiendo de la polaridad de los solventes se extraen compuestos diferentes y aunado a esto se pueden obtener distintos rendimientos, concentraciones y distintos componentes activos.

**Cuadro 8.** Concentración inhibitoria al 50% (CI50) de los extractos vegetales sobre cepas de *Fusarium circinatum* y *F. oxysporum*.

Patógeno	Tratamientos	CL <sub>50</sub>	Patógeno	Tratamientos	CL <sub>50</sub>
<b><i>F. circinatum</i></b> <b>(SF35)</b>	<i>Agave lechuguilla</i>	4545.45 <sub>±</sub> 5D	<b><i>F. circinatum</i></b> <b>(SF11)</b>	<i>Agave lechuguilla</i>	4413.13 <sub>±</sub> 0D
	<i>Larrea tridentata</i>	307.75 <sub>±</sub> 08A		<i>Larrea tridentata</i>	800.85 <sub>±</sub> 03A
	<i>Lippia graveolens h</i>	896.05 <sub>±</sub> 01B		<i>Lippia graveolens h</i>	1042.58 <sub>±</sub> 04C
	<i>Lippia graveolens t</i>	900.20 <sub>±</sub> 03C		<i>Lippia graveolens t</i>	849.41 <sub>±</sub> 02B
<b><i>F. circinatum</i></b> <b>(SF61)</b>	<i>Agave lechuguilla</i>	4347.66 <sub>±</sub> 02D	<b><i>F. circinatum</i></b> <b>(SF13)</b>	<i>Agave lechuguilla</i>	< 10000D
	<i>Larrea tridentata</i>	614.04 <sub>±</sub> 01A		<i>Larrea tridentata</i>	279.31 <sub>±</sub> 07A
	<i>Lippia graveolens h</i>	638.70 <sub>±</sub> 03B		<i>Lippia graveolens h</i>	948.99 <sub>±</sub> 06B
	<i>Lippia graveolens t</i>	4347.66 <sub>±</sub> 9C		<i>Lippia graveolens t</i>	1226.89 <sub>±</sub> 08C
<b><i>F. circinatum</i></b> <b>(SF65)</b>	<i>Agave lechuguilla</i>	<10000 D	<b><i>F. circinatum</i></b> <b>(SF19)</b>	<i>Agave lechuguilla</i>	7418.19 <sub>±</sub> 09 D
	<i>Larrea tridentata</i>	1079.95 <sub>±</sub> 09 B		<i>Larrea tridentata</i>	558.49 <sub>±</sub> 02 A
	<i>Lippia graveolens h</i>	434.28 <sub>±</sub> 01 A		<i>Lippia graveolens h</i>	679.95 <sub>±</sub> 07 B
	<i>Lippia graveolens t</i>	1297.50 <sub>±</sub> 2 C		<i>Lippia graveolens t</i>	959.30 <sub>±</sub> 01 C
<b><i>F. circinatum</i></b> <b>(SF58)</b>	<i>Agave lechuguilla</i>	<10000 D	<b><i>F. circinatum</i></b> <b>(SF04)</b>	<i>Agave lechuguilla</i>	9004.69 <sub>±</sub> 09D

	<i>Larrea tridentata</i>	601.84 <sub>±</sub> 07 A		<i>Larrea tridentata</i>	970.55 <sub>±</sub> 02A
	<i>Lippia graveolens h</i>	619.45 <sub>±</sub> 01 AB		<i>Lippia graveolens h</i>	976.03 <sub>±</sub> 06BC
	<i>Lippia graveolens t</i>	887.31 <sub>±</sub> 01 C		<i>Lippia graveolens t</i>	907.16 <sub>±</sub> 06AB
<b>F. circinatum (SF06)</b>	<i>Agave lechuguilla</i>	7110.56 <sub>±</sub> 09 D	<b>F. circinatum (SF60)</b>	<i>Agave lechuguilla</i>	<10000 D
	<i>Larrea tridentata</i>	928.90 <sub>±</sub> 09 A		<i>Larrea tridentata</i>	991.02 <sub>±</sub> 2A
	<i>Lippia graveolens h</i>	1149.29 <sub>±</sub> 07 B		<i>Lippia graveolens h</i>	1231.50 <sub>±</sub> 04C
	<i>Lippia graveolens t</i>	1226.47 <sub>±</sub> 06 C		<i>Lippia graveolens t</i>	1086.48 <sub>±</sub> 04 B
<b>F. circinatum (SF20)</b>	<i>Agave lechuguilla</i>	9594.75 <sub>±</sub> 06 D	<b>F. circinatum (SF02)</b>	<i>Agave lechuguilla</i>	8716.35 <sub>±</sub> 02D
	<i>Larrea tridentata</i>	941.13 <sub>±</sub> 01 A		<i>Larrea tridentata</i>	1047.49 <sub>±</sub> 04 A
	<i>Lippia graveolens h</i>	1114.04 <sub>±</sub> 03 C		<i>Lippia graveolens h</i>	1045.34 <sub>±</sub> 05AB
	<i>Lippia graveolens t</i>	9594.75 <sub>±</sub> 06 B		<i>Lippia graveolens t</i>	1288.95 <sub>±</sub> 05C
<b>F. circinatum (SF59)</b>	<i>Agave lechuguilla</i>	4714.5 <sub>±</sub> 07 D	<b>F. circinatum (SF10)</b>	<i>Agave lechuguilla</i>	<10000 D
	<i>Larrea tridentata</i>	1114.53 <sub>±</sub> 08 A		<i>Larrea tridentata</i>	986.97 <sub>±</sub> 08 A
	<i>Lippia graveolens h</i>	1221.45 <sub>±</sub> 05 B		<i>Lippia graveolens h</i>	1361.16 <sub>±</sub> 09 C
	<i>Lippia graveolens t</i>	1489.39 <sub>±</sub> 06 C		<i>Lippia graveolens t</i>	1064.82 <sub>±</sub> 08B
<b>F. circinatum (SF22)</b>	<i>Agave lechuguilla</i>	3806.15 <sub>±</sub> 02 D	<b>F. circinatum (SF17)</b>	<i>Agave lechuguilla</i>	4800.18 <sub>±</sub> 05 D

	<i>Larrea tridentata</i>	942.67 <sub>+09</sub> C		<i>Larrea tridentata</i>	461.61 <sub>+09</sub> B
	<i>Lippia graveolens h</i>	604.41 <sub>+06</sub> A		<i>Lippia graveolens h</i>	349.13 <sub>+06</sub> A
	<i>Lippia graveolens t</i>	474.71 <sub>+04</sub> B		<i>Lippia graveolens t</i>	860.78 <sub>+05</sub> C
<b><i>F. circinatum</i></b> <b>(SF32)</b>	<i>Agave lechuguilla</i>	<10000 D	<b><i>F. circinatum</i></b> <b>(SF41)</b>	<i>Agave lechuguilla</i>	5579.20 <sub>+02</sub> D
	<i>Larrea tridentata</i>	189.33 <sub>+03</sub> A		<i>Larrea tridentata</i>	176.70 <sub>+07</sub> A
	<i>Lippia graveolens h</i>	718.64 <sub>+04</sub> B		<i>Lippia graveolens h</i>	824.18 <sub>+03</sub> B
	<i>Lippia graveolens t</i>	980.62 <sub>+09</sub> C		<i>Lippia graveolens t</i>	1068.77 <sub>+03</sub> C
<b><i>F. circinatum</i></b> <b>(SF56)</b>	<i>Agave lechuguilla</i>	7893.29 <sub>+08</sub>	<b><i>F. circinatum</i></b> <b>(SF52)</b>	<i>Agave lechuguilla</i>	4904.27 <sub>+09</sub>
	<i>Larrea tridentata</i>	608.96 <sub>+08</sub>		<i>Larrea tridentata</i>	321.75 <sub>+07</sub>
	<i>Lippia graveolens h</i>	579.37 <sub>+06</sub> A		<i>Lippia graveolens h</i>	376.34 <sub>+09</sub>
	<i>Lippia graveolens t</i>	593.04 <sub>+08</sub> AB		<i>Lippia graveolens t</i>	772.16 <sub>+05</sub>
<b><i>F. circinatum</i></b> <b>(SF29)</b>	<i>Agave lechuguilla</i>	8400.06 <sub>+05</sub> C	<b><i>F. circinatum</i></b> <b>(SF55)</b>	<i>Agave lechuguilla</i>	8130.03 <sub>+04</sub>
	<i>Larrea tridentata</i>	727.548 <sub>+09</sub> A		<i>Larrea tridentata</i>	519.01 <sub>+05</sub> B
	<i>Lippia graveolens h</i>	793.45 <sub>+09</sub> AB		<i>Lippia graveolens h</i>	347.64 <sub>+04</sub> A
	<i>Lippia graveolens h</i>			<i>Lippia graveolens h</i>	1000.43636

Los datos son medias de tres determinaciones, \*valores con misma letra son iguales. (Tukey,  $\alpha=0.05\%$ );

## CONCLUSIONES

Los extractos acuosos de *Lippia graveolens* hoja y tallo y *Larrea tridentata* hoja en general tuvieron una actividad antifúngica alta, ya que presentaron porcentaje de inhibición de 85% en adelante sobre *F. oxysporum* y *F. circinatum*. Las CL50 más bajas fueron de extractos de *L. tridentata* con 176 mg/L para *F. circinatum* (SF41) y *L. graveolens* hoja con 376 mg/L para *F. circinatum* (SF52). Los extractos de *A. lechuguilla* alcanzaron porcentajes inhibitorios bajos sobre *F. oxysporum* y *F. circinatum*.

El método de microdilución en placa permite medir la actividad antifúngica de varios tratamientos y concentraciones, con menor tiempo y menor cantidad de recursos.

## LITERATURA CITADA

- Cáceres-Rueda de León, I., Colorado-Vargas, R., Salas-Muñoz, E., Muñoz-Castellanos, L. N., y Hernández-Ochoa, L. 2013. Actividad Antifúngica *in vitro* de Extractos Acuosos de Especies contra *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp., *Penicillium digitatum* y *Aspergillus niger*. Revista mexicana de fitopatología, 31(2), 105-112.
- Castillo, F., Hernández, D., Gallegos, G., Mendez, M., Rodríguez, R., Reyes, A., and 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.
- Cibrián T., D., D. S. E. García, y M. B. Don Juan. 2008. Manual de identificación y manejo de plagas y enfermedades en germoplasma y planta producida en viveros. CONAFOR. México. 153 p
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (Conabio). 1998. La diversidad biológica de México. —Estudio de paísll. Consultado: 15 septiembre 2019. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx>.
- Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin. Micro-biol. Rev. 10: 564-582.
- Cruz, S. M., Velásquez, R., Lima, S., Menéndez, M. C., Dardón, R., Córdova, D., and González, J. 2011. Assessment of antioxidant activity of 24 native plants used in Guatemala for their potential application in natural product industry. In International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants IMAPS2010 and History of Mayan Ethnopharmacology IMAPS2011 964 (pp. 85-92).

- Dunford N.T., Silva-Vazquez R. (2005). "Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacrol concentrations in Mexican oregano grown under controlled conditions". *J Appl Hort.* 7 (1); 2005, pp. 20–22.
- Gabrielson, J., Hart, M., Jarelöv, A., Kühn, I., McKenzie, D., and Möllby, R., 2002. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *Journal of Microbiological Methods*, 50(1), 63-73.
- Güereca, M. C. G., Hernández, M. S., Kite, G., and Vázquez, M. M., 2007. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(1), 43-49.
- Hernández, T., Canales, M., García, A. M., Duran, Á., Meráz, S., Dávila, P., and Ávila, J. G. 2008. Antifungal activity of the essential oils of two verbenaceae: *Lantana achyranthifolia* and *Lippia graveolens* of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7(4).
- Hernández-Castillo, F. D., Castillo-Reyes, F., Gallegos-Morales, G., Rodríguez-Herrera, R., and Aguilar-González, C. N. 2010. *Lippia graveolens* and *Carya illinoensis* organic extracts and their *in vitro* effect against *Rhizoctonia solani* Kuhn. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 5(3), 380-384.
- Hernández-Castillo, F. D., Castillo-Reyes, F., Gallegos-Morales, G., Rodríguez - Herrera, R. and Aguilar, C. 2011. Plant Extracts from Mexican Native Species: An Alternative for Control of Plant Pathogens. In: R. Nokkoul, ed., *RESEARCH IN ORGANIC FARMING*, 1st ed. Croacia: Raumjit Nokkoul, pp.139-156.
- Hernández-Soto, R. y Díaz-Jiménez, L. 2008. Lechuguilla: *Agave Lechuguilla* Torrey. En: C. Aguilar, R. Rodríguez Herrera, S. Saucedo Pompa & D. Jasso Cantu, ed., *FITOQUIMICOS SOBRESALIENTES DEL SEMIDESIERTO MEXICANO: De la Planta a los Químicos Naturales y a la Biotecnología*, 1st ed. Saltillo, Coahuila, México: Cristóbal Noe Aguilar, Raúl Rodríguez Herrera Saúl Saucedo Pompa, pp.209-215.
- Jasso de Rodríguez, D. J., García, R. R., Castillo, F. H., González, C. A., Galindo, A. S., Quintanilla, J. V., and Zuccolotto, L. M. 2011. *In vitro* antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 960-966.
- Martins, S., Aguilar, C. N., Teixeira, J. A., and Mussatto, S. I., 2012. Bioactive compounds (phytoestrogens) recovery from *Larrea tridentata* leaves by solvents extraction. *Separation and Purification Technology*, 88, 163–167.

- Martins, S., Amorim, E. L., Sobrinho, T. J. P., Saraiva, A. M., Pisciotano, M. N., Aguilar, C. N., and Mussatto, S. I., 2013. Antibacterial activity of crude methanolic extract and fractions obtained from *Larrea tridentata* leaves. *Industrial Crops and Products*, 41 (1), 306-311.
- Masoko, P., Picard, J., and Eloff, J. N., 2005. Antifungal activities of six south African *Terminalia* species (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 99(2), 301-308.
- Méndez, M., Rodríguez, R., Ruiz, J., Morales-Adame, D., Castillo, F., Hernández-Castillo, F. D., and Aguilar, C. N. 2012. Antibacterial activity of plant extracts obtained with alternative organics solvents against food-borne pathogen bacteria. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 445-450.
- Mercado-Martínez, D. y Aguilar, C.N. 2008. Gobernadora (*Larrea tridentata*). In: C. Aguilar, R. Rodríguez Herrera, S. Saucedo Pompa & D. Jasso Cantu, ed., *FITOQUIMICOS SOBRESALIENTES DEL SEMIDESIERTO MEXICANO: De la Planta a los Químicos Naturales y a la Biotecnología*, 1st ed. Saltillo, Coahuila, México: Cristóbal Noe Aguilar, Raúl Rodríguez Herrera Saúl Saucedo Pompa, pp.103-113.
- Moreno-Limón, S., González-Solís, L. N., Salcedo-Martínez, S. M., Cárdenas-Ávila, M. L., & Perales-Ramírez, A. (2011). Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica*, (32), 193-205.
- Peterson, M. 2008. *Fusarium* species. A British Columbia perspective in forest seedling production. In: Dumroese, R. K., Riley L. E. (technical coordinators). *National Proceedings: Forest and Conservation Nursery Associations 2007*. Fort Collins (CO): USDA Forest Service, Rocky Mountain Research Station. Proceedings RMRS-P-57: 109-125.
- Rivera-Castañeda, G., Martínez-Téllez, M.A., Vallejo-Cohen, S., Alvarez-Manzanilla, G., Vargas-Arispuro, I., Moya-Sanz, P., and Primo-Yúfera, E. 2001. In vitro inhibition of mycelial growth of *Tilletia indica* by extracts of native plants from Sonora, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:214-217
- Ruitón, C. M. F., Alcarraz, M. R., y Vidalón, M. T. 1998. Flavonoides y alcaloides de *Lupinus ballianus* CC Smith con actividad antibacteriana y antifúngica. *Ciencia e Investigación*, 1(2), 71-80.
- Sahgal, G., Ramanathan, S., Sasidharan, S., Mordi, M.N., Ismail, S. and Mansor, S.M. 2009. Phytochemical and antimicrobial activity of *Swietenia mahagoni* crude methanolic seed extract. *Tropical Biomedicine* 26(3), 274-279.



- Sidana, J., Singh, B., & Sharma, O. P., 2016. Saponins of Agave: Chemistry and bioactivity. *Phytochemistry*
- Silva-Vázquez, R., Gastelum- Franco, M. G., Torres- Muñoz, J.V., y Nevárez-Moorillon V. 2008. Las especies de orégano en México. In: C. Aguilar, R. Rodríguez Herrera, S. Saucedo Pompa & D. Jasso Cantu, ed., FITOQUIMICOS SOBRESALIENTES DEL SEMIDESIERTO MEXICANO: De la Planta a los Químicos Naturales y a la Biotecnología, 1st ed. Saltillo, Coahuila, México: Cristóbal Noe Aguilar, Raúl Rodríguez Herrera Saúl Saucedo Pompa, pp.209-215. 142-160
- Stuardo, M. and San Martín, R. Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea*. *Ind Crops Prod.* 2008; 27: 296-302.
- Ujváry, I. 2002. Transforming natural products into natural pesticides-experiences and expectations. *Phytoparasitica* 30: 439-441.
- Usman, H., Abdulrahman, F.I. and Usman, A. 2009. Qualitative phytochemical screening and in vitro antimicrobial effects of methanol stem bark extract of *Ficusthonningii* (Moraceae). *Afr. J. Trad.* 6(3), 289-295
- Velásquez, V.R. 1981. Evaluación de la actividad fungicida de la resina de gobernadora sobre *Eutypa armeniacae* Hansand Carter. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 48 p

## **Actividad 1.8. CONTROL QUÍMICO *IN-VITRO* DE *Fusarium circinatum* Y *F. oxysporum* AISLADOS DE PINO EN MÉXICO.**

Omar Alejandro Pérez-Vera. UACH, [oalejandroversa@gmail.com](mailto:oalejandroversa@gmail.com)

Jairo Cristóbal Alejo. Yucatán, [jairoca54@hotmail.com](mailto:jairoca54@hotmail.com)

Silvia Edith García-Díaz. UACH, [edith65@gmail.com](mailto:edith65@gmail.com)

David Cibrián-Tovar. UACH, [dcibrian@gmail.com](mailto:dcibrian@gmail.com)

El control químico para controlar enfermedades fúngicas se ha empleado desde siempre; sin embargo, la aplicación desmedida y no supervisada ha provocado la generación de cepas resistentes. Por lo que surge la necesidad de evaluar las dosis recomendadas contra aquellas que los viveristas usan durante la producción de planta. En este trabajo se evalúa la dosis baja, media y alta, y su efectividad contra *Fusarium circinatum* y *F. oxysporum*.

### **METODOLOGÍA**

#### **Aislamiento, purificación e identificación de los hongos**

Se obtuvieron dos aislamientos del género *Fusarium*: *F. circinatum* de *Pinus devoniana* de Zinapécuaro, Michoacán (SFV05), México y *F. oxysporum* de *P. cembroides* del vivero Providencia, Sayula, Jalisco (SFV04). Secciones de 5 mm de longitud, previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2%, lavadas con agua destilada a estéril, se secaron y se incubaron en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) durante 10 días a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C. Cada aislamiento se purificó mediante cultivos monoconidiales y se identificó la especie por características morfológicas (Leslie y Summerell, 2006) y mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplificando el espaciador intergénico (IGS) con los iniciadores CIRC1A/CIRC4A (Hurley *et al.*, 2007). Cada secuencia se comparó con las reportadas en el banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

#### **Preparación del PDA + fungicidas**

Ocho fungicidas se adicionaron por separado en medio de cultivo PDA líquido a una temperatura de 32 a 36 °C. Los fungicidas fueron: Boscalid + Pyraclostrobin, Captán, Clorotalonil, Oxicloruro de Cobre, Propamocarb + Fosetil, Tebuconazole, Tiabendazol y Procloraz, todos ellos en tres dosis (baja, media y alta), se obtuvieron

24 tratamientos de fungicidas por cada una de las especies de *Fusarium* (Cuadro 9). Las dosis por litro en partes por millón (ppm). Los fungicidas se mezclaron con el PDA líquido, se vaciaron en cajas de Petri de plástico de 80 mm de diámetro, se dejó reposar durante 48 h y posteriormente se sembraron con los aislamientos de *Fusarium* en los 24 tratamientos. Un disco de 3 mm de diámetro de PDA con crecimiento activo (10 días) de los aislamientos de *F. circinatum* y *F. oxysporum*, se colocaron en el centro de la caja Petri con cada tratamiento, incluyendo el testigo (PDA sin fungicida) y se incubaron  $25 \pm 2$  °C. El diámetro de crecimiento micelial se evaluó a los 12 días.

**Cuadro 9.** Fungicidas y dosis probadas *in vitro* para el control de *Fusarium circinatum* y *F. oxysporum* aislado de pino.

Ingrediente activo (i.a.)	Dosis		
	Baja	Media	Alta
Tebuconazole (250 g/kg)	0.35 L <sup>-1</sup> - 1000 L <b>75 ppm (TE-75)</b> 0.35 ml - 1 L <sup>-1</sup>	0.75 L <sup>-1</sup> - 1000 L <b>125 ppm (TE-125)</b> 0.75 ml - 1 L <sup>-1</sup>	1 L <sup>-1</sup> - 1000 L <b>150 ppm (TE-150)</b> 1 ml - 1 L <sup>-1</sup>
Oxicloruro de Cobre (500 g/kg)	2 Kg - 1000 L <sup>-1</sup> <b>1000 ppm (OC-1000)</b> 2 g - 1 L <sup>-1</sup>	3 Kg - 1000 L <sup>-1</sup> <b>1500 ppm (OC-1500)</b> 3 g - 1 L <sup>-1</sup>	4 Kg - 1000 L <sup>-1</sup> <b>2000 ppm (OC-2000)</b> 4 g - 1 L <sup>-1</sup>
Clorotalonil (720 g/kg)	1.5 L <sup>-1</sup> - 1000 L <sup>-1</sup> <b>1080 ppm CL-1080</b> 1.5 ml - 1 L <sup>-1</sup>	2.5 L <sup>-1</sup> - 1000 L <sup>-1</sup> <b>1800 ppm (CL-1800)</b> 2.5 ml - 1 L <sup>-1</sup>	3.5 L <sup>-1</sup> - 1000 L <sup>-1</sup> <b>2520 ppm (CL-2520)</b> 3.5 ml - 1 L <sup>-1</sup>
Tiabendazol (600 g/kg)	0.5 Kg - 1000 L <sup>-1</sup> <b>300 ppm (TI-300)</b> 0.5 g - 1 L <sup>-1</sup>	2 Kg - 1000 L <sup>-1</sup> <b>1200 ppm (TI-1200)</b> 2 g - 1 L <sup>-1</sup>	3 Kg - 1000 L <sup>-1</sup> <b>1800 ppm (TI-1800)</b> 3 g - 1 L <sup>-1</sup>
Captán (500 g/kg)	2 Kg - 1000 L <sup>-1</sup> <b>1000 ppm (CA-1000)</b> 2 g - 1 L <sup>-1</sup>	3 Kg - 1000 L <sup>-1</sup> <b>1500 ppm (CA-1500)</b> 3 g - 1 L <sup>-1</sup>	4 Kg - 1000 L <sup>-1</sup> <b>2000 ppm (CA-2000)</b> 4 g - 1 L <sup>-1</sup>
Boscalid + Pyraclostrobin (252 g/kg)	0.8 Kg - 1000 L <sup>-1</sup> <b>201.6 ppm (BP-201.6)</b> 0.8 g - 1 L <sup>-1</sup>	1 Kg - 1000 L <sup>-1</sup> <b>252 ppm (BP-252)</b> 1 g - 1 L <sup>-1</sup>	1.2 Kg - 1000 L <sup>-1</sup> <b>302.4 ppm (BP-302.4)</b> 1.2 g - 1 L <sup>-1</sup>
Propamocarb + Fosetil (530 g/kg)	1 L <sup>-1</sup> - 1000 L <sup>-1</sup> <b>530 ppm (PF-530)</b> 1 ml - 1 L <sup>-1</sup>	2 L <sup>-1</sup> - 1000 L <sup>-1</sup> <b>1060 ppm (PF-1060)</b> 2 ml - 1 L <sup>-1</sup>	3 L <sup>-1</sup> - 1000 L <sup>-1</sup> <b>1590 ppm (PF-1590)</b> 3 ml - 1 L <sup>-1</sup>
Procloraz (450 g/kg)	1 L <sup>-1</sup> - 1000 L <sup>-1</sup> <b>450 ppm (PR-450)</b> 1 ml - 1 L <sup>-1</sup>	1.5 L <sup>-1</sup> - 1000 L <sup>-1</sup> <b>675 ppm (PR-675)</b> 1.5 ml - 1 L <sup>-1</sup>	2.5 L <sup>-1</sup> - 1000 L <sup>-1</sup> <b>1125 ppm (PR-1125)</b> 2.5 ml - 1 L <sup>-1</sup>

## **Evaluación de la sensibilidad *in vitro* de aislados de *Fusarium* spp. a fungicidas.**

Se evaluó la sensibilidad *in vitro* con cuatro fungicidas y cuatro dosis: Sportak 45 ce (Procloraz) y Solaris Bio 250 EW (Tebuconazole) 0, 0.5, 1.5 y 2 mL L<sup>-1</sup>; Serenade opti (*Bacillus subtilis*) y Cabrio C (Boscalid + Pyraclostrobin) 0, 0.5, 1.5 y 2 g L<sup>-1</sup>.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Crecimiento micelial de *Fusarium circinatum* y *F. oxysporum* en PDA + fungicidas**

El análisis de varianza (ANOVA) para la variable crecimiento micelial de *Fusarium circinatum* y *F. oxysporum* en medio de cultivo PDA a los 12 días de aplicados los fungicidas nos permitió detectar que estadísticamente existen diferencias significativas, lo que indica que no todos los fungicidas producen el mismo efecto en el crecimiento de *F. circinatum* y *F. oxysporum*. Para identificar cual o cuales fungicidas inhiben de manera eficaz en el crecimiento, se hizo uso de la prueba de comparación de medias a través de la prueba Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), lo que permite indicar, que todos son capaces de inhibir el crecimiento en medio de cultivo PDA. En *F. circinatum*, los mejores resultados se obtuvieron con Oxicloruro de Cobre, Procloraz, Tebuconazol y Tiabendazol en las tres dosis evaluadas y Captán en dosis alta de 2000 ppm (Cuadro 10), los cuales inhiben totalmente el crecimiento del hongo con relación al testigo que presenta un crecimiento de 75 mm de diámetro (Figuras 29, 30 y 31). Esto nos indica que cualesquiera de los cuatro fungicidas pueden ser usados para el control de *F. circinatum* a excepción de Captán. Los fungicidas que permitieron un mayor crecimiento del hongo fueron Propamocarb + Fosetil y Boscalid + Pyraclostrobin en cualquiera de sus dosis. En el caso de *F. oxysporum*, los fungicidas que inhibieron totalmente el crecimiento fueron Procloraz, Tebuconazole y Tiabendazole y con menor efecto en el crecimiento micelial fueron Clorotalonil, Captan y Oxicloruro de Cobre en las tres dosis evaluadas (Figuras 32, 33 y 34). De igual manera, Propamocarb + Fosetil y Boscalid + Pyraclostrobin se comportaron muy similar como en *F. circinatum*. Los fungicidas más empleados para el control *Fusarium* son: Procloraz, tebuconazole, benomil, captan, difenoconazole y propiconazole (Dwinell *et al.*, 1985; TPCP, 2002; Wingfield *et al.*, 2008). Michell (2005) menciona que *F. circinatum* fue inhibido en su crecimiento hasta un 100% en condiciones *in vitro* con los fungicidas benomil, procloraz y tebuconazol y considera al fungicida propamocarb clorhidrato como ineficaz por no presentar una respuesta de control. Difeconazole y Tebuconazole han mostrado un buen control del damping off en *Pinus radiata* en condiciones de invernadero (SAG,

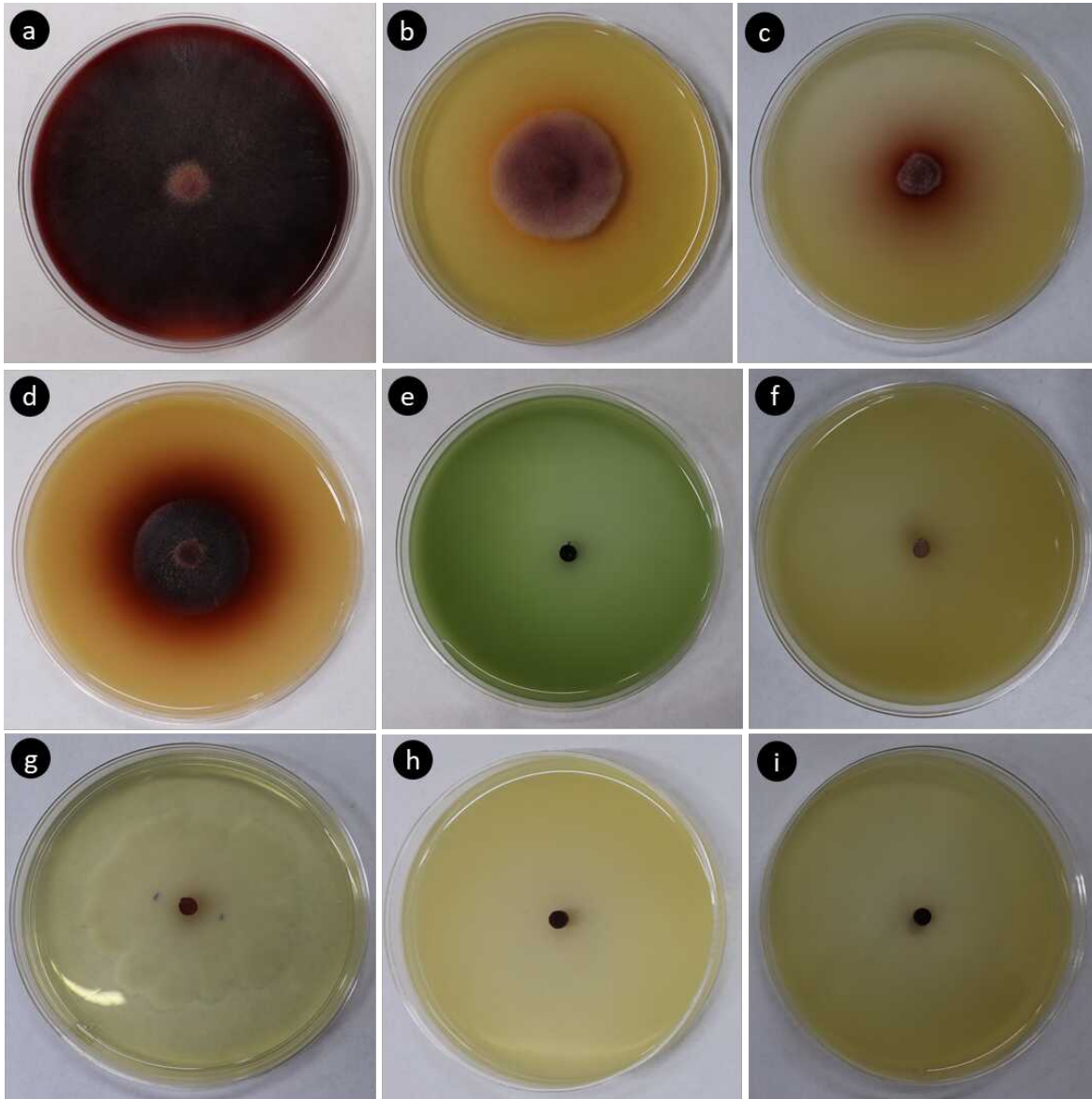
2007). Sin embargo, algunos fungicidas en este estudio deben de ser usados de manera muy cuidadosa para no afectar la salud humana y el medio ambiente, ya que están restringidos por el Consejo de Administración Forestal (FSC, siglas en inglés).

**Cuadro 10.** Crecimiento micelial (mm) del aislamiento de *Fusarium circinatum* en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar + fungicidas en dosis diferentes (ppm).

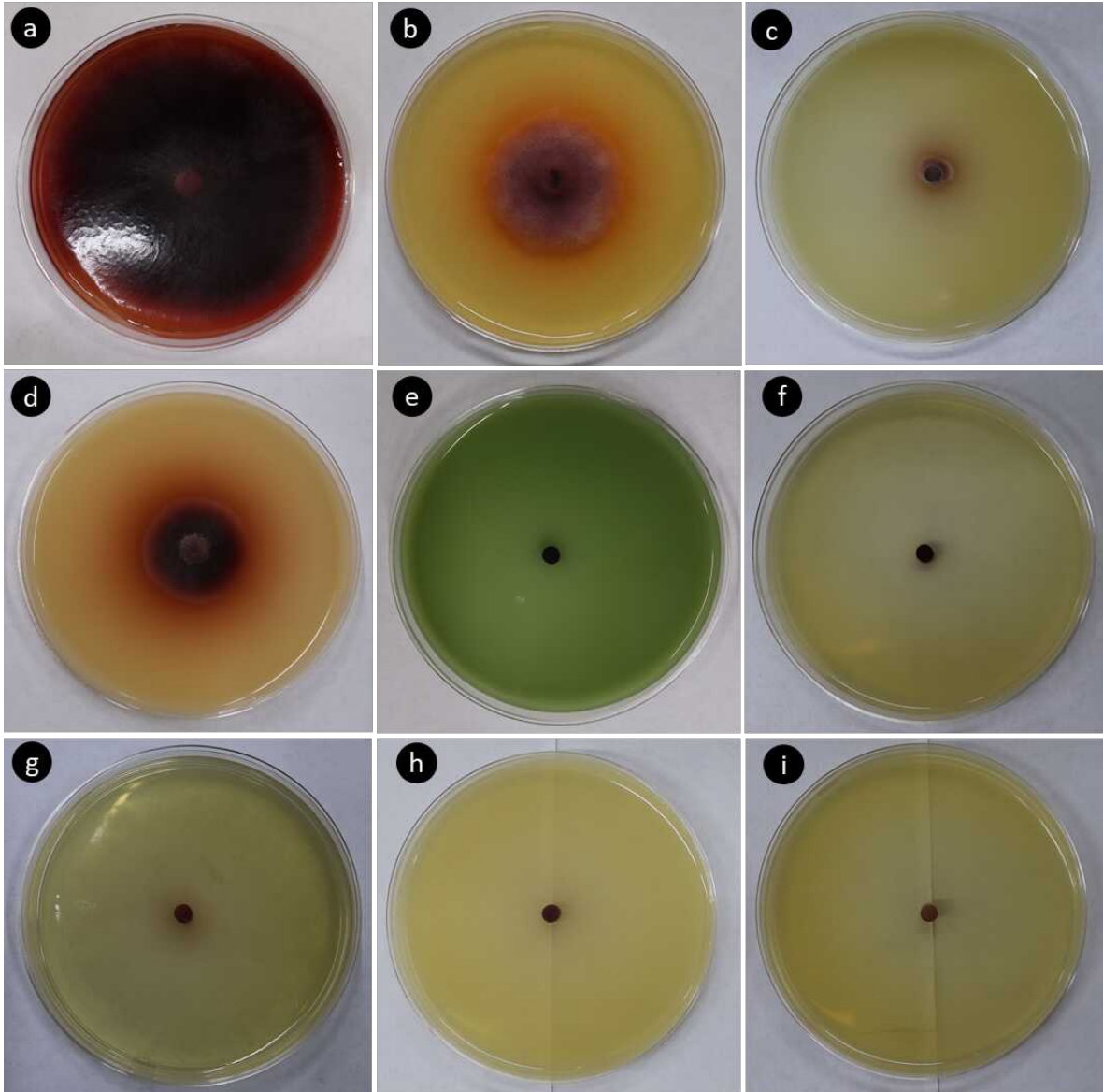
<i>Fusarium circinatum</i>			<i>Fusarium oxysporum</i>		
Tratamiento	Dosis	Media	Tratamiento	Dosis	Media
25 Testigo		75.00a	25 Testigo		80.00a
18 Propamocarb + Fosetil	Alta	51.00b	16 Propamocarb + Fosetil	Media	65.00b
17 Propamocarb + Fosetil	Media	43.00c	17 Propamocarb + Fosetil	Alta	56.20c
16 Propamocarb + Fosetil	Baja	35.40d	18 Propamocarb + Fosetil	Alta	48.40c
1 Boscalid + Pyraclostrobin	Baja	23.20e	3 Boscalid + Pyraclostrobin	Baja	33.40d
	Media	23.00e		Media	27.20d
2 Boscalid + Pyraclostrobin	Alta	23.00e	1 Boscalid + Pyraclostrobin	Media	25.00d
	Baja	15.60f		Baja	12.20e
3 Boscalid + Pyraclostrobin	Media	12.80f	2 Boscalid + Pyraclostrobin	Alta	11.80e
	Alta	11.20fg		Media	11.40e
7 Clorotalonil	Alta	11.20fg	8 Clorotalonil	Media	11.40e
8 Clorotalonil	Baja	8.00gh	7 Clorotalonil	Baja	10.20e
9 Clorotaloni	Media	4.20h	9 Clorotaloni	Baja	8.40ef
4 Captan	Alta	00.00i	11 Oxicloruro de Cobre	Media	7.40ef
5 Captan	Media	00.00i	4 Captan	Alta	7.40ef
6 Captan	Media	00.00i	10 Oxicloruro de Cobre	Alta	4.40ef
14 Procloraz	Alta	00.00i	5 Captan	Alta	4.40ef
11 Oxicloruro de Cobre	Alta	00.00i	6 Captan	Media	00.00f
12 Oxicloruro de Cobre	Baja	00.00i	12 Oxicloruro de Cobre	Baja	00.00f
15 Procloraz	Baja	00.00i	15 Procloraz	Media	00.00f
10 Oxicloruro de Cobre	Media	00.00i	14 Procloraz	Baja	00.00f
19 Tebuconazol	Baja	00.00i	19 Tebuconazol	Baja	00.00f

20 Tebuconazol	Baja	00.00i	20 Tebuconazol	Media	00.00f
13 Procloraz	Media	00.00i	13 Procloraz	Alta	00.00f
22 Tiabendazol	Alta	00.00i	22 Tiabendazol	Alta	00.00f
23 Tiabendazol	Alta	00.00i	23 Tiabendazol	Alta	00.00f
24 Tiabendazol			24 Tiabendazol		
21 Tebuconazol			21 Tebuconazol		

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $P < 0.05$ ).

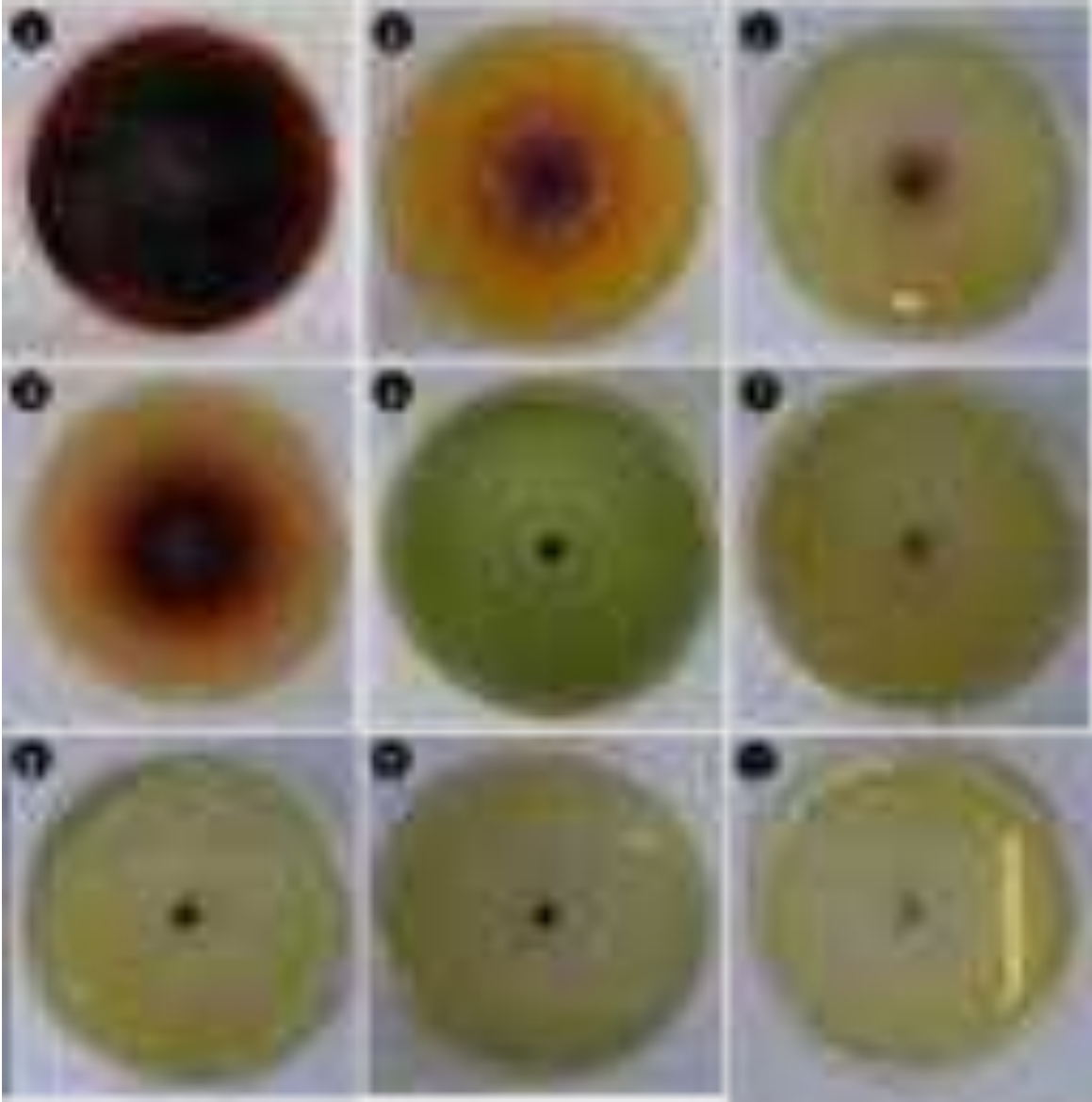


**Figura 29.** Eficiencia de fungicidas en dosis baja para el control *in vitro* de *Fusarium circinatum*, a los 12 días después de la siembra en medio de cultivo PDA + fungicidas. *Fusarium circinatum*. **a)** Testigo; **b)** Boscalid + Pyraclostrobin (206.6 ppm); **c)** Captán (1000 ppm); **d)** Clorotalonil (1080 ppm); **e)** Oxicloruro de Cobre (1000 ppm); **f)** Procloraz (450 ppm); **g)** Propamocarb + Fosetil (530 ppm); **h)** Tebuconazole (75 ppm); **i)** Tiabendazol (300 ppm).

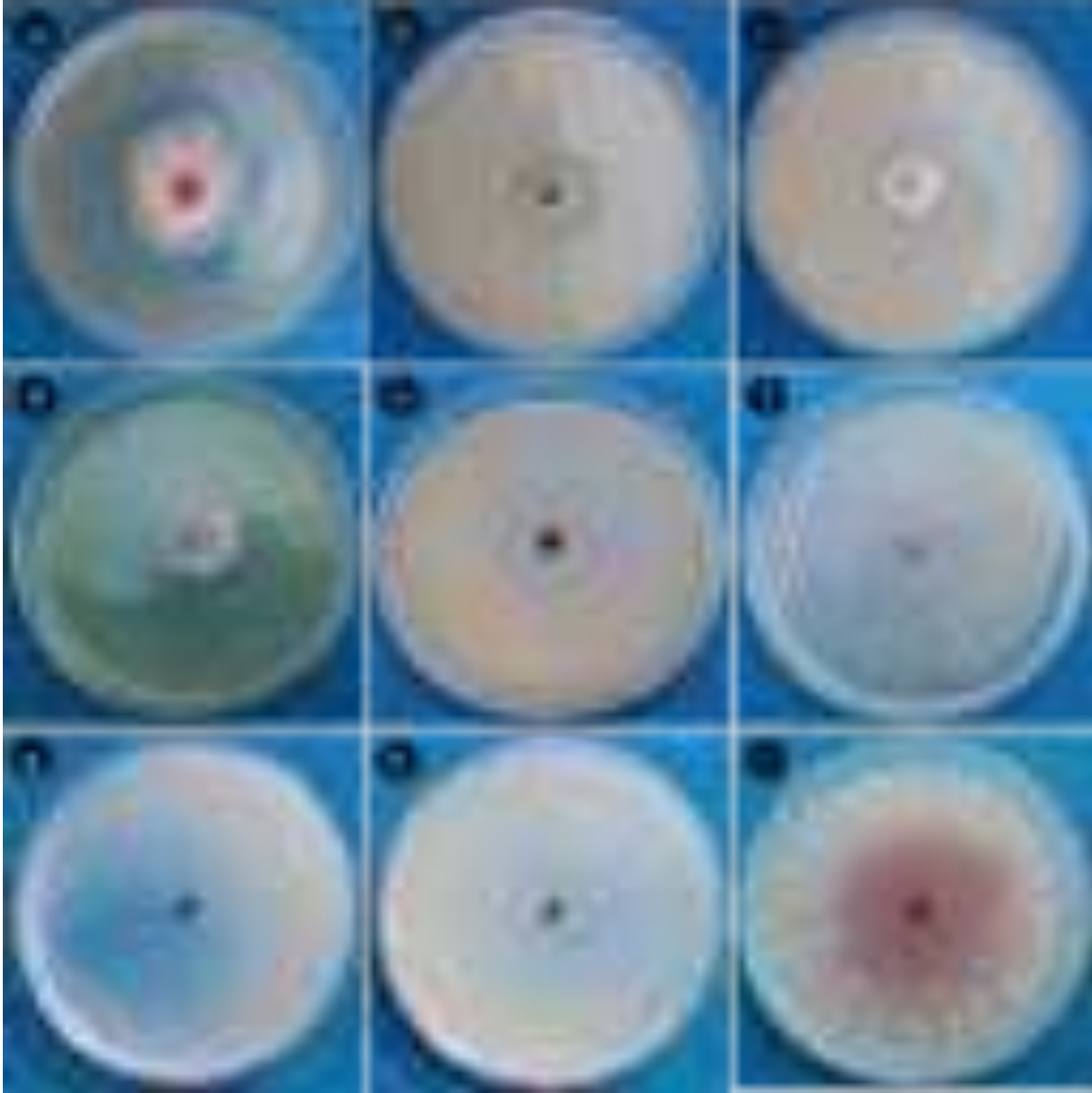


**Figura 30.** Eficiencia de fungicidas en dosis media para el control *in vitro* de *Fusarium circinatum*, a los 12 días después de la siembra en medio de cultivo PDA + fungicidas. *Fusarium circinatum*: **a)** Testigo; **b)** Boscalid + Pyraclostrobin (252 ppm); **c)** Captán (1500 ppm); **d)** Clorotalonil (1800 ppm); **e)** Oxicloruro de Cobre (1500 ppm); **f)** Procloraz (675 ppm); **g)** Propamocarb + Fosetil (1060 ppm); **h)** Tebuconazole (125 ppm); **i)** Tiabendazol (1200 ppm).

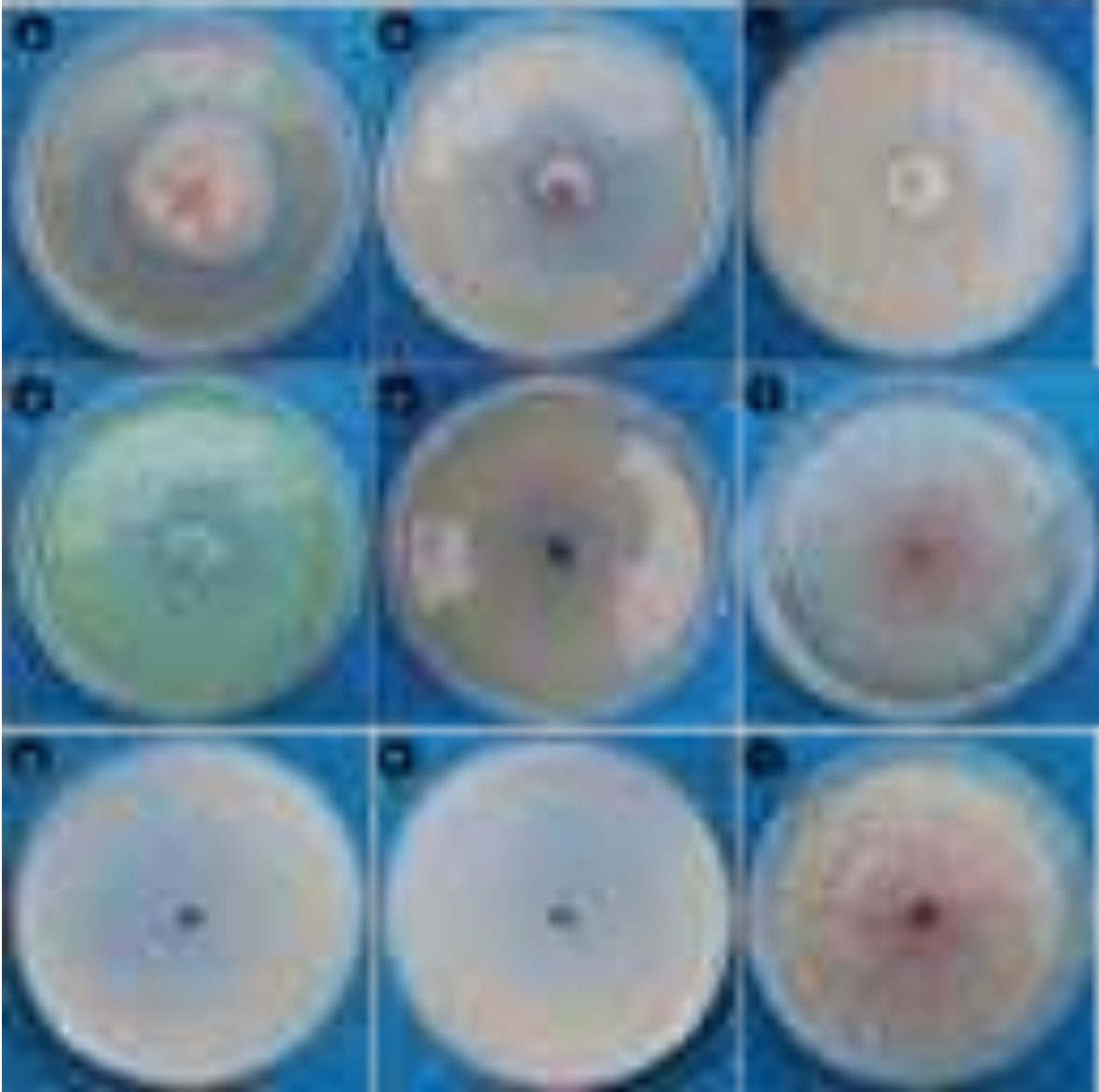




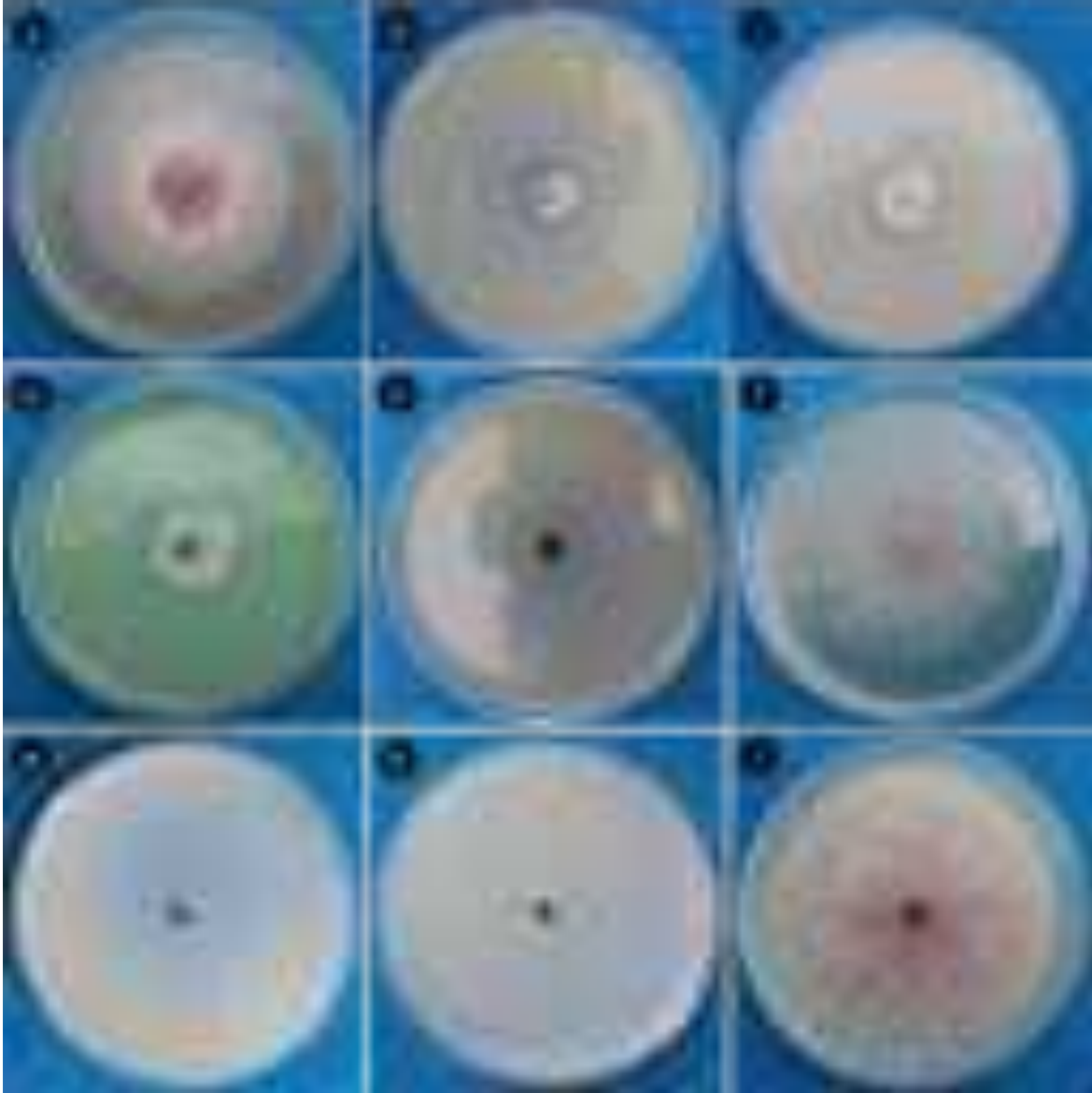
**Figura 31.** Eficiencia de fungicidas en dosis alta para el control *in vitro* de *Fusarium circinatum*, a los 12 días después de la siembra en medio de cultivo PDA + fungicidas. *Fusarium circinatum*: **a)** Testigo; **b)** Boscalid + Pyraclostrobin (302.4 ppm); **c)** Captán (2000 ppm); **d)** Clorotalonil (2520 ppm); **e)** Oxiclورو de Cobre (2000 ppm); **f)** Procloraz (1125 ppm); **g)** Propamocarb + Fosetil (1590 ppm); **h)** Tebuconazole (150 ppm); **i)** Tiabendazol (1800 ppm).



**Figura 32.** Eficiencia de fungicidas en dosis baja para el control *in vitro* de *Fusarium oxysporum*, a los 12 días después de la siembra en medio de cultivo PDA + fungicidas. *Fusarium oxysporum*: **a)** Testigo; **b)** Boscalid + Pyraclostrobin (206.6 ppm); **c)** Captán (1000 ppm); **d)** Clorotalonil (1080 ppm); **e)** Oxiclورو de Cobre (1000 ppm); **f)** Procloraz (450 ppm); **g)** Propamocarb + Fosetil (530 ppm); **h)** Tebuconazole (75 ppm); **i)** Tiabendazol (300 ppm).



**Figura 33.** Eficiencia de fungicidas en dosis media para el control *in vitro* de *Fusarium oxysporum*, a los 12 días después de la siembra en medio de cultivo PDA + fungicidas. *Fusarium oxysporum*: **a)** Testigo; **b)** Boscalid + Pyraclostrobin (252 ppm); **c)** Captán (1500 ppm); **d)** Clorotalonil (1800 ppm); **e)** Oxiclورو de Cobre (1500 ppm); **f)** Procloraz (675 ppm); **g)** Propamocarb + Fosetil (1060 ppm); **h)** Tebuconazole (125 ppm); **i)** Tiabendazol (1200 ppm).



**Figura 34.** Eficiencia de fungicidas en dosis alta para el control *in vitro* de *Fusarium oxysporum*, a los 12 días después de la siembra en medio de cultivo PDA + fungicidas. *Fusarium oxysporum*: **a)** Testigo; **b)** Boscalid + Pyraclostrobin (302.4 ppm); **c)** Captán (2000 ppm); **d)** Clorotalonil (2520 ppm); **e)** Oxicloruro de Cobre (2000 ppm); **f)** Procloraz (1125 ppm); **g)** Propamocarb + Fosetil (1590 ppm); **h)** Tebuconazole (150 ppm); **i)** Tiabendazol (1800 ppm).

#### **Sensibilidad *in vitro* de aislados de *Fusarium spp.*, a fungicidas.**

Se tuvieron diferencias significativas ( $P \leq 0.01$ ): con los fungicidas Sportak y Solaris en sus dosis 0.5, 1.5 y 2 mL L<sup>-1</sup>, los aislados de *Fusarium spp.*, presentaron sensibilidad en un 100 % de inhibición del crecimiento micelial. Con el fungicida

Cabrio según dosis, se obtuvo un rango de inhibición de crecimiento micelial de 63.3-100%. Con los aislados de *F. circinatum* el fungicida ejerció un 100% de inhibición del crecimiento micelial; en los aislados pertenecientes a la especie de *F. oxysporum* (SF10, SF13 y SF20) el porcentaje promedio de inhibición fue del 66.4 %, lo que hace suponer resistencia de estos aislados al fungicida.

El fungicida que indujo menor sensibilidad *in vitro* fue el Serenade, según dosis mostró un rango de inhibición del 44.1-79.4%. Con la dosis alta, el rango de inhibición fue de 49.3-79.4%; en la dosis media se obtuvo un rango de 47.0-76.4%, y para la dosis baja 44.1-70.6. Contra *F. circinatum* este fungicida biológico indujo en promedio una inhibición del 52.5%; para los aislados pertenecientes a *F. oxysporum* el porcentaje fue del 73.2% de inhibición de crecimiento micelial (Cuadro 11).

Se ha demostrado que con el procloraz y el tebuconazole, cuando se aplican al suelo, son efectivos para reducir la incidencia y severidad de la marchitez vascular, que otros como azoxystrobin, benomil, carbendazim y fluidioxonil (Amini y Sidovich, 2010). El primero es no-sistémico, con actividad por contacto y translaminar para un desempeño protectante y curativo local. Mientras que el segundo es fungicida sistémico, curativo y erradicante. Ambos son inhibidores de la biosíntesis del ergosterol, lo que causan una acumulación del lanosterol, que desequilibra la permeabilidad de la membrana celular y sus funciones, lo que resulta en la inhibición del crecimiento del hongo.

**Cuadro 11.** Sensibilidad de aislados de *Fusarium* spp. a fungicidas comerciales.

Fungicida	Aislados de especies de <i>Fusarium</i>																					
	SF02	SF04	SF05	SF06	F10	SF13	F17	SF19	F20	SF22	SF29	SF32	SF35	SF41	SF52	SF55	SF56	SF58	SF59	SF60	SF61	SF65
<b>2*</b>	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
<b>1.5*</b>	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
<b>0.5*</b>	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
<b>2**</b>	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
<b>1.5**</b>	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
<b>0.5**</b>	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
<b>2***</b>	54.9b	79.4b	51.8b	50.5b	72.8c	71.5b	58.9b	55.8b	77.3b	66.9b	49.6b	57.3b	51.1b	52.0b	56.1b	55.9b	57.3b	49.3b	53.1b	56.4b	52.5b	59.4b
<b>1.5***</b>	47.0c	76.3c	48.3c	49.2c	70.4b	69.0c	57.5b c	52.6c	76.4b	66.3b	48.6b	56.2b	48.4c	51.3b	54.0c	52.1c	54.3c	48.3b	51.6b	54.3c	51.2b	53.8c
<b>0.5***</b>	45.5d	70.6d	47.1c	45.3d	68.1d	68.5c	57.0c	47.0d	67.4d	65.9b	46.6c	52.5c	44.9d	47.8c	53.0c	50.5c	53.1c	44.1c	49.5c	53.2c	48.1c	51.4d
<b>2****</b>	100.0 a	67.3e	100.0 a	100.0 a	68.3d	66.3d	100.0 a	100.0 a	69.9c	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
<b>1.5****</b>	100.0 a	66.4e	100.0 a	100.0 a	66.3d e	65.5d e	100.0 a	100.0 a	67.6c d	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
<b>0.5****</b>	100.0 a	63.3f	100.0 a	100.0 a	65.3e	63.7e	100.0 a	100.0 a	67.3d	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
<b>TESTIGO</b>	0.0e	0.0g	0.0d	0.0e	0.0f	0.0f	0.0d	0.0e	0.0e	0.0c	0.0d	0.0d	0.0d	0.0d	0.0d	0.0d	0.0d	0.0d	0.0d	0.0d	0.0d	0.0e

Medias con la misma letra dentro de columnas no son significativamente diferentes, Tukey ( $p \leq 0.05$ )

\*Sportak en mL L-1, \*\* Solaris en mL L-1, \*\*\* Serenade en g L-1 y \*\*\*\* Cabrio en g L-1.

Los aislados SF10, SF13 y SF20 pertenecen a la especie de *Fusarium oxysporum*, los aislados restantes son de la especie *Fusarium circinatum*.

## CONCLUSIONES

Los fungicidas Procloraz, Oxicloruro de Cobre, Tebuconazol y Tiabendazol no permitieron el crecimiento de *Fusarium circinatum* ni de *F. oxysporum* en ninguna de sus tres dosis evaluadas, a excepción de Oxicloruro de Cobre que mostró únicamente un control en *F. circinatum*. Los fungicidas Boscalid + Pyraclostrobin, Captán, Clorotalonil y Propamocarb + Fosetil no controlan efectivamente a ninguna de las dos especies de *Fusarium*.

Los fungicidas Sportak® 45 CE (Procloraz) y Solaris® Bio 250 EW en sus dosis bajas y altas recomendadas, fueron 100 % efectivos para inhibir el crecimiento micelial de los 22 aislados de *Fusarium* spp.,

El fungicida Cabrio® C no resultó efectivo para inhibir el 100 % de crecimiento micelial, para todos los aislados de *Fusarium* spp., lo que hace suponer la generación de resistencia genética a este fungicida.

El fungicida Senerade® Max, mostró los menores niveles de efectividad contra los 22 aislados de *Fusarium* spp.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda la aplicación de Sportak® 45 CE (Procloraz) o Solaris® Bio 250 EW en dosis de 1.5 mL L<sup>-1</sup> de agua para validar su efectividad en vivero y controlar la secadera del *Pinus* spp., causado por *Fusarium* spp., pero sin que se combine con aplicaciones de *Trichoderma* spp.

La aplicación de Cabrio® C, solo se recomienda para aislados susceptibles a este fungicida, en dosis recomendada.

Para el caso de Serenade® Max, como producto biológico se necesita hacer más estudios de efectividad in vitro, por encima de la dosis recomendada; si se quiere mantener un esquema de manejo integrado de la enfermedad, ya que se incluiría como parte del control biológico.



## LITERATURA CITADA

- Amini, J.; Sidovich, D.F. 2010. The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. J. Plant Prot. Res. 50:172-178.
- Castellanos, G.L., Muiño, G.B.L., Lorenzo, N.M.E., Rodríguez, F.A. Gómez, A.M. 2011. Efecto in vitro de siete fungicidas químicos sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. Fitosanidad 15 (1): 31-38. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1562-30092011000100005](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1562-30092011000100005)
- Cibrián T., D., D. S. E. García, y M. B. Don Juan. 2008. Manual de identificación y manejo de plagas y enfermedades en germoplasma y planta producida en viveros. CONAFOR. México. 153 p.
- Dwinell, L.D., J. Barrows, B., Kuhlman, E.G. 1985. Pitch canker: a disease complex of southern pines. Plant Disease 69: 270-276.
- García, D.S.E., Aldrete, A., Alvarado, R.D., Cibrián, T.D., Méndez, M.J.T. Valdovinos, P.G., Equihua, M.A. 2017. Efecto de *Fusarium circinatum* en la germinación y crecimiento de plántulas de *Pinus greggii* en tres sustratos. Agrociencia 51: 895-908.
- Leslie, J. F., and B. A. Summerell. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Ames, Iowa: Blackwell Publishing Asia. 388 p.
- Michell, R.G., Steenkamp, E.T., Coutinho, T.A. and Wingfield, M.J. 2011. The pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*: implications for South African forestry, Southern Forests: Journal of Forest Science 73: 1-13.
- Mora-Aguilera, G., Rivas-Valencia, P., Góngora-Canul, C., Tovar-Soto, A., Cristóbal-Alejo, J., Loeza-kuk, E., Michereff, S., Marinelli, A y Osada-Velázquez, K. 2003. Sistemas Computarizados en la Epidemiología I. 2-LOG ver1.0 y su Aplicación en el diseño de Escalas Diagramáticas Logarítmicas. XXIX Simposio Nacional de Parasitología Agrícola 15-12 de octubre, Puerto Vallarta, Jalisco, México. pp. 2-22.
- SAG (Servicio Agrícola y Ganadero). 2007. *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell: conocimiento del patógeno y establecimiento de bases para su



- control en *Pinus radiata*. (Código: C3-72-08-12). 191 p. Consultado: 3 de noviembre, 2009.  
<http://www.sag.cl/sites/default/files/INFORME%20%20FINAL%20CPF%20Fusarium%20C3-72-08-12.pdf>
- SAS Institute. 2002. The SAS system for windows. Release 9.0. SAS Institute. Cary, NC.
- Storer, A.J., Gordon, T.R, Clark, S.L. 1998. Association of the pitch canker fungus, *Fusarium subglutinans* f. sp. pini with Monterey pine seeds, and seedlings in California. *Plant Pathology*, 7: 649--656. doi: 10.1046/j.1365-3059.1998.00288.x
- TPCP. 2002. *Fusarium circinatum* in pine nurseries: A guide to appropriate management strategies. Tree Pathology Cooperative Programme (TPCP), University of Pretoria, Pretoria, South Africa. URL: <http://www.fabinet.up.ac.za/rc.fabinet.up.ac.za/tpcp/pamphlets/Fusarium.pdf> Consultado: 1 de noviembre, 2019.
- Wingfield, M. J., Hammerbacher, R. J., Ganley, R. J., Gordon, T. R., Wingfield, B. D., Coutinho, T. A. 2008. Pitch canker caused by *Fusarium circinatum*-a growing threat to pine plantations and forests worldwide. *Australasian Plant Pathology*, 37: 319-334.
- Wingfield, M. J., Hammerbacher, R. J., Ganley, R. J., Gordon, T.R., Wingfield, B. D., & Coutinho, T. A. 2008. Pitch canker caused by *Fusarium circinatum*-a growing threat to pine plantations and forests worldwide. *Australasian Plant Pathology*, 37: 319-334.

## **Actividad 1.9. EFECTIVIDAD BIOLÓGICA Y QUÍMICA A NIVEL LABORATORIO DE MOSCA FUNGOSA NEGRA *Bradysia* Y *Lycoriella*.**

Víctor Hugo Marín Cruz. UACH, [victormarin@hotmail.es](mailto:victormarin@hotmail.es)

Juan Esteban Barranco Florido, UAM-X, [barranco@correo.xoc.uam.mx](mailto:barranco@correo.xoc.uam.mx)

Pablo Martínez Gil. UACH, [pablomartinezgilbbm@gmail.com](mailto:pablomartinezgilbbm@gmail.com)

Miriam Guadalupe Huerta Vazquez. UACH, [mirhuva@hotmail.com](mailto:mirhuva@hotmail.com)

Andrea Yoatzin Ladrillero Miguel. UAM-X, [yoattz@gmail.com](mailto:yoattz@gmail.com)

David Cibrián Tovar. UACH [dcibrian48@gmail.com](mailto:dcibrian48@gmail.com)

### **RESUMEN**

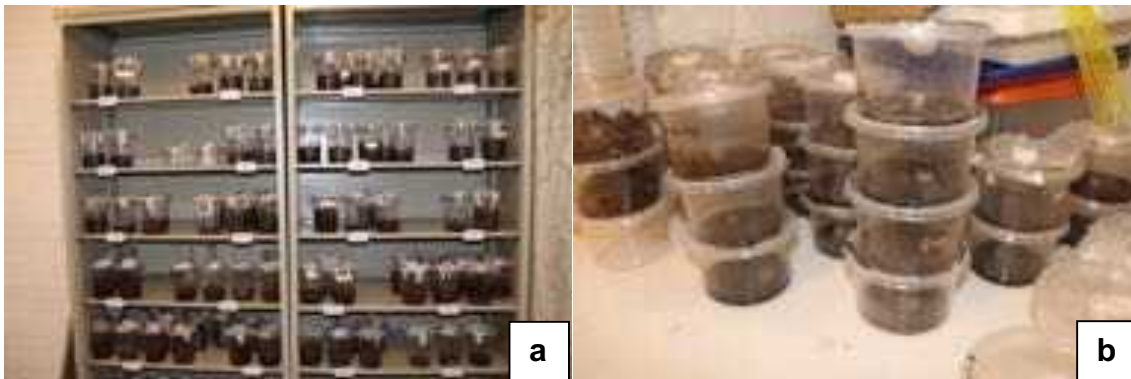
El mosco fungoso negro es la principal plaga que se presenta en los viveros forestales de México, que producen coníferas, causando pérdidas superiores al 30%. A pesar de su importancia no se tiene definido un protocolo de actuación, que precise al viverista los pasos a seguir para el control de la mosca fungosa. En la búsqueda de establecer este protocolo, en el presente trabajo se establecieron dos bioensayos en donde evaluaron métodos de control biológico e insecticidas sintéticos para el control de larvas de *B. impatiens*, primero en laboratorio y segundo en vivero, este segundo se encuentra en proceso de recolecta de datos. En laboratorio los mejores resultados a corto plazo los obtuvieron los insecticidas químicos. Confidor causó la mortalidad corregida de larvas del 100% en 24 h; Agrimec y Ampligo requirieron de cinco días. Los insecticidas Knack y Trigard que funcionan alterando el desarrollo del insecto y tuvieron un resultado de 95 y 75% respectivamente. El nematodo fue el mejor control biológico con 90% de mortalidad, y los hongos entomotógenos (HE) conidios UAM, Bea B, Extracto enzimático y Meta A de 79, 72, 70 Y 52 % respectivamente. Es importante evaluar los controles biológicos y los insecticidas Knack y Trigard en un periodo de tiempo más amplio para evaluarlos correctamente. Estos resultados permiten establecer preliminarmente que los insecticidas químicos Confidor, Ampligo y Agrimec se pueden usar para el control correctivo de poblaciones de larvas *B. impatiens*, El nematodo *Esteirnerema feltidae* se puede utilizar cuando la infestación es media, al igual se puede utilizar el Knack y el Trigard. Los HE tienen el inconveniente que su efecto se reduce por el uso de fungicidas en el vivero para el control de hongos fitopatógenos. El extracto enzimático tiene potencial, pero se debe seguir desarrollando la investigación. Es importante continuar y concluir el bioensayo en

vivero para validar lo obtenido en laboratorio y posteriormente evaluar estos productos mediante un protocolo bien definido, para poder estar en condiciones de brindar una herramienta adecuada para el manejo de poblaciones de mosco fungoso negro.

## METODOLOGÍA

### Recolecta de material y cría de insectos

Se estableció una cría con los insectos recolectados de los 20 viveros muestreados (Figura 35), en el laboratorio el Insectario de entomología forestal, de la División de Ciencias Forestales, de la Universidad Autónoma Chapingo, en condiciones de fotoperiodo 12:12 h; humedad relativa (HR) de 75%; temperatura  $23 \pm 2$  °C; y alimento rodajas de papa de 2 g (Marín *et al.*, 2015).

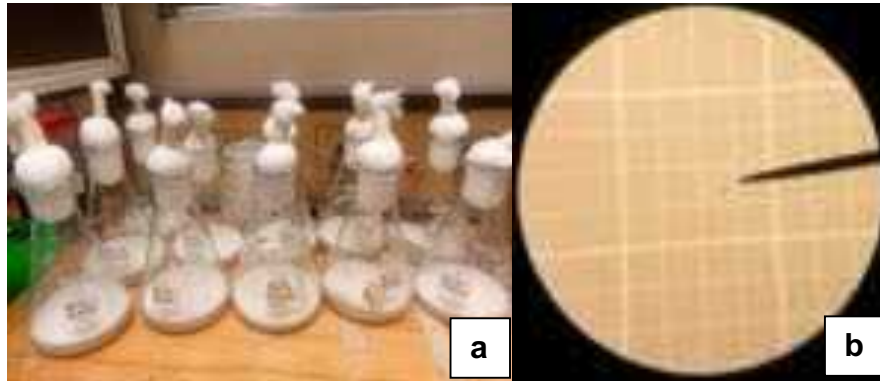


**Figura 35.** Mosca fungosa: **a)** Colecta de los 20 viveros; **b)** Cría de *Bradysia impatiens*.

### Producción de bioinsecticida de *Beauveria bassiana*

#### Activación *Beauveria bassiana*:

La cepa 11 de *B. bassiana* del cepario del laboratorio de Biotecnología de la UAM-X; se creció en agar Dextrosa-Saboraud durante 15 días a 25 °C. Los conidios se cosecharon en Tween 80 al 0.05%. El conteo de conidios se realizó con una cámara de Neubauer y la concentración de conidios se ajustó a  $1 \times 10^7$  conidios por mL (Barranco *et al.*, 2009) (Figura 36).



**Figura 36.** *Beauveria bassiana*: **a)** Activación de la cepa UAM; **b)** Conteo de conidios con cámara de Neubauer.

### Condiciones de fermentación:

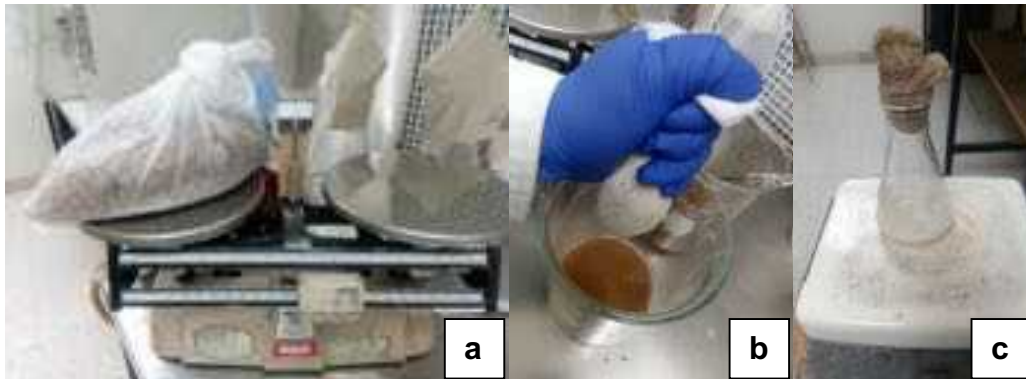
En matraces Erlenmeyer se preparó medio de cultivo sólido que consiste de caparazón de camarón, bagazo de caña, Sales minerales ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4$  y  $\text{MnSO}_4$  y se inoculó con *B. bassiana* a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/mL. Las condiciones de cultivo fueron pH 5.0 y 25 °C (Barranco *et al.*, 2002). Se prepararon cuatro fermentaciones, cada una de 1.5 kg. Dos para obtener conidios de 15 días y dos para cosechar extracto crudo 5 días (Figura 37).



**Figura 37.** Medios de cultivo: **a)** Mezcla de bagazo de caña, cutícula de camarón, sales minerales y agua; **b)** Matraces con fermentación sólida de 15 días con crecimiento de micelio.

### Extracción de conidios, enzimas y metabolitos:

Los conidios se cosecharon a los 15 días y para el extracto crudo, enzimas y los metabolitos a los 5 días. Los conidios se obtuvieron con Tween 80 al 0.05 % 1:10 (v/v) y se realizó el conteo con una cámara de Neubauer, a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/mL. El extracto crudo enzimático se cosechó en agua destilada en una proporción de 1:1 (v/v) (Barranco *et al.*, 2002) (Figura 38).



**Figura 38.** Fermentación de *Beauveria bassiana*: a) Pesado de fermentación; b, c) Cosecha de conidios de fermentación sólida.

### Proceso de semipurificación del extracto crudo enzimático de *B. bassiana*.

El extracto crudo se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos (Sorvall® modelo RC-5B). Se realizó una segunda centrifugación para la separación por tamaño molecular del sobrenadante utilizando tubos Centricom (BioRad®) 10 kDa (BECKMAN®, modelo GPR) a 3000 rpm durante 30 min (Ali 2010). El extracto superior mayor a 10 kDa, corresponde a enzimas y el inferior menor a 10 kDa a metabolitos (Figura 39).



**Figura 39.** a) Fermentación sólida de 5 días para la cosecha de extracto enzimático; b) Extracto enzimático cosechado.

## Ensayos enzimáticos realizados al extracto crudo

### Determinación de proteínas:

Valoración cuantitativa de proteínas. Se utilizó el método de Lowry, que es un método colorimétrico. A la muestra se le añadió un reactivo  $\text{CuSO}_4$  que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad del color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas. Se utilizó como estándar albúmina sérica (Figura 40).

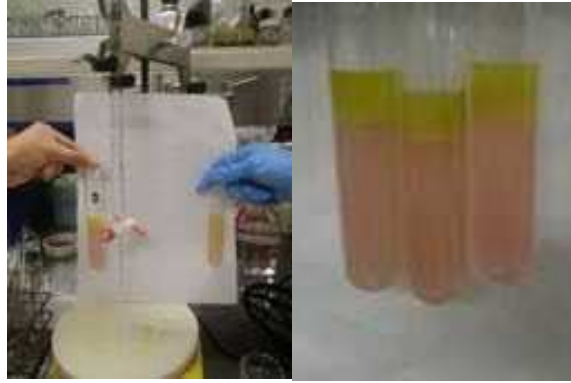


**Figura 40.** Método de Lowry para determinar proteína.

### Determinación de actividad Lipolítica:

La lipólisis es la hidrólisis de enlaces de esteres de tri-, di-, y monoglicéridos libera ácidos grasos libres, usualmente catalizada por enzimas, generalmente por el grupo de enzimas conocidas como lipasas. Para la determinación de lipasas se usó como sustrato 50 mL de aceite de oliva y se le agregó 50 mL de goma arábica, al 10 % p/v (se pesaron 5 g de goma arábica y se suspendió en 50 mL de agua destilada); se tomaron 5 mL de la emulsión y se añadió 2 mL del amortiguador fosfato 50 mM (pH 6.8) finalmente se agregó 1 mL de extracto enzimático. Se incubó por una hora a 37°C en agitación constante, la reacción se detuvo agregando 4 mL de una solución de acetona etanol 1:1 que contenía 0.09% de fenolftaleína que fue usado como indicador (cambio de color a rosa-rojo); la actividad enzimática se determinó por titulación de ácidos grasos liberados, usando 5 mL de NaOH. (Ali *et al.*, 2010). Una unidad de actividad enzimática es igual a la cantidad de enzima necesaria para producir un  $\mu\text{mol}$  de ácido graso  $\text{min}^{-1}$  (Figura 41).





**Figura 41.** Titulación para determinación de actividad lipolítica.

#### **Determinación de actividad proteolítica de Pr1 (Subtilisina):**

Se determinó por la cantidad de p-nitroanilida liberado por el rompimiento de los enlaces peptídicos que existen entre el aminoácido fenilalanina y p-nitroanilina que se encuentran en el sustrato Succinil-alanina2-prolina-fenilalanina-p-nitroanilina (Sigma-Aldrich) sintetizado químicamente para determinar la actividad de esta enzima (Ali *et al.*, 2010). El procedimiento consistió: En un tubo de ensayo se agregó 0.05 mL del sustrato (1mmol), seguida de 0.85 mL del amortiguador Tris-HCl 15 mmol (pH 6.8) y 0.1 mL de extracto enzimático. Se incubó a 28 °C por una hora; para detener la reacción se adicionó 0.25 mL de ácido acético al 30%, dejándose reposar por 15 minutos sobre hielo. La mezcla fue centrifugada a 1250 g por 5 min a 4 °C y el sobrenadante se leyó en el espectrofotómetro CARY 50™ a 410 nm. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que produce 1 nmol de nitroanilida min<sup>-1</sup> (Ali *et al.*, 2010) (Figura 42).

#### **Determinación de actividad proteolítica de Pr2 (Tripsina):**

La actividad proteolítica de Pr2 se determinó por la cantidad de p-nitroanilida liberado por el rompimiento de los enlaces peptídicos que existen entre el aminoácido arginina y p-nitroanilina que se encuentran en el sustrato Benzoil-fenilalanina-valina-arginina-p-nitroanilina (Sigma-Aldrich) sintetizado químicamente para determinar la actividad de esta enzima (Ali *et al.*, 2010). En un tubo de ensayo se agregó 0.05 mL del sustrato (1mmol), enseguida 0.85 mL del amortiguador Tris-HCl 15 mmol (pH 6.8) y 0.1 mL de extracto enzimático. Se incubó a 28°C por una hora, para detener la reacción se adicionó 0.25 mL de ácido acético al 30%, se dejó reposar por 15 minutos sobre hielo. La mezcla se centrifugó a 1250 g por 5 min a 4°C y el sobrenadante se leyó en el espectrofotómetro CARY 50™ a 410 nm. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que produce 1 nmol de nitroanilina min<sup>-1</sup> (Ali *et al.*, 2010) (Figura 42).



**Figura 42.** Determinación de actividad proteolítica de Pr1 (Subtilisina) y Pr2 (Tripsina).

#### **Determinación de actividad endoquitinolítica:**

Las endoquitinasas rompen al azar en puntos internos de la cadena de la quitina, produce oligómeros de N-acetilglucosamina de bajo peso molecular tales como quitotetraosa y quitotriosa. El procedimiento consistió: en un tubo de ensayo se agregó como sustrato 0.5 mL de quitina coloidal al 0.5 %, 0.5 mL de extracto enzimático y 1.0 mL de buffer de fosfato citrato 0.2 M (pH 5.6). La mezcla se incubó a 50°C durante una hora, la reacción se terminó adicionando 3 mL de ácido dinitrosalicílico (DNS) y enseguida se calentó la mezcla por 10 minutos. La solución se centrifugó a 10 000 rpm y se leyó a 575 nm. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de azúcar que cataliza la producción de 1  $\mu$ mol de azúcares reductores  $\text{min}^{-1}$  y se expresa en peso seco del sustrato (Almeida *et al.*, 2001).

#### **Determinación de actividad exoquitinolítica:**

Las exoquitinasas liberan diacetil-quitobiosa con la producción de N-acetil glucosamina u oligómeros. La presencia de actividad de exoquitinasas fue determinada en los extractos usando p-nitrofenol-N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina (Sigma-Aldrich) como sustrato. En un tubo de ensayo se agregó 200  $\mu$ l del extracto enzimático, 200  $\mu$ l de amortiguador de citratos fosfatos 0.2 M pH 5.6, posteriormente se agregó 200  $\mu$ l de una solución de 1.0 mg/ml de p-nitrofenolN-acetil- $\beta$ -D-glucosamina (pNAG), se incubó a 37 °C durante una hora con agitación (180 rpm). La reacción se terminó agregando 1 mL de NaOH 0.02M. La muestra se midió en un espectrofotómetro a 400 nm, para realizar la estimación del p-nitrofenol liberado (Coudron *et al.*, 1984).



Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de p-nitrofenol por mL de enzima por minuto bajo las condiciones específicas (Tronsmo y Harman, 1993).

### Bioensayo 1: Evaluación de controles biológicos e insecticidas químicos.

La actividad insecticida de los conidios y extracto enzimático obtenidos de la fermentación sólida de *B. bassiana*, se evaluaron en larvas de *B. impatiens* de tercer y cuarto estadio. Además, se probaron los productos comerciales de hongos entomopatógenos: **Meta A Spectrum** (*Metarrhizium anisopliae*), **Bea B Spectrum** (*B. bassiana*); el nematodo ***Steinernema feltidae*** y los insecticidas químicos comerciales: **Knack, Ampligo, Agrimec, Confidor, Trigard**.

Se usó cajas de plástico transparentes con tapa de 5 cm de diámetro. Para evitar la deshidratación de las larvas se les colocó un trozo de papel absorbente de 3X2 cm. En cada caja se colocaron 10 larvas; las cuales se alimentaron con 0.5 gr de papa fresca. Los tratamientos se aplicaron directamente sobre el papel absorbente y sobre el alimento (Cuadro 12). Se realizó una sola aplicación a una dosis de 500  $\mu\text{L}$  de cada tratamiento, al testigo se le aplicó agua destilada. Se incubaron a una temperatura de  $23 \pm 3$  °C y HR de 60-70 %; para conservar la humedad de las cajas de plástico se agregó 20  $\mu\text{L}$  de agua destilada, cada 72 h (Figura 43a, c).

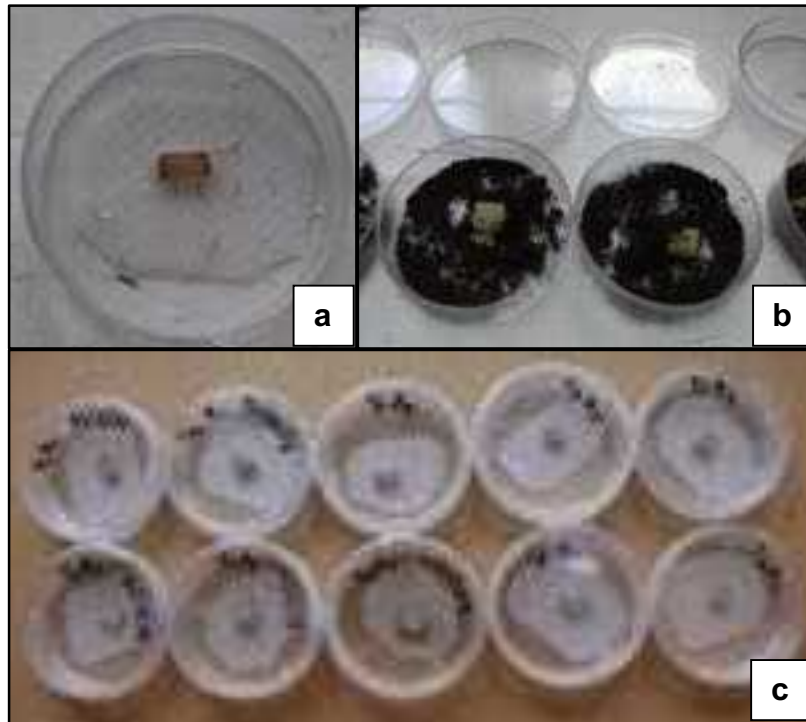
El tratamiento del nematodo se estableció con 1 g de sustrato de peat moss (40 %), agrolita (20 %) y vermiculita (20 %), esto se hizo con la finalidad de que el nematodo se pudiera desplazar de mejor manera en el sustrato y de esta forma poder buscar a las larvas de *B. impatiens* (Figura 43b).

**Cuadro 12.** Control biológico e insecticidas químicos, ingrediente activo aplicados a larvas de *Bradysia impatiens* en el bioensayo de laboratorio y en invernadero.

Tratamiento	Dosis	Ingrediente activo
Meta A	1 X10 <sup>7</sup> conidios por ml	Conidios <i>M. anisopliae</i>
Bea B	1 X10 <sup>7</sup> conidios por mL	Conidios <i>B. bassiana</i>
Conidios cepa UAM	1 x 10 <sup>7</sup> conidios por mL	Conidios <i>B. bassiana</i>
Extracto crudo UAM	0.5 mL	Proteasas, lipasas, quitinasas y metabolitos
<i>Steinernema feltidae</i>	50 nematodos por 1 cm <sup>2</sup>	Nematodo

Knack	0.2 mL/L	Pyrioxifen
Ampligo	1 mL/L	Clorantraniliprole y lambdacialotrina
Agrimec	1 mL/L	Abamectina Imidacloprid
Confidor	1 mL/L	
Trigard	0.015g/L	Ciromazina
Testigo	0.3 mL	Agua

---



**Figura 43.** Bioensayo 1 en laboratorio: **a)** Larvas en caja Petri con papel absorbente y papa como alimento; **b)** Larvas con sustrato y papa; **c)** Aplicación de productos en papa y papel absorbente.

### Diseño experimental

Se empleó un diseño completamente al azar, con cinco repeticiones por tratamiento, cada repetición consistió en 10 larvas; por tratamiento se utilizaron 50 larvas y un total de 550 larvas de *B. impatiens*. La variable que se evaluó fue mortalidad de larvas.

### Variable a evaluar:

- a) Actividad insecticida (mortalidad).

Se cada 24 horas se anotó el número de larvas muertas, durante ocho días; con estos datos se calculó el porcentaje de mortalidad corregido mediante la ecuación de Abbott (Abbott, 1925) para eliminar la mortalidad natural obtenida en el testigo.

$$MC = \frac{Mtr - Mte}{100 - Mte} * 100$$

Donde:

MC = Porcentaje de Mortalidad Corregida.

Mtr = Porcentaje de Mortalidad en el Tratamiento.

Mte = Porcentaje de Mortalidad en el Testigo Absoluto.

### **Bioensayo 2: Control de *B. impatiens* en *Pinus devoniana* en invernadero.**

El 15 de agosto se estableció la siembra de *P. devoniana*, para obtener plántulas de 100 días de edad, con esta planta se realizó el bioensayo de **control de *B. impatiens* en *Pinus devoniana* en invernadero**. El objetivo de este bioensayo fue determinar el grado de protección en *Pinus devoniana* de los controles biológicos a base de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, y el nematodo *Steinernema feltidae*. Además, se evaluaron los insecticidas químicos comerciales Knack, Ampligo, Agrimec, Confidor, Trigard, sobre larvas de *B. impatiens* en invernadero. La evaluación se realizó en el invernadero de Parasitología Forestal, de la División de Ciencias Forestales, de la Universidad Autónoma Chapingo.

Se utilizaron plántulas de *P. devoniana* de 120 días de edad, establecidas en tubetes individuales de plástico de 210 mL. La composición del sustrato fue turba (60 %), agrolita (20 %) y vermiculita (20 %), y 1.23 g de fertilizante (multicote Exact Hi.End®) por tubete (Figura 44). Se colocaron 10 larvas de tercer estadio, en cada plántula de pino de 2.5 meses de edad. Se usó la dosis por producto (recomendada por el fabricante) y un testigo al que solo se le aplicó agua de riego (Cuadro 13).

Las dosis se diluyeron en agua de riego, y se hizo solo una aplicación de 40 mL por tubete, de cada tratamiento. Después de la aplicación de los tratamientos, a los 5 días se extrajeron las plantas con todo y cepellón y se colocaron en envases de plástico transparente de 1/2 L con tapa. Cada 24 horas se revisaron para detectar, recolectar y registrar el número de emergidos, después de 30 días se dio por terminado el experimento.



**Figura 44.** Establecimiento de bioensayo en invernadero.

### **Diseño experimental**

Se empleó un diseño completamente al azar, con cinco repeticiones por tratamiento, cada repetición consistió en 2 tubetes; por tratamiento se utilizaron 10 tubetes y 100 larvas. En total se utilizaron 1100 larvas de *B. impatiens*.

### **Variable a evaluar:**

- a) Adultos emergidos después de la aplicación de los controles biológicos y químicos.

### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos en porcentaje de los dos bioensayos se modificaron al usar la transformación angular o arcoseno; estos datos tienden a una distribución binomial, para normalizar los datos. Se utilizó la siguiente fórmula, de acuerdo con la prueba de Shapiro-Wilk's:

$$\text{arcoseno} \sqrt{\text{porcentaje}/100},$$

Los datos de mortalidad corregida y transformados se sometieron a un análisis de varianza ((ANDEVA) y se realizará una prueba de medias por el método de Tukey ( $P \leq 0.01$ ). Para el análisis estadístico se usará el software SAS, 2009.

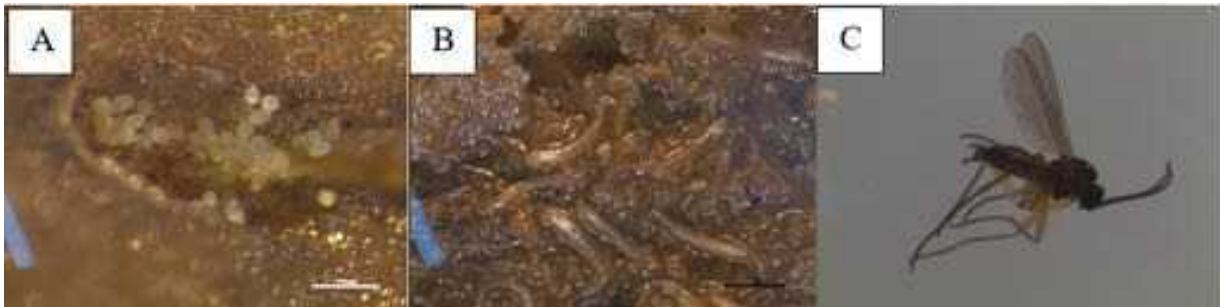
**Cuadro 13.** Tratamientos, ingrediente activo, formulación y dosis de bioensayo en invernadero.

Tratamiento	Insecticida	Formulación	Dosis
T1	Meta A	1 X 10 <sup>11</sup> UFC/L	1 x 10 <sup>7</sup> mL <sup>-1</sup>
T2	Bea B	1 X 10 <sup>11</sup> UFC/L	1 x 10 <sup>7</sup> mL <sup>-1</sup>
T3	cepa UAM*	1 X 10 <sup>7</sup> UFC/L	1 x 10 <sup>7</sup> mL <sup>-1</sup>
T4	Extracto crudo*	Proteínas µg/mL	990 µg/mL
T5	Knack	11.23 % L <sup>-1</sup>	1 mL L <sup>-1</sup>
T6	Ampligo	10 gr clorantraniliprole y 5 gr lambdacialotrina	0.5 mL L <sup>-1</sup>
T7	Agrimec	18 gr abamectina	0.5 mL L <sup>-1</sup>
T8	Confidor	350 L <sup>-1</sup>	0.5 mL L <sup>-1</sup>
T9	Trigard	37.5 gr ciromazina	0.5 mL L <sup>-1</sup>
T10	Nematodo ( <i>Steinernema feltidae</i> )	250 millones de nematodos	50 nematodos por cm <sup>2</sup>
T11	Testigo	Agua	0.5 mL L <sup>-1</sup>

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Cría de insectos

La cría de *B. impatiens* se estableció exitosamente, se obtuvieron 50 cámaras de crías de insectos, de las cuales garantizaron la cosecha en suficiente cantidad tanto de larvas como de adultos, para las diferentes determinaciones y bioensayos, se han cosechado más de 5000 larvas y aproximadamente 500 adultos. Las cámaras de cría se almacenan para mantener la población viable de *B. impatiens* y obtener más ejemplares si se requieren (Figura 45).



**Figura 45.** Cría de *Bradysia impatiens*: **A)** Masa de huevecillos; **B)** Larvas de tercer estadio; **C)** Adulto (Macho).

### Producción de bioinsecticida de *Beauveria bassiana*

Las cepas desarrolladas en agar-PDA se utilizaron como inóculo para la fermentación sólida con caparazón de camarón. Se obtuvieron dos productos de bioinsecticida a base de conidios y extracto enzimático (metabolitos). Las cantidades producidas se muestran en el Cuadro 14.

**Cuadro 14.** Stock de productos obtenidos de fermentación sólida, conidios y extractos de *Beauveria bassiana*.

Producto	Volumen	Concentraciones
Conidios activación de cepa en agar-PDA.	100 mL	$1 \times 10^7$ UFC/L.
Conidios inóculo para fermentación sólida.	1000 mL	$1 \times 10^7$ UFC/L.
Conidios fermentación sólida (bioinsecticida).	1400 mL	$1 \times 10^7$ UFC/L.
Extracto enzimático	2000 mL	

Los productos de *B. bassiana* obtenidos fueron suficientes para establecer los bioensayos, los sobrantes de estos bioinsecticidas se almacenaron en refrigeración a  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para conservar su viabilidad (Figura 46).



**Figura 46.** Producción de conidios de *B. bassiana*.

### Ensayos enzimáticos realizados al extracto crudo

El hongo entomopatógeno *B. bassiana* produce enzimas que degradan los componentes lipídicos, protéicos y quitinolíticos que conforman la estructura del exoesqueleto (Cutícula) de los insectos. En el extracto enzimático obtenido por medio de la fermentación sólida de cinco días y utilizando caparazón de camarón (para simular la cutícula de los insectos), se detectó la actividad de las principales enzimas que intervienen en el proceso bioquímico de degradación de la cutícula de insectos; lipasas, las proteasas tipo Pr1 y Pr2, endoquitinasas y exoquitinasas. Los resultados se muestran en el Cuadro 15.

**Cuadro 15.** Determinación de actividad enzimática en el extracto enzimático de *B. bassiana* obtenido a los cinco días de fermentación sólida.

Tipo de enzima	Actividad enzimática*
Proteínas	105.2636 µg/mL*
Lipasas	53.2407 U*
Pr1 Subtilisina	0.11401 ± 0.000228 U*
Pr2 Tripsina	0.00323 ± 0.000228 U*
Exoquitinasas	2.2604 ± 0.4162 U*
Endoquitinasas	0.04872 ± 0.01055 U*

\*La determinación se realizó por triplicado



**Bioensayo 1: Evaluación de controles biológicos e insecticidas químicos**

El ANDEVA señala que al menos un tratamiento es diferente; sin embargo, no precisa cuál o cuáles son los que actúan de forma distinta, por lo que se aplicó una prueba de comparaciones múltiples (Tukey). De acuerdo con la prueba de Tukey, los mejores tratamientos fueron el Confidor, Ampligo y Agrimec que ocasionaron una mortalidad corregida de 100% en las larvas, en los cuales las medias son significativamente diferentes al nivel de 1%. Los insecticidas químicos Knack y Trigard ocasionaron una mortalidad corregida acumulada de 95 y 75% respectivamente. Los controles biológicos también fueron significativamente diferentes al testigo (Cuadro 16). El control biológico que mejor desempeño tuvo fue el nematodo, con una mortalidad corregida a los ocho días de 88.63 %, seguido de los conidios UAM, Bea A y Extracto enzimático UAM. El tratamiento que obtuvo el peor desempeño fue Meta A (Cuadro 17).

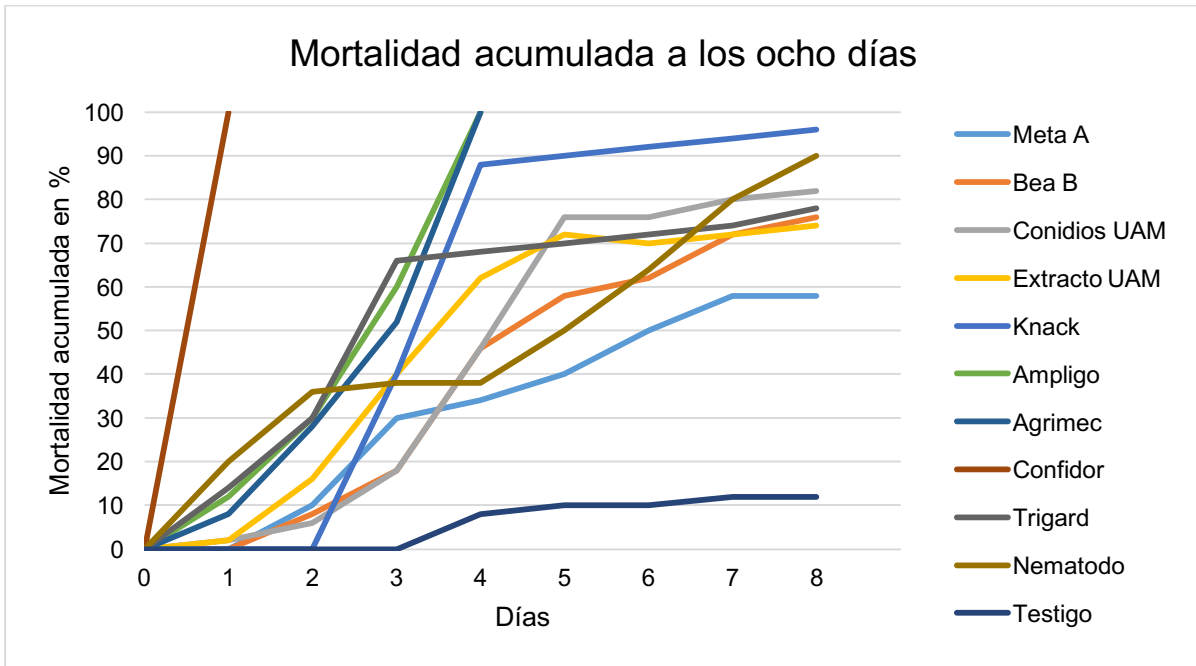
**Cuadro 16.** Prueba de media de Tukey, para mortalidad de larvas de *Bradysia impatiens*, en laboratorio.

<b>Tratamiento</b>	<b>Medias transformadas</b>	<b>Agrupamiento Tukey</b>
Confidor	90	A
Agrimet	90	A
Ampligo	90	A
Knack	78.46	BA
Nematodo	75.66	BA
Conidios UAM	70.65	BA
Extracto enzimático UAM	65.35	BA
Trigard	64.88	BA
Bea B	64.3	BA
Meta A	50.48	B
Testigo	20.07	C

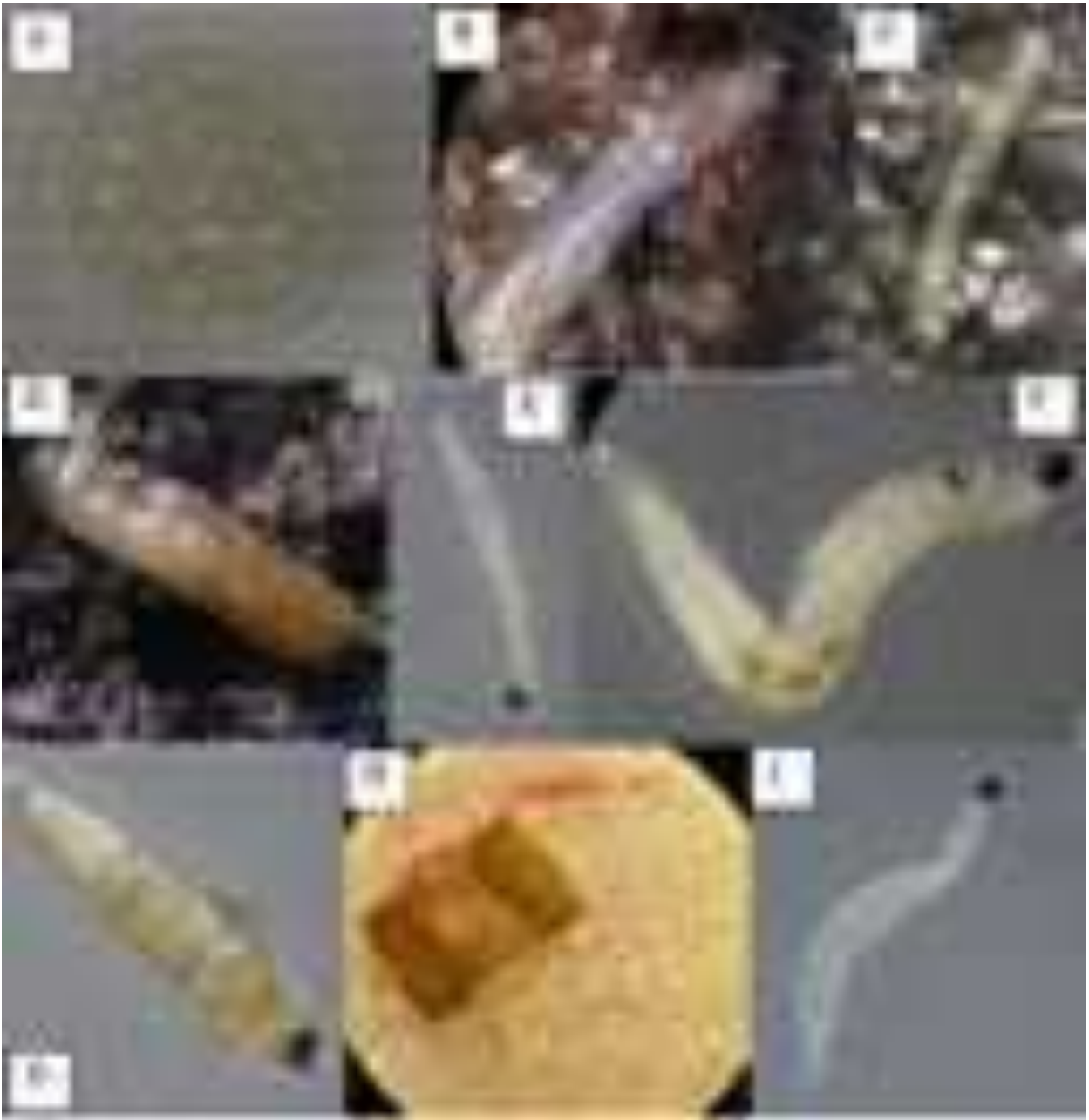
**Cuadro 17.** Porcentaje de mortalidad acumulada y corregida de larvas de *B. impatiens* por tratamiento.

<b>Tratamiento</b>	<b>% Mortalidad acumulada</b>	<b>%Mortalidad corregida</b>
Meta A	58	52.27
Bea B	76	72.72
Conidios UAM	82	79.54
Extracto enzimático UAM	74	70.45
Nematodo	90	88.63
Knack	96	95.45
Ampligo	100	100
Agrimec	100	100
Confidor	100	100
Trigard	78	75
Testigo	12	

El efecto de los insecticidas químicos se observa desde el primer día de su aplicación. El insecticida Confidor fue el más efectivo ya que causa la mortalidad de larvas al 100% a las 24 h, Ampligo y Agrimec requieren de 96 h, Knack y Trigard requirieron de ocho días para alcanzar mortalidad máxima. El efecto de los controles biológicos se observó a partir de las 72 h y se incrementa conforme transcurre el tiempo después de su aplicación (Figura 47 y 48).



**Figura 47.** Porcentaje de mortalidad acumulada a los ocho días después del tratamiento.

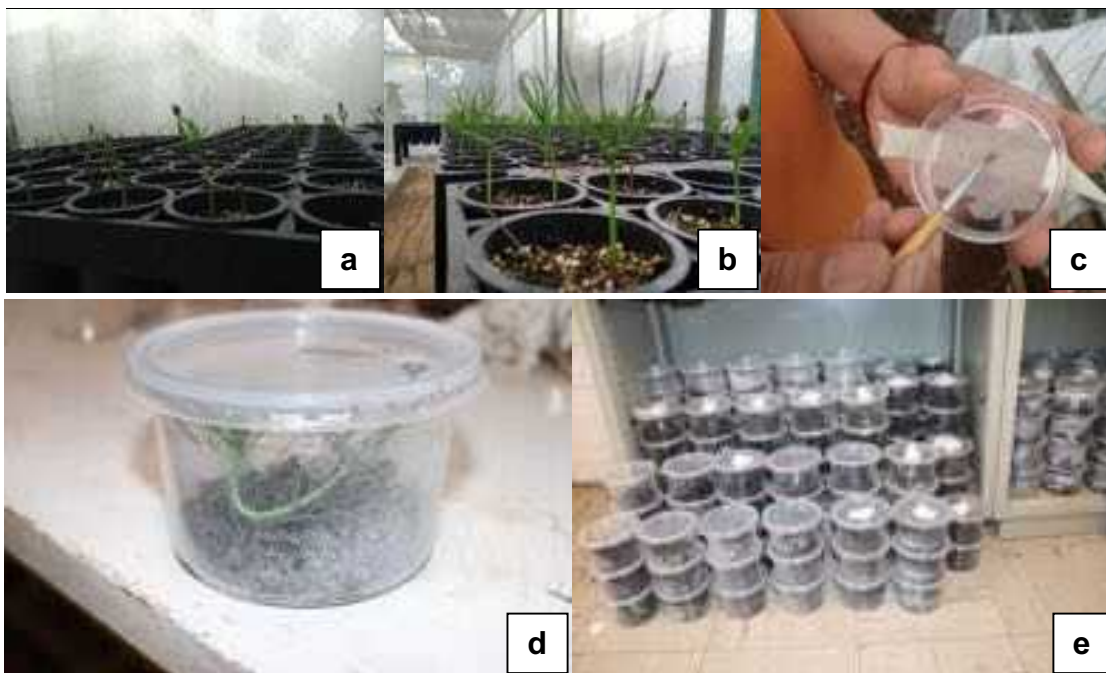


**Figura 48.** Efecto de tratamientos en larvas de *Bradysia impatiens*: **A)** Hongo entomopatígeno *Beauveria bassiana*; **B, C y D)** Nematodo *E. feltidae*; **E)** Ampligo; **F)** Agrimec; **G)** Knack; **H)** Confidor; **I)** Trigard.

## Bioensayo 2: Control de *B. impatiens* en *Pinus devoniana* en invernadero

Los resultados obtenidos fue el establecimiento exitoso de 500 plántulas de *P. devoniana*, se inoculó el sustrato con larvas de tercer estadio de *B. impatiens* y al tercer día se aplicaron los tratamientos, al quinto día después de la aplicación del tratamiento las plántulas con todo y cepellón se colocaron en envases transparentes de plástico con tapa, para evaluar la emergencia de adultos (Figura 49).

Este bioensayo se encuentra en proceso, debido a que la fenología de *P. devoniana* no permite su buen establecimiento y germinación de esta especie de pino. Los resultados finales de este bioensayo estarán terminados en 50 días aproximadamente.



**Figura 49.** Plántulas de *P. devoniana* y aplicación de larvas de *B. impateins*: **a, b)** Germinación y desarrollo de *P. devoniana*; **c)** Inoculación de tubetes con larvas de *Bradysia impatiens*; **d, e)** Envases de plástico de ½ L con plántula tratadas.

El control más efectivo de larvas de *B. impateins* en laboratorio fue Confidor, ya que tiene un control del 100% después de 24 horas de su aplicación, esto concuerda con lo reportado para este producto en el vivero de Temamatla, Edo. De México, donde evaluaron el Confidor en plantas de *P. montezumae* (Marín *et al.*, 2015b), Este producto es el único de los valorados que en su etiqueta señala que se puede aplicar en forma de drench, para el control de plagas de suelo, tal como es el caso de la mosca fungosa.

Los agroquímicos Agrimec y Ampligo son insecticidas que en su etiqueta indican que se deben aplicar al follaje de la planta. Sin embargo, obtuvieron buenos resultados en laboratorio, por tal motivo se deben evaluar cuidadosamente en bioensayos donde se aplica directamente al sustrato.

El Knack es un insecticida que actúa sobre las plagas como regulador de su crecimiento, actúa de forma similar a la hormona juvenil natural de crecimiento, afectando el desarrollo del insecto (larvas, pupas, adultos), esta forma de actuar ocasiona que no mate de forma inmediata al insecto, pero provoca alteraciones en la muda entre estadios y estados, esto se hizo evidente en la malformación de pupas (Figura 48G). Esta manera de actuar ocasiona que requiera de más tiempo para causar la muerte del insecto, esto se ve reflejado en el bioensayo establecido en este informe, ya que su efecto de mortalidad inició a las 72 h después de la aplicación y continúa causando la muerte de las larvas hasta el día ocho que se dio por terminado el experimento. Este insecticida actúa de forma similar a los HE. También es un insecticida que indica en su etiqueta que se aplique en follaje.

La mortalidad acumulada corregida obtenida por el insecticida Trigard (75%), se debe a que es un insecticida con actividad sistémica, que actúa como regulador de crecimiento de los insectos, su forma de acción es muy similar al del Knack y los HE. Esto se ve reflejado cuando la mortalidad acumulada se incrementó al pasar los días y probablemente si se evalúa más días ocasione la muerte de las larvas al 100 %. Es importante señalar que este insecticida también se aplica al follaje. Además, es el único insecticida que en su etiqueta menciona que controla plagas de dípteros, y especialmente larvas de moscas sciáridas, por lo que se recomienda evaluar más cuidadosamente.

El nematodo *Steinernema feltidae* obtuvo una mortalidad corregida de 88.63 % en laboratorio a los ocho días, sus efectos se comenzaron a observar a las 24 h y se incrementa conforme avanzan los días, esto se debe a que los nematodos primero se tienen que aclimatar, una vez pasado este proceso el nematodo busca activamente las larvas de *B. impatiens* para invadirlas y causarles la muerte (Figura 48 B, C, D). El nematodo tiene una serie de ventajas sobre los insecticidas químicos que se deben aprovechar para el manejo integrado de la mosca fungosa, estos son: no causa resistencia, busca de forma activa a las larvas de *B. impatiens* y según el fabricante permanece vivo durante siete meses en el sustrato sin que se existan larvas, además, cuando infecta una larva el nematodo se alimenta de ella y se reproduce, este proceso incrementa la población del nematodo. Todas estas ventajas se deben evaluar en el invernadero y vivero.

Los insecticidas químicos son los que mejor desempeño tuvieron en el corto plazo, para el control de larvas de *B. impatiens*, sin embargo, los controles biológicos obtuvieron también un buen desempeño, ocasionando la mortalidad de larvas de 50-88.65 %. Pero para que alcancen niveles de control superiores del 70% requieren de cinco días como mínimo. Los controles biológicos tienen una forma de actuar diferente que los insecticidas químicos. Los HE requieren entrar en contacto con la cutícula o ser ingeridos por las larvas (Lozano-Tovar *et al.*, 2013). En el caso de los HE tienen un efecto insecticida e insectistático, sumando ambos efectos se pueden tener mortalidades elevadas. El efecto insectistático no se expresa de forma inmediata en la mortalidad del insecto. Sin embargo, detiene o alarga el desarrollo de las larvas, tiene un efecto antialimentario, altera el proceso de formación de mudas y pupas, y causa malformaciones en los adultos. Todos estos efectos ocasionan que el insecto muera y se alcancen niveles de control mayores del 80 % (Marín *et al.*, 2017), por lo que de seguir la evaluación de los tratamientos aplicados en el bioensayo de laboratorio a los 15 días no se obtuvieron emergencia de adultos. Sin embargo, el uso de HE se puede ver afectado en el vivero, debido a que se aplican fungicidas para el control de hongos fitopatógenos (*Fusarium circinatum*). Para solucionar este problema se probó como alternativa en este bioensayo el extracto enzimático de *B. bassiana* UAM, este extracto no es afectado por la aplicación de fungicida, debido a que son moléculas (enzimas y metabolitos) producidas por el hongo, y estas son las responsables de que el hongo pueda penetrar la cutícula del insecto y los metabolitos son los que causan el efecto insectistático. Sin embargo, este bioinsecticida no está disponible en el mercado, solo se encuentra en fase de investigación.

## CONCLUSIONES

Los insecticidas químicos controlan al 100% las larvas de mosca fungosa negra, esto lo hacen en un periodo de tiempo corto (1-5 días). Los bioinsecticidas y los insecticidas químicos que actúan interviniendo en el proceso de muda y desarrollo de los insectos, requieren de mayor tiempo para ocasionar la muerte de las larvas de *B. impatiens*. Sin embargo, son eficientes en periodos más amplios de evaluación.

El nematodo *Steinernema feltidae* es una alternativa viable para el control de mosca fungosa. Al igual que los HE, de este último grupo, el que mayor potencial tiene es el extracto crudo.

El bioensayo en laboratorio permitió evaluar métodos de control diferentes y el uso de insecticidas químicos de distintos grupos químicos y biológicos, la información

obtenida fue relevante para proponer un protocolo de actuación para el manejo de mosca fungosa en los viveros, cabe aclarar que este protocolo es preliminar, pues falta por concluir el bioensayo en invernadero con planta de *P. devoniana*, una vez que se concluya el bioensayo, se tendrán más datos para precisar el manejo de la mosca en los viveros, y evaluar dicho protocolo en condiciones reales en los viveros forestales.

## RECOMENDACIONES

El manejo que se propone con los datos obtenidos con el bioensayo de laboratorio es el siguiente:

1. Cuando inicie la presencia de larvas de *B. impatiens*, aplicar la dosis baja del nematodo *S. feltidae*, que recomienda el fabricante del producto, es importante que se verifique que los nematodos estén vivos en por lo menos el 80 %, después de su aplicación supervisar y monitorear que las poblaciones de larvas disminuyan.
2. Si la población de mosca fungosa no disminuye o se incrementa, aplicar el producto Knack y/o Trigard, es importante que el usuario considere que la forma de actuar de este producto es por medio de la alteración del desarrollo del insecto y que su efecto como mortalidad se refleja a los 5-6 días después de su aplicación.
3. En dado caso que no disminuya la población de larvas se debe aplicar un insecticida químico, puede ser Ampligo. Es importante leer la etiqueta y realizar las aplicaciones como se especifica, no más de dos aplicaciones por ciclo. Repetir la aplicación en 10 días.
4. De seguir la infestación aplicar el insecticida Agrimec, siguiendo las mismas especificaciones que el anterior. No más de dos aplicaciones por ciclo.
5. En infestaciones severas aplicar Confidor, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para disminuir las poblaciones de mosca fungosa es importante primero seguir todas las recomendaciones de control cultural y del manejo del agua.



El viverista debe constatar que el producto aplicado para el control de mosca fungosa, se aplique en el sustrato, primero realizar un riego pesado y posteriormente aplicar los productos, de lo contrario si se aplican los productos de control y antes del riego o al inicio del riego de las plantas esto puede ocasionar que el producto sea lavado del tubete, reduciendo la oportunidad de entrar en contacto con las larvas, y así reducir su efectividad.

Se recomienda ampliar el periodo de evaluación de los insecticidas Trigard y Knack, así como el de los EH y el extracto enzimático, con el fin de no sub-evaluarlos, ya que requieren de mayor tiempo para que causen la muerte al insecto.

En cuanto a extracto enzimático UAM se recomienda se continúe evaluando en condiciones de vivero ya que tiene un alto potencial, y puede ser una alternativa de bioinsecticida más para el manejo de la mosca fungosa negra.

### LITERATURA CITADA

Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18, 265–267.

Ali, S., Ren, S. X., Huang, Z., & Wu, J. H. (2010). Purification of enzymes related to host penetration and pathogenesis from entomopathogenic fungi. *Current Research*.

Almeida, F. B. 2001. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters* 29: 1189-1193

Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 2(1), 15–22. Retrieved from <http://www.formatex.info/microbiology2/isbn1contents.pdf>

Barranco-Flrido, J. E., P. Bustamante-Camilo, L. Mayorga-Reyes, R. GonzálezCervantes, P. Martínez-Cruz, and A. Azaola-Espinosa. 2009.  $\beta$ -N acetylglucosaminadase production by *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* ATCC 26854 by solid state fermentation utilizing shrimp shell. *Interciencia*. 34: 356-360.

Barranco-Flrido, J. E., R. Alatorre-Rosas, M. Gutiérrez-Rojas, G. ViniegraGonzález, and G. Saucedo-Castañeda. 2002. Criteria for the

selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme Microb. Tech.* 30: 910-915.

Cibrián, T. D., García, D. S., & Don Juan, M. B. (2008). Manual de identificación y manejo de plagas y enfermedades en germoplasma y planta producida en viveros. México: Comisión Nacional Forestal.

Cloyd, R. A. 2015. Ecology of fungus gnats (*Bradysia* spp.) in greenhouse production systems associated with disease-interactions and alternative management strategies. *Insects* 6: 325-332.

Coudron, T. A., M. J. Kroha and C. M. Ignoffo. 1984. Levels of chitinolytic activity during development of three entomopathogenic fungi, comprehensive. *Biochemistry and Physiology* 79 B: 339-348.

Hurley, B.P., B. Slippers, B.D. Wingfield, P. Govender, J.E. Smith y M.J. Wingfield. 2010. Genetic diversity of *Bradysia difformis* (Sciaridae: Diptera) populations reflects movement of an invasive insect between forestry nurseries. *Biological Invasions* 12(4):729-733.

Hurley, B.P., B. Slippers, T.A. Coutinho, B.D. Wingfield, P. Govender y M.J. Wingfield. 2007. Molecular detection of fungi carried by *Bradysia difformis* (Sciaridae: Diptera) in South African forestry nurseries. *Southern Hemisphere Forestry Journal* 69(2):103-109.

Lozano-Tovar, M. D., Ortiz-Urquiza, A., Garrido-Jurado, I., Trapero-Casa, A., & Quesada-Moraga, E. (2013). Assessment of entomopathogenic fungi and their extracts against a soil-dwelling pest and soil-borne pathogens of olive. *Biological Control*, 67, 409–420. doi: 10.1016/j.biocontrol.2013.09.006

Mansilla, J. P., M. I. Pastoriza y R. Pérez. 2001. Estudio sobre la biología y control de *Bradysia paupera* Tuomikoski (= *Bradysia difformis* Frey) (Diptera: Sciaridae). *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 27:411-417.

Marín-Cruz, V. H., S. Rodríguez-Navarro, J. E. Barranco-Florido, and D. CibriánTovar. 2017b. Insectistatic and insecticide activity of *Beauveria bassiana* in *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae). *Rev. Chapingo Ser. Cie.* 23: 329340.

Marín-Cruz, V. H., D. Cibrián-Tovar, J. T. Méndez-Montiel, O. A. Pérez-Vera, J. A. Cadena-Meneses, H. Huerta, G. Rodríguez-Yam, and J. A. Cruz-Rodríguez. 2015b. Biology of *Lycoriella ingenua* and *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae). *Madera Bosques*. 21: 113-128. MarínMarín-Cruz, V. H., D.

- Cibrián-Tovar, J. T. Méndez-Montiel, O. A. Pérez-Vera, J. A. Cadena-Meneses, H. Huerta, G. Rodríguez-Yam, and J. A. Cruz-Rodríguez. 2015b. Biology of *Lycoriella ingenua* and *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae). *Madera Bosques*. 21: 113-128.
- Menzel, F., J. E. Smith y B. N. Colauto. 2003. *Bradysia difformis* Frey and *Bradysia ocellaris* (Comstock): two additional neotropical species of black fungus gnats (Diptera: Sciaridae) of economic importance: a redescription and review. *Annals of the Entomological Society of America* 96(4):448-457.
- Mohrig, W., K. Helelr, H. Hippha, P. Vilkamaa y F. Menzel. 2012. Revision of black fungus gnats (Diptera: Sciaridae) of North America. *Studia Dipterologica* 19(1/2):141286.
- Shamshad, A., Clift, A. D., & Mansfield, S. (2009). The effect of tibia morphology on vector competency of mushroom sciarid flies. *Journal of Applied Entomology*, 133(6), 484–490. doi: 10.1111/j.1439-0418.2008.01362.x
- Shin, S.G., H.S. Lee y S. Lee. 2012. Dark winged fungus gnats (Diptera: Sciaridae) collected from shiitake mushroom in Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 15(1):174181.
- Tronsmo, A and G. E. Harman. 1993. Detection and quantification of N-acetyl- $\beta$ -Dglucosaminidase, chitobiosidase and endochitinase in solutions and on gels. *Analytical Biochemistry* 208: 74-79.

## **Actividad 1.10. CONTROL BIOLÓGICO Y QUÍMICO DE *Fusarium circinatum* A NIVEL DE INVERNADERO.**

Silvia Edith García Díaz. UACH, [edith65@gmail.com](mailto:edith65@gmail.com)

Omar Alejandro Pérez Vera. UACH, [olejandrovers@gmail.com](mailto:olejandrovers@gmail.com)

Brizeida Barrios Merino. UACH, [brizeidabarriospmg@gmail.com](mailto:brizeidabarriospmg@gmail.com)

Adrián López López. UACH, [adrianlopezmeta@gmail.com](mailto:adrianlopezmeta@gmail.com)

El empleo de alternativas de control contra *Fusarium* en viveros forestales, es un tema de gran importancia, ya que existen pérdidas mayores al 35 % del total de planta en producción. En concordancia con los datos numéricos, se evaluó la efectividad de cinco fungicidas químicos y cuatro cepas de *Trichoderma*.

### **METODOLOGÍA**

#### **Desinfección, tratamiento e inoculación de la semilla de *Pinus cembroides* con *Fusarium* spp.**

La semilla utilizada para este estudio fue de *Pinus cembroides*, se remojó durante tres días como tratamiento pregerminativo, se desinfectó superficialmente por inmersión en hipoclorito al 10% durante 10 min, después se enjuagaron 4 veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de cloro. Posteriormente se inocularon con una suspensión de  $1 \times 10^6$  esporas de *Fusarium*/ mL durante 60 min, se secaron en un ambiente aséptico y se almacenaron a temperatura ambiente durante una noche, para su posterior siembra.

#### **Impregnación de la semilla de pino con fungicidas y *Trichoderma* spp.**

Lotes de 250 semillas de pino (1250 semillas totales) se impregnaron con cinco fungicidas: T1: Boscalid-Pyraclostrobin (0.16 g), T2: Captan (0.3 g), T3: Procloraz (0.16 ml), T4: Propamocarb (0.3 ml), T5: Tiabendazol (0.4 g) en 200 mL de agua destilada estéril durante 20 minutos y se secaron a temperatura ambiente para su inmediata siembra.

Para la inoculación con *Trichoderma* spp., se utilizó 1 L de una suspensión de esporas de  $1 \times 10^6$  de *T. harzianum*, *T. erinaceum* y *T. asperellum* (Don Juan Macías, 2006). A cada tubete se le agregaron 5 mL de la suspensión, según el tratamiento correspondiente (Figura 61a). La aplicación se realizó un día antes de la siembra y

posteriormente una vez a la semana, en la misma cantidad, con un total de 5 aplicaciones.

### **Sustrato y siembra de semilla de pino**

Se preparó una mezcla de agrolita, peat moss y vermiculita para el experimento en una proporción de 20-60-20, el cual se esterilizó en una autoclave a 120 °C y 15 libras de presión, durante 20 minutos; el proceso se repitió tres veces. Antes del llenado de los contenedores de 25 cavidades se desinfectaron con cloro al 1% durante 20 minutos. Los contenedores con tubetes de 170 y 220 ml se llenaron con la mezcla del sustrato, se aplicó osmocote y se sembraron en cada tubete dos semillas, colocando una capa superficial de vermiculita para evitar la evaporación del agua. El riego de la semilla era diario y moderado, cuando se encontraba con mucha humedad se regaba al tercer día.

El experimento se estableció en el invernadero de la División de Ciencias Forestales (DiCiFo), Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Estado de México (Figura 60a, b).

### **Diseño experimental**

Para la evaluación de control químico, se trabajó con un diseño experimental completamente al azar, con cinco fungicidas y dos testigos (uno sin fungicida y sin impregnación del patógeno y otro con solo *Fusarium*), cada tratamiento con cinco repeticiones. Cada repetición fue un contenedor y la unidad experimental fueron 50 semillas (250 semillas totales por tratamiento y 1750 semillas totales). El periodo de evaluación del efecto de los fungicidas en plántulas de pino en preemergencia y postemergencia fue durante un mes, una semilla se consideró germinada cuando la plántula alcanza la etapa de cabeza de cerillo. Los datos del porcentaje de semillas germinadas se transformaron con la función arco seno con el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2002) y los valores medios de cada tratamiento se compararon con prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Además, se registró el número de plántulas en postemergencia afectadas cada semana.

En el caso del control biológico, se utilizó el mismo diseño experimental, con un arreglo de 6 tratamientos (Natucontrol, PHC-T22, *Trichoderma erinaceum*, *T. asperellum*, testigo positivo y testigo negativo) pero con 4 repeticiones, y un total 24 unidades a evaluar. La unidad experimental fue de 42 plantas (336 plántulas por tratamiento). Los resultados se analizaron con el programa R y se le realizó la prueba de Tukey con una confiabilidad del 95% ( $p \leq 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El experimento fue monitoreado durante un mes y se evaluaron dos variables: germinación e incidencia de *Fusarium* (Figuras 60 y 61).

### Porcentajes de germinación

#### Fungicidas

Los resultados sobre los porcentajes de germinación registrados de la semilla de *P. cembroides* correspondientes a los distintos tratamientos, se observa en el Cuadro 18, donde se realizó la transformación del dato "Porcentaje de germinación" a través de la aplicación del arcosen  $\sqrt{X}$ , como lo sugiere Castillo (2008).

**Cuadro 18.** Porcentaje de germinación de los siete tratamientos evaluados.

Tratamiento	Semilla germinada	% de germinación	$\sqrt{\%$ población germinada	Arcoseno $\sqrt{\%$ población germinada
T1	107	42.8	0.652	0.862
T2	86	34.4	0.578	0.95
T3	117	46.8	0.678	0.82
T4	113	45.2	0.668	0.838
T5	59	23.6	0.468	1.078
T6	56	22	0.46	1.09
T7	100	40	0.628	0.89

T1: Boscalid-Pyraclostrobin (0.16 g), T2: Captan (0.3 g), T3: Procloraz (0.16 ml), T4: Propamocarb (0.3 ml), T5: Tiabendazol (0.4 g), T6: *Fusarium*, T7: Sin fungicida ni *Fusarium*.

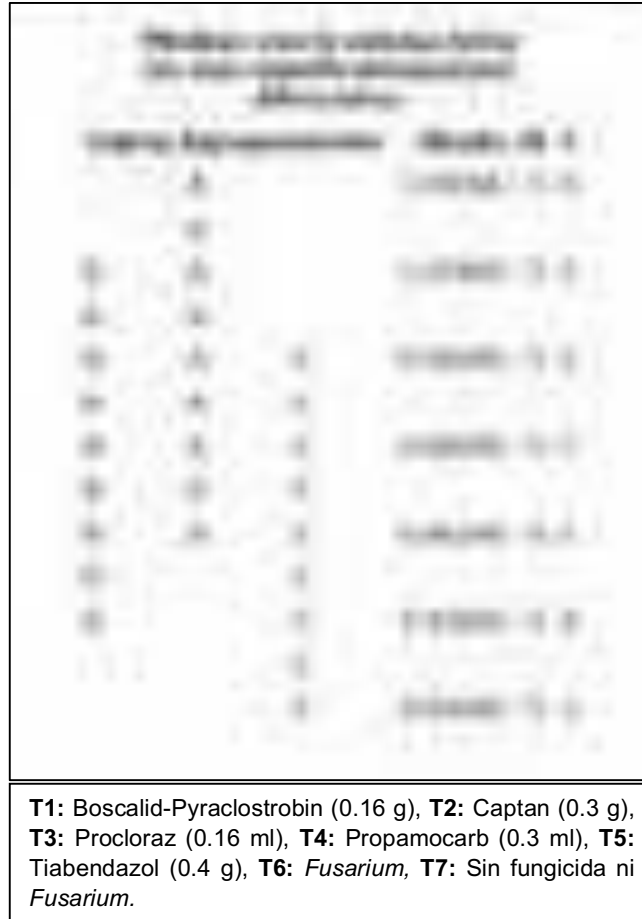
Posterior a la transformación de los datos de Porcentaje de germinación, se programaron en SAS, para realizar su correspondiente análisis de varianza y prueba de medias Tukey, obteniendo la siguiente salida del programa (Figura 50):



**Figura 50.** Análisis de varianza obtenido mediante el Programa SAS 9.0

El análisis de varianza nos refleja un valor de F calculada de 4.23 la cual es mayor a la F tabulada de 2.45, rechazando con ello la hipótesis nula, asumiendo que no todos los tratamientos tienen un efecto igual sobre la germinación de las semillas de *P. cemborides*.

Posteriormente se realizó la prueba de medias de Tukey para conocer el efecto medio de los distintos tratamientos sobre la germinación de las semillas de pino, obteniendo el resultado de la Figura 51.



**Figura 51.** Resultado de Prueba de medias de Tukey obtenido mediante el programa SAS 9.0.

Como se puede observar en la salida de Tukey, el efecto que cada uno de los tratamientos ejerce sobre la germinación no es la misma y en este caso los porcentajes de germinación más altos hasta los más bajos se leen de forma ascendente; la germinación más alta la obtuvo el T3, mientras que la germinación más baja la presentó el T6. De la misma manera se puede observar que existe más de un tratamiento con efectos similares entre sí sobre la variable de respuesta.

En el Cuadro 19, se presentan los porcentajes de germinación concentrados por tratamiento, los cuales se pueden comparar con la salida de la prueba de Tukey para confirmar lo dicho en el párrafo anterior y respaldar las conclusiones.



**Cuadro 19.** Porcentajes de germinación por tratamiento.

Tratamiento	Porcentaje de germinación
T1	42.8
T2	34.4
T3	46.8
T4	45.2
T5	23.6
T6 (Testigo -)	22.4
T7 (Testigo +)	40

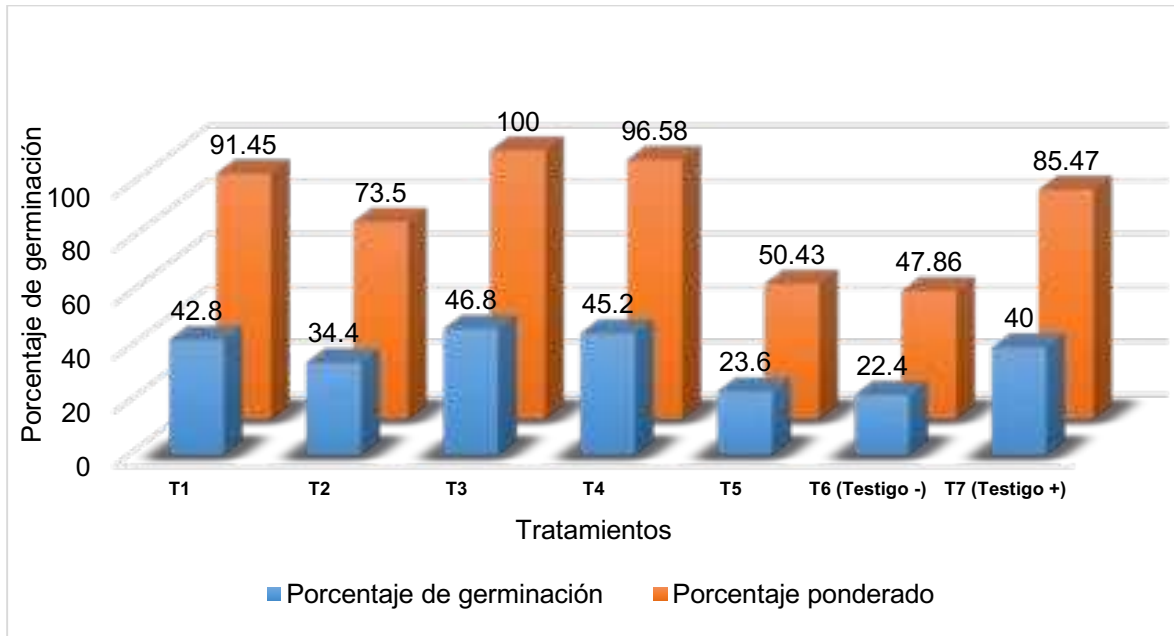
**T1:** Boscalid-Pyraclostrobin (0.16 g), **T2:** Captan (0.3 g), **T3:** Procloraz (0.16 ml), **T4:** Propamocarb (0.3 ml), **T5:** Tiabendazol (0.4 g), **T6:** *Fusarium*, **T7:** Sin fungicida ni *Fusarium*.

Cabe mencionar que, para tener un parámetro de referencia respecto al porcentaje de germinación de la semilla de la especie de pino utilizada, se realizó una prueba de germinación la cual fue del 20 % a los 35 días de evaluación (Figura 52). Por la razón mencionada se decidió tomar la germinación más alta reflejada en el Tratamiento 3 (46.8 %) como el 100 % de germinación esperada y a partir de ello ponderar los porcentajes de germinación de los distintos tratamientos, además de agregar una escala de calificación cualitativa basada en el porcentaje de germinación ponderado que consistió en que cada rango de 25 % correspondería una calificación diferente quedando de la siguiente manera: de 0 a 25%-baja, 26 a 50-regular, 51 a 75-buena y de 76 a 100-alta, como se observa en el Cuadro 20.

**Cuadro 20.** Escala cualitativa del porcentaje de germinación por tratamiento.

Tratamiento	Porcentaje de germinación	Porcentaje ponderado	Escala de calificación cualitativa
T1	42.8	91.45	Alta
T2	34.4	73.5	Buena
T3	46.8	100	Alta
T4	45.2	96.58	Alta
T5	23.6	50.43	Regular
T6 (Testigo -)	22.4	47.86	Regular
T7 (Testigo +)	40	85.47	Alta

**T1:** Boscalid-Pyraclostrobin (0.16 g), **T2:** Captan (0.3 g), **T3:** Procloraz (0.16 ml), **T4:** Propamocarb (0.3 ml), **T5:** Tiabendazol (0.4 g), **T6:** *Fusarium*, **T7:** Sin fungicida ni *Fusarium*.



**Figura 52.** Porcentajes de germinación de *Pinus cembroides* con 31 días de evaluación: **T1:** Boscalid-Pyraclostrobin (0.16 g), **T2:** Captan (0.3 g), **T3:** Procloraz (0.16 ml), **T4:** Propamocarb (0.3 ml), **T5:** Tiabendazol (0.4 g), **T6:** *Fusarium*, **T7:** Sin fungicida ni *Fusarium*.

### ***Trichoderma* spp.**

El proceso de germinación inició a los 12 días posteriores a la siembra, el T1 (*Trichoderma harzianum-Fusarium circinatum*) mostró la mayor cantidad de semilla germinada con respecto a los otros tratamientos, como se muestra en la Figura 53.



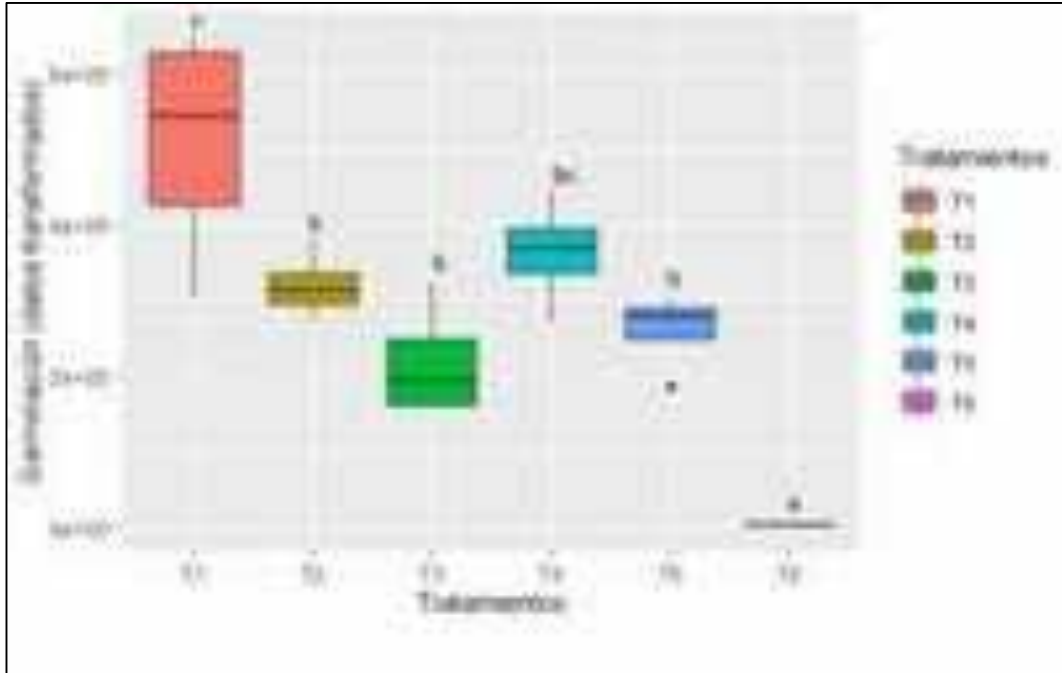
**Figura 53.** Gráfica de la germinación acumulada promedio por cada tratamiento. **T1:** Natucontrol-*F. circinatum*, **T2:** *T. erinaceum*-*F. circinatum*, **T3:** *T. asperellum*-*F. circinatum*, **T4:** PHC-*F. circinatum*, **T5:** Testigo (+), **T6:** Testigo (-).

Como se observa en el análisis estadístico (Cuadro 21), el T6 tiene diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos, en mayor medida con el T1; sin embargo, los otros tratamientos no muestran diferencias significativas entre ellos (Figura 54).

**Cuadro 21.** Análisis estadístico del porcentaje de germinación de la semilla de los diferentes tratamientos evaluados.

Tratamientos	lsmean	SE	Df	lower.CL	upper.CL	Grupo
T6	3533	41312	18	-118457	125524	a
T3	217145	41312	18	95155	339135	b
T5	261243	41312	18	139253	383233	b
T2	318342	41312	18	196352	440333	b
T4	362512	41312	18	240521	484502	bc
T1	509423	41312	18	387432	631413	c

**T1:** Natucontrol-*F. circinatum*, **T2:** *T. erinaceum*-*F. circinatum*, **T3:** *T. asperellum*-*F. circinatum*, **T4:** PHC-*F. circinatum*, **T5:** Testigo (+), **T6:** Testigo (-).



**Figura 54.** Medias y comparación entre tratamientos con *Trichoderma*: **T1:** Natucontrol-*F. circinatum*, **T2:** *T. erinaceum*-*F. circinatum*, **T3:** *T. asperellum*-*F. circinatum*, **T4:** PHC-*F. circinatum*, **T5:** Testigo (+), **T6:** Testigo (-).

### Porcentajes de plántula enferma

La incidencia se evaluó como la suma total de las plantas que presentaron los síntomas y signos típicos del complejo de *Fusarium* sp., y las plantas muertas, ocasionadas por el mismo: constricción del tallo, doblamiento de la planta, presencia del hongo en la semilla cuando esta se encontraba en fase de cerillo y acículas secas (Figuras 60e-g; 61b-f).

### Fungicidas

En cuanto a los resultados correspondientes a los porcentajes de plántula enferma registrados para *P. cembroides* correspondientes a los distintos tratamientos con fungicidas, se muestra el Cuadro 22, donde se realizó la transformación del dato “Porcentaje de población enferma” a través de la aplicación del  $\arcsen \sqrt{X}$ , como lo sugiere Castillo (2008).

**Cuadro 22.** Porcentajes de plántula enferma de los siete tratamientos evaluados.

Tratamiento	Plantas enfermas	% de plantas enfermas	$\sqrt{\%}$ plantas enfermas	Arcoseno $\sqrt{\%}$ plantas enfermas
T1	22	8.8	0.28	1.288
T2	5	2	0.108	1.462
T3	0	0	0	1.57
T4	23	9.2	0.294	1.27
T5	6	2.4	0.116	1.452
T6	3	1.2	0.084	1.486
T7	107	42.8	0.654	0.862

T1: Boscalid-Pyraclostrobin (0.16 g), T2: Captan (0.3 g), T3: Procloraz (0.16 ml), T4: Propamocarb (0.3 ml), T5: Tiabendazol (0.4 g), T6: *Fusarium*, T7: Sin fungicida ni *Fusarium*.

Posterior a la transformación de los datos del Porcentaje de población enferma estos se programaron en el Programa SAS, y así poder realizar su correspondiente análisis de varianza y prueba de medias Tukey (Figura 55).



**Figura 55.** Análisis de varianza obtenido mediante el programa SAS 9.0

El análisis de varianza nos refleja un valor de F calculada de 37.62 la cual es mayor a la F tabulada de 2.45, rechazando con ello la hipótesis nula, asumiendo que no todos los tratamientos tienen un efecto igual sobre el porcentaje de plántula germinada de *P. cemborides*.

Posteriormente se realizó la prueba de medias de Tukey para conocer el efecto medio de los distintos tratamientos sobre la incidencia de síntomas en las plántulas de pino (Figura 56).



**Figura 56.** Resultado de Prueba de medias de Tukey obtenido mediante el programa SAS 9.0

Como se puede observar en la salida de Tukey, el tratamiento que mostró la menor incidencia del patógeno fue el T3; mientras que el T7, presentó mayor incidencia de planta enferma. De modo descendente, del mejor al peor tratamiento con respecto al porcentaje de plantas enfermas es T3, T6, T2, T5, T1, T4 y T7.

En el Cuadro 23, se presentan los porcentajes de infección concentrados por tratamiento, los cuales se pueden comparar con la salida de la prueba de Tukey para confirmar lo dicho en el párrafo anterior y respaldar las conclusiones.

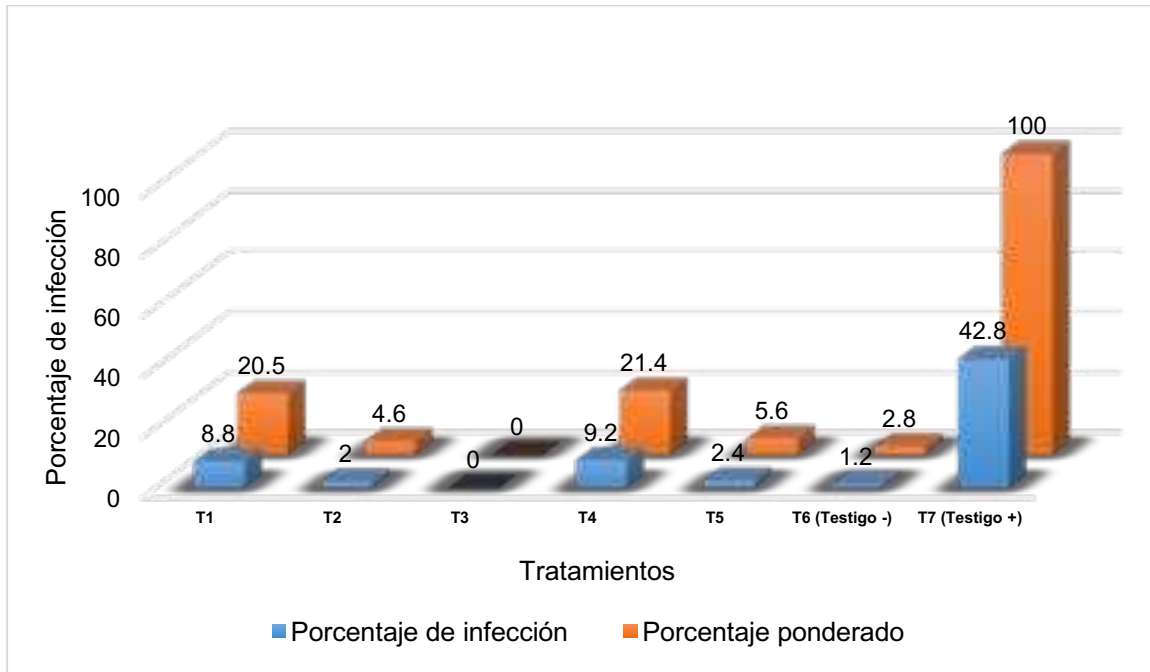
Para esta variable evaluada, fue necesario crear una escala cualitativa para la calificación del porcentaje de la población enferma, la cual consistió en tomar el porcentaje más alto de incidencia de la infección de entre todos los tratamientos y asignarle el 100% de manera arbitraria, y a partir de este ponderar la infección de los tratamientos restantes: 0 a 25-baja, 26 a 50-regular, 51 a 75-alta y 76 a 100-muy alta (Cuadro 23).

**Cuadro 23.** Escala cualitativa del porcentaje de infección por tratamiento.

Tratamiento	Porcentaje de infección	Porcentaje ponderado	Escala de calificación cualitativa
T1	8.8	20.5	Baja
T2	2	4.6	Baja
T3	0	0	Baja
T4	9.2	21.4	Baja
T5	2.4	5.6	Baja
T6 (Testigo -)	1.2	2.8	Baja
T7 (Testigo +)	42.8	100	Muy alta

**T1:** Boscalid-Pyraclostrobin (0.16 g), **T2:** Captan (0.3 g), **T3:** Procloraz (0.16 ml), **T4:** Propamocarb (0.3 ml), **T5:** Tiabendazol (0.4 g), **T6:** *Fusarium*, **T7:** Sin fungicida ni *Fusarium*.

En la Figura 57, se representan los porcentajes de infección por tratamiento en los 31 días de evaluación. Se observó que fue en el T7 (Testigo +) en donde se presentó la mayor cantidad de plántulas enfermas en comparación con los diferentes tratamientos. Siendo el T3 (Sportak: Procloraz) el tratamiento que al mes de monitoreo no presentó individuos con síntomas visibles.



**Figura 57.** Porcentaje de infección por tratamiento en *Pinus cembroides* con 31 días de evaluación. **T1:** Boscalid-Pyraclostrobin (0.16 g), **T2:** Captan (0.3 g), **T3:** Procloraz (0.16 ml), **T4:** Propamocarb (0.3 ml), **T5:** Tiabendazol (0.4 g), **T6:** *Fusarium*, **T7:** Sin fungicida ni *Fusarium*.

### ***Trichoderma* spp.**

En la semana 2 se tuvo mayor incidencia de *Fusarium circinatum*, posteriormente el número disminuyó, posiblemente porque las especies de *Trichoderma* empezaron a actuar sobre el patógeno y detuvo en gran medida la aparición de síntomas (Cuadro 24).

En la semana 4 el T1 (*Trichoderma harzianum*-*Fusarium circinatum*) mostró la mayor incidencia, seguido del tratamiento 4 (PHC-*Fusarium circinatum*), como se muestra en el Cuadro 25 y Figura 58.

**Cuadro 24.** Incidencia de *Fusarium* en plántula por semana.

Tratamiento/semana	S1	S2	S3	S4
T1R1	1	28	11	4
T1R2	5	29	7	2
T1R3	2	34	9	1
T1R4	1	27	21	0
T2R1	1	20	10	4



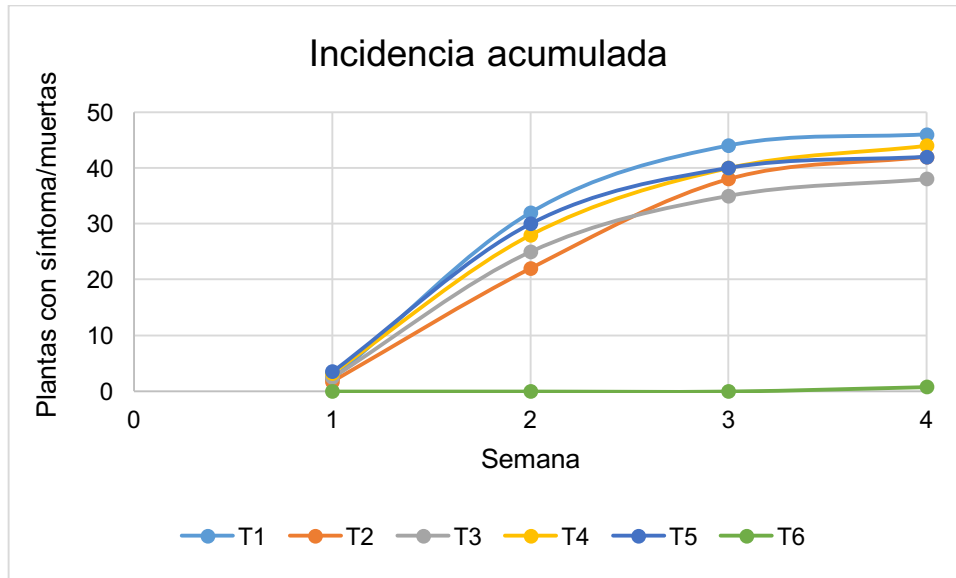
T2R2	3	19	12	6
T2R3	2	17	28	2
T2R4	1	22	13	2
T3R1	1	22	7	6
T3R2	4	17	6	3
T3R3	3	24	14	2
T3R4	2	25	12	2
T4R1	4	26	13	8
T4R2	1	31	6	4
T4R3	3	24	18	1
T4R4	5	20	11	3
T5R1	8	30	10	1
T5R2	2	23	15	2
T5R3	1	30	6	2
T5R4	3	20	9	2
T6R1	0	0	0	0
T6R2	0	0	0	1
T6R3	0	0	0	2
T6R4	0	0	0	0

**T1:** Natucontrol-*F. circinatum*, **T2:** *T. erinaceum*-*F. circinatum*, **T3:** *T. asperellum*-*F. circinatum*, **T4:** PHC-*F. circinatum*, **T5:** Testigo (+), **T6:** Testigo (-).

**Cuadro 25.** Incidencia acumulada de *Fusarium* en plántula por semana.

Tratamiento/semana	S1	S2	S3	S4
T1	2	32	44	46
T2	2	22	38	42
T3	3	25	35	38
T4	3	28	40	44
T5	4	30	40	42
T6	0	0	0	1

**T1:** Natucontrol-*F. circinatum*, **T2:** *T. erinaceum*-*F. circinatum*, **T3:** *T. asperellum*-*F. circinatum*, **T4:** PHC-*F. circinatum*, **T5:** Testigo (+), **T6:** Testigo (-).



**Figura 58.** Gráfica de la incidencia acumulada de *Fusarium* en plántula por semana. **T1:** Natucontrol-*F. circinatum*, **T2:** *T. erinaceum*-*F. circinatum*, **T3:** *T. asperellum*-*F. circinatum*, **T4:** PHC-*F. circinatum*, **T5:** Testigo (+), **T6:** Testigo (-).

En el Cuadro 26 se muestra el porcentaje de semilla germinada con respecto al total colocada (84-100 %) y la incidencia, de igual manera en porcentaje con respecto al total de semillas germinadas.

**Cuadro 26.** Porcentaje de incidencia con respecto al porcentaje de germinación promedio por tratamiento.

Experimento	Germinación total (%)	Incidencia total (%)
T1	76	71
T2	66	73
T3	58	77
T4	69	75
T5	62	73
T6	13	76

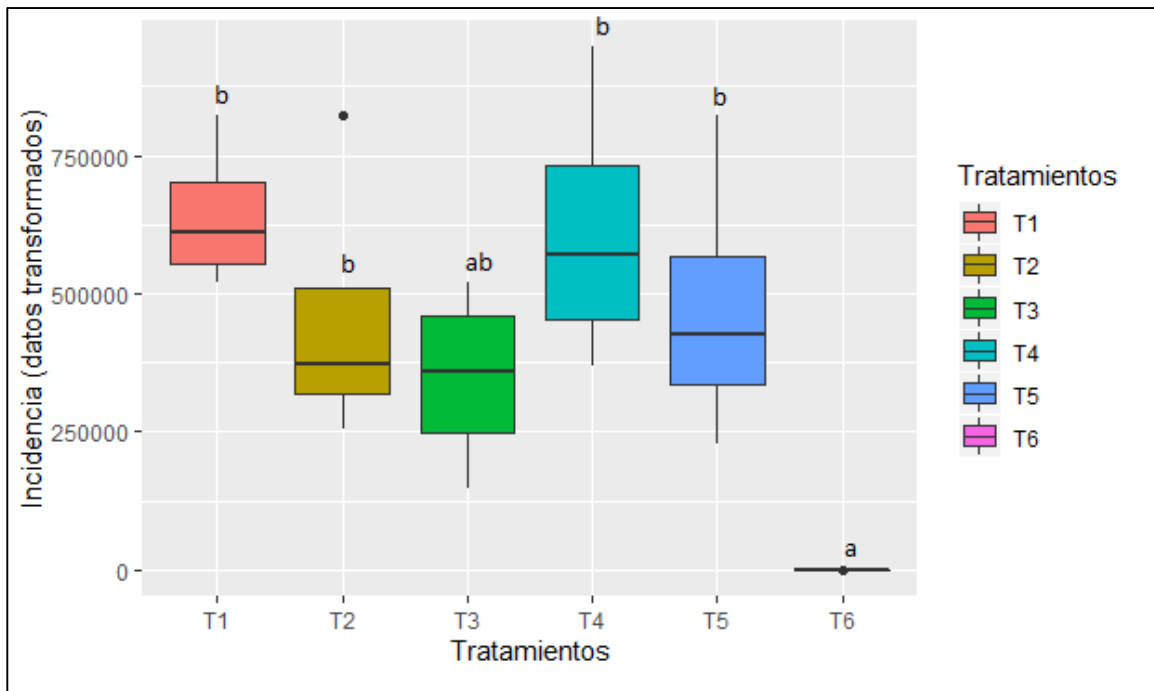
**T1:** Natucontrol-*F. circinatum*, **T2:** *T. erinaceum*-*F. circinatum*, **T3:** *T. asperellum*-*F. circinatum*, **T4:** PHC-*F. circinatum*, **T5:** Testigo (+), **T6:** Testigo (-).

El único tratamiento que muestra diferencias significativas en cuanto a la presencia de síntomas y plantas muertas (incidencia) es el T6 (Testigo -). Los demás tratamientos no muestran diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Cuadro 27 y Figura 59).

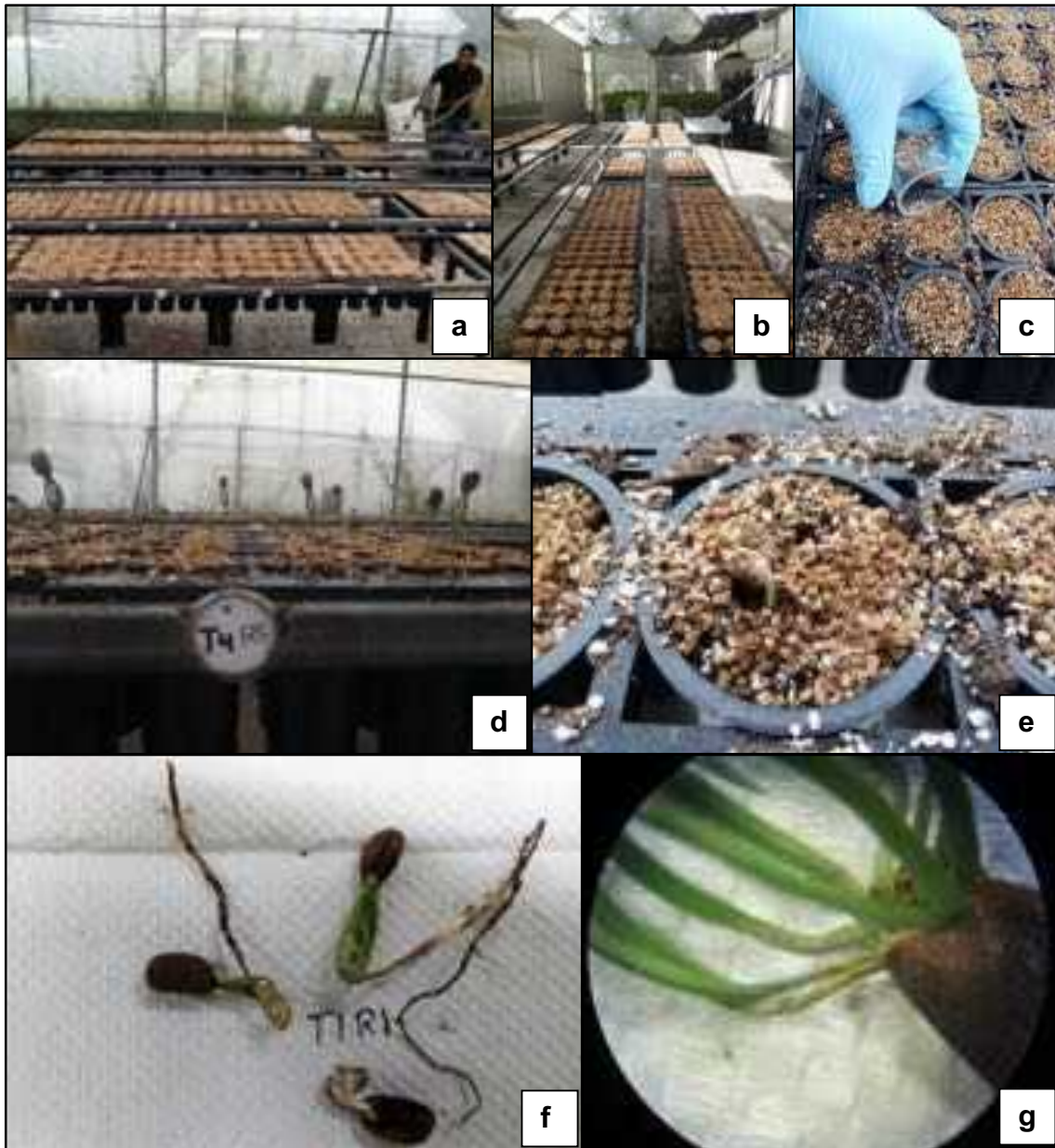
**Cuadro 27.** Análisis estadístico de la incidencia de *Fusarium* en plántula enferma de los diferentes tratamientos evaluados.

Tratamientos	Lsmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	Grupo
T6	3.1	99516	18	-293861	293867	a
T3	347623.3	99516	18	53759	641487	ab
T2	455055	99516	18	161191	748919	b
T5	475828.7	99516	18	181965	769693	b
T4	614518.7	99516	18	320655	908383	b
T1	642529.2	99516	18	348665	936393	b

T1: Natucontrol-*F. circinatum*, T2: *T. erinaceum*-*F. circinatum*, T3: *T. asperellum*-*F. circinatum*, T4: PHC-*F. circinatum*, T5: Testigo (+), T6: Testigo (-).



**Figura 59.** Medias y comparación entre tratamientos para la incidencia de *Fusarium* en plántula.



**Figura 60.** Efectividad biológica de cinco fungicidas sobre *Fusarium circinatum*: **a**, **b**) Establecimiento del experimento; **c**) Segunda aplicación de fungicidas sobre semilla inoculada con *Fusarium*; **d**) Etapa cabeza de cerillo de planta de *Pinus cembroides*; **e**) Planta recién emergida y con síntomas de secadera; **f**) Semilla no germinada y plántula con pudrición de raíz; **g**) Plántula con síntomas en follaje.



**Figura 61.** Efectividad biológica de cuatro cepas de *Trichoderma* sobre *Fusarium circinatum*: **a)** Aplicación de la suspensión de esporas de *Trichoderma* spp.; **b)** Ahorcamiento del tallo; **c, d)** Pudrición de radícula y follaje de plántula de *Pinus cembroides* en etapa de cerillo; **e, f)** Plántula con síntomas en follaje.

## CONCLUSIONES

### Fungicidas

El tratamiento con mayor porcentaje de germinación fue el T3 Sportak (Procloraz) con un valor de 46.8 %, el cual es significativamente diferente en media a los demás. El segundo mejor tratamiento correspondió al T4 (Previcur N: Propamocarb), que tuvo 45.2 % de germinación; luego T2 (Captan 50 WP), T7 (Testigo positivo) y T1 (Cabrio: Boscalid-Pyraclostrobin), los cuales no tuvieron diferencias significativas.

El testigo negativo (T6), fue como se esperó, el tratamiento con menor cantidad de semilla germinada (22.4 %). Cabe mencionar que este valor es muy cercano al que arrojó la prueba de germinación (20%) y coincide con la naturaleza del testigo ya que no fue impregnado con el patógeno ni fungicida alguno. El T5 (Tecto 60 PH: Tiabendazol) fue el segundo más bajo en el porcentaje de germinación, con un valor de 23.6 %, pero si fue el más bajo de los fungicidas en cuanto al valor de la variable respuesta.

En cuanto a la cantidad de planta enferma, el tratamiento con menor incidencia de síntomas fue el T3 Sportak (Procloraz), coincidiendo con el mayor porcentaje de germinación; el segundo tratamiento con menor planta enferma es T6 (Testigo -), ya que no fue impregnado con *Fusarium*; el T2, fue el tercer mejor tratamiento.

Los tratamientos 3, 6 y 2 ejercieron efectos similares en cuanto a la aparición de síntomas, así como los tratamientos 5 y 1. Los tratamientos que presentaron mayor presencia de síntomas fueron el 4 y 7 (Testigo +).

### *Trichoderma* spp.

Las diferentes especies de *Trichoderma* utilizadas en este trabajo permitieron obtener una buena germinación. Sin embargo, como método para combatir Damping off, no mostraron resultados eficientes en el análisis de datos, esto podría ser debido al método de aplicación que se utilizó: se sospecha que poner el patógeno durante una hora y el hongo antagonista en el sustrato, puede causar más daños más rápido que lo que actúan los *Trichoderma*, ya que el patógeno pudo haber entrado por el hipocótilo o por grietas en la testa y haber dañado el embrión. Las semillas que no germinaron, pudo deberse a que eran semillas vanas o que éstas no se encontraban viables.

Cuando la plántula presentó síntomas en etapa de cerillo posiblemente fue afectada mientras la testa se caía y pasó directamente a las acículas y estas se empezaron a secar.



Para el caso del testigo negativo en donde hubo baja germinación pudo ser porque cuando el sustrato se esterilizó, se guardó en bolsas plásticas y no hubo aireación posterior, por lo tanto, guardó calor y al momento de germinar posiblemente esto les afectó.

Se recomienda probar otros métodos de aplicación, como preventivos o directamente a la semilla después de la inoculación del patógeno para probar si en verdad es ineficiente o no.

### LITERATURA CITADA

Castillo, L.E. 2008. Introducción a la Estadística Experimental. México, Universidad Autónoma Chapingo. 301 p.

Cibrián, T.D. y Cibrián, T.J. 2017. Red temática en salud forestal: Estado del arte de la línea de investigación de plagas y enfermedades de importancia en viveros forestales (informe 2016). México. Disponible en: [http://redtematicasaludforestal.com/DBSX/System/informes\\_resultados/Estado\\_arte\\_%20viveros\\_rd579bdk.pdf?id=173](http://redtematicasaludforestal.com/DBSX/System/informes_resultados/Estado_arte_%20viveros_rd579bdk.pdf?id=173)

Don Juan Macías Bonifacio. 2006. Efectividad biológica de *Trichoderma* spp. contra hongos causantes de Damping off en viveros forestales. Tesis de Maestría. División de Ciencias Forestales. México.

Onán, E. 2013. Evaluación de cuatro fungicidas para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* en el cultivo de Arverja dulce (*Pisum sativum* L.); Tecpán Guatemala, Chimaltenango. Tesis de Licenciatura. Universidad Rafael Landívar. Guatemala de la Asunción. 33 p.

Prieto, R.J.A.; García, R.J.L.; Mejía, B.J.M.; Huchín, A.S.; Aguilar, V.J.L. INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias). 2009. Producción de planta del género *Pinus* en viveros de clima templado frío. ISBN: 978-607-425-133-3 Núm. 28. Pág. 19. México. Disponible en: <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/2091/Produccion%20de%20planta%20del%20genero%20pinus%20en%20vivero%20en%20clima%20templado%20frio.pdf?sequence=1>

SAS Institute. 2002. The SAS system for windows. Release 9.0. SAS Institute. Cary, NC.