



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Agropecuarias
Área Académica de Ciencias Agrícolas y Forestales

**“Evaluación del efecto antagonista de especies de
Trichoderma y del extracto de *Agave salmiana*
sobre el crecimiento *in vitro* de hongos
fitopatógenos de interés agrícola”**

TESIS

Que para obtener el grado de
Licenciatura en Ingeniería en Agronomía para la
Producción Sustentable

Presenta:

Mariel Aranza García Hernández

Directora de Tesis:

Dra. Mariana Saucedo García

Tulancingo de Bravo, Hidalgo

Agosto 2024





Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
 Instituto de Ciencias Agropecuarias
Institute of Agricultural Sciences
 Área Académica de Ciencias Agrícolas y Forestales
Academic Area of Agricultural and Forestry Sciences

Tulancingo de Bravo, Hidalgo., a 05 de julio de 2024
Asunto: Autorización de impresión

MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO
 DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

Por este conducto y con fundamento en el Título Cuarto, Capítulo I, Artículo 40 del Reglamento de Titulación, le comunico que el jurado que le fue asignado a la pasante de Licenciatura en Ingeniería en Agronomía para la Producción Sustentable, GARCÍA HERNÁNDEZ MARIEL ARANZA, quien presenta el trabajo de Tesis denominado “Evaluación del efecto antagonista de especies de *Trichoderma* y del extracto de *Agave salmiana* sobre el crecimiento *in vitro* de hongos fitopatógenos de interés agrícola”, ha decidido autorizar la impresión de esta, una vez atendidas todas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los miembros del jurado:

- PRESIDENTE** Dr. Jaime Pacheco Trejo
Jaime Pacheco Trejo
- SECRETARIO** Dra. Eliazar Aquino Torres
Eliazar Aquino Torres
- VOCAL 1** Dra. Mariana Saucedo García
Mariana S.G.
- SUPLENTE 1** Dra. Diana Sánchez Rangel
Diana Sánchez Rangel

Sin otro particular por el momento, me despido de usted.

Atentamente
 “Amor, Orden y Progreso”

Sergio Ruben Perez Rios
 Dr. Sergio Ruben Perez Rios
 Coordinador de Ingeniería en
 Agronomía para la Producción
 Sustentable



Av. Universidad Km. 1 Exhacienda de Aquetzalpa.
 C.P. 43600. Tulancingo, Hidalgo. México
 Teléfono: 7717172000 Ext. 2432
 sperez@uaeh.edu.mx

uaeh.edu.mx

AGRADECIMIENTO

A la *Doctora Mariana Saucedo García*, directora de esta tesis, gracias por aceptarme como su tesista, por los consejos, la paciencia, el tiempo que me ha dedicado y el apoyo incondicional que me ha brindado. Por ser una gran persona y por confiar en mí durante este proceso de mi formación.

A la *Doctora Eliazar Aquino Torres* por ser mi asesora de tesis, por el tiempo brindado y por ayudarme en la realización de este trabajo.

A la *Doctora Diana Sánchez Rangel* por su disposición en la formación del comité de asesoría y por su valiosa aportación en la realización de este proyecto.

Al *Doctor Jaime Pacheco Trejo* por formar parte del comité de asesoría, por el tiempo dedicado y su amable atención durante el desarrollo de este trabajo.

DEDICATORIA

A esas personas importantes en mi vida, que siempre estuvieron listas para brindarme su apoyo y aliento para seguir adelante, con mucho cariño a ustedes:

Mis guías y mayor inspiración, mis padres

Elena y Juan Manuel

Mi hermana Naye

Mis pequeños Axel y Yami

Mi novio Alan

Mis abuelos Mago y Manuel

Especialmente a los que están más cerca que

nunca, aunque ya no los pueda ver

Delia y Vicente

INDICE

Contenido

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Definición de enfermedad.....	1
1.1.1 Clasificación de enfermedades	1
1.2. Enfermedades causadas por hongos de importancia agrícola.....	2
<i>Botrytis cinerea</i>	2
<i>Fusarium oxysporum</i>	3
<i>Fusarium verticillioides</i>	5
1.3. Manejo de enfermedades	6
Definición	6
Clasificación	6
1.3.1. <i>Trichoderma</i> como organismo antagónico	10
1.3.2. Extractos vegetales	11
II. ANTECEDENTES.....	15
III. JUSTIFICACIÓN.....	18
IV. OBJETIVOS.....	20
Objetivo General	20
Objetivos Específicos.....	20
V. HIPÓTESIS	21
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1. Material biológico.....	22
6.1.1. Organismos fúngicos	22
6.1.2. <i>Agave salmiana</i>	22
6.2. Preparación del extracto de <i>Agave salmiana</i>	22
6.3. Pruebas antagónicas	23
6.4. Crecimiento de hongos con extracto de <i>Agave salmiana</i>	23
6.5. Cálculo de porcentaje de inhibición.....	24
6.6. Tamizaje fitoquímico	24

6.6.1. Detección de flavonoides	24
6.6.2. Detección de quinonas	24
6.6.3. Detección de saponinas.....	25
6.6.4. Detección de aminoácidos	25
6.6.5. Detección de taninos	25
6.6.6. Detección de compuestos fenólicos.....	25
6.6.7. Determinación cualitativa	25
6.7. Cuantificación de metabolitos secundarios del extracto de <i>Agave salmiana</i> ..	25
6.7.1. Determinación de fenoles totales	25
6.7.2. Determinación de flavonoides	26
6.7.3. Determinación de antioxidantes.....	27
6.8. Análisis estadístico	28
VII. RESULTADOS	29
7.1. Pruebas antagónicas de <i>T. asperellum</i> y <i>Trichoderma</i> sp. sobre diferentes hongos fitopatógenos	29
7.2. Contaminación de medio de cultivo PDA con extracto de <i>Agave salmiana</i> ..	30
7.2.1. Efecto del extracto de <i>A. salmiana</i> sobre <i>Botrytis cinerea</i>	30
7.2.2. Efecto del extracto de <i>A. salmiana</i> sobre <i>Fusarium oxysporum</i>	31
7.2.3. Efecto del extracto de <i>A. salmiana</i> sobre <i>Fusarium verticillioides</i> ...	32
7.3. Efectos del extracto de <i>Agave salmiana</i> sobre hongos antagónicos.....	33
7.3.1. Efecto del extracto de <i>A. salmiana</i> sobre <i>T. asperellum</i>	33
7.3.2. Efectos del extracto de <i>A. salmiana</i> sobre <i>Trichoderma</i> sp.	34
7.4. Caracterización del extracto de <i>A. salmiana</i>	36
7.4.1. Rendimiento del extracto	36
7.4.2. Grupos de constituyentes fitoquímicos.....	36
7.4.3. Cuantificación de metabolitos secundarios.....	37
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	39
IX. CONCLUSIONES	43
X. REFERENCIAS.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo micelial de los hongos fitopatógenos-----	6
Figura 2. Pirámide del Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades -----	9
Figura 3. Desarrollo micelial de especies de <i>Trichoderma</i> -----	11
Figura 4. Estructura química de los principales grupos de metabolitos secundarios -----	14
Figura 5. Capacidad antagónica de <i>T. asperellum</i> y <i>Trichoderma</i> sp. frente a distintos hongos fitopatógenos -----	29
Figura 6. Efectos del extracto de <i>A. salmiana</i> sobre el crecimiento de <i>B. cinerea</i> -----	31
Figura 7. Efecto del extracto de <i>A. salmiana</i> sobre el crecimiento de <i>F. oxysporum</i> -----	32
Figura 8. Efecto del extracto de <i>A. salmiana</i> sobre el crecimiento de <i>F. verticillioides</i> ---	33
Figura 9. Efecto del extracto de <i>A. salmiana</i> sobre el crecimiento de <i>T. asperellum</i> -----	34
Figura 10. Efecto del extracto de <i>A. salmiana</i> sobre el crecimiento de <i>Trichoderma</i> sp.--	35
Figura 11. Detección cualitativa de los principales constituyentes fitoquímicos del extracto de <i>A. salmiana</i> -----	37

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Especies de <i>Trichoderma</i> frente a enfermedades de interés agrícola-----	15
Tabla 2. Extractos vegetales frente a enfermedades de importancia agrícola-----	16
Tabla 3. Extractos de <i>Agave</i> utilizados en el manejo de hongos fitopatógenos -----	17
Tabla 4. Concentración de los tratamientos-----	24
Tabla 5. Rendimiento del extracto de <i>A. salmiana</i> -----	36
Tabla 6. Resultados de las reacciones para determinación cualitativa de los principales constituyentes fitoquímicos del extracto de <i>A. salmiana</i> -----	37

ABREVIATURAS

ACSA- Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria

CNRF- Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

DGSV- Dirección General de Sanidad Vegetal

Dpi- Días post-inoculación

FAO- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

MIP- Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades

MS - Metabolitos Secundarios

OMS- Organización Mundial de la Salud

PDA- Papa Dextrosa Agar

RESUMEN

En la agricultura una de las principales limitantes en la producción es la incidencia de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos. Algunos de los hongos más peligrosos son *Botrytis cinerea*, el cual afecta principalmente a la producción postcosecha, *Fusarium oxysporum*, el cual es representante más importante del género, causante de la marchitez vascular en una gran cantidad de cultivos; y *F. verticillioides*, el principal afectante de la producción mundial del maíz.

Debido a la gran incidencia de enfermedades fúngicas, se ha recurrido al uso excesivo de agroquímicos por su rapidez y eficiencia de acción; no obstante, estas prácticas agrícolas han contribuido a los problemas de contaminación ambiental y de salud humana. Esta problemática ha impulsado la búsqueda de nuevas alternativas de manejo que sean más amigables con el medio ambiente y de menor residualidad. Ante la necesidad de encontrar nuevos métodos que sustituyan el control químico y que sean eficientes en el control de enfermedades de importancia agrícola, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antifúngico del extracto de *A. salmiana* y la interacción antagonista de dos especies del género *Trichoderma* sobre los hongos fitopatógenos *B. cinerea*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides*.

Para la determinación antagónica del género *Trichoderma* se realizaron pruebas de cultivos duales entre dos cepas de *Trichoderma* (*T. asperellum* y *Trichoderma* sp.) y los hongos fitopatógenos, para determinar la capacidad de inhibición del crecimiento de tres hongos fitopatógenos. De acuerdo con los resultados, se detectó que para *B. cinerea* ambos agentes antagónicos inhibieron más del 70 % de su crecimiento *in vitro*; sin embargo, estadísticamente *T. asperellum* fue el más eficiente. Para *F. oxysporum* la inhibición también fue alta con ambas especies antagónicas alcanzando hasta un 75 %, siendo, estadísticamente *Trichoderma* sp. el que más afectó el crecimiento. Para *F. verticillioides* se obtuvieron inhibiciones de hasta un 60%, para este hongo no se observaron diferencias significativas entre ambos agentes antagónicos. Estos resultados muestran que *Trichoderma* es un excelente controlador de hongos patógenos.

Para determinar la capacidad de inhibición del extracto de *Agave salmiana*, se llevó a cabo la técnica de envenenamiento de medio cultivo PDA a diferentes concentraciones,

contando con un control negativo (-) y uno positivo (+). En esta prueba se analizó también el efecto del extracto frente a los hongos antagonistas del género de *Trichoderma*. El extracto de *Agave* tuvo un efecto mayor al 50% de inhibitorio sobre los hongos *B. cinerea* y *F. verticillioides*, mientras que para *F. oxysporum* se obtuvo un efecto muy por debajo del control positivo (+). Por otra parte, en las pruebas de los hongos antagonistas el extracto alcanzó más del 90 % de inhibición siendo los hongos más susceptibles al efecto antifúngico de *A. salmiana*. Por lo tanto, queda demostrado que el uso simultáneo de ambas estrategias de control no es recomendado.

El extracto de *A. salmiana* reveló la presencia de varios grupos de constituyentes fitoquímicos entre ellos algunos metabolitos secundarios como: flavonoides, saponinas, taninos y compuestos fenólicos; así mismo un alto contenido de aminoácidos, lo que podría explicar el efecto antifúngico del extracto.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de las plantas son una grave amenaza para la producción agrícola (Almeida et al., 2019), por lo que resulta fundamental enfrentarlas con eficacia para evitar pérdidas económicas importantes, tomando en cuenta el cuidado de la biodiversidad, del medio ambiente y la salud humana.

Las pérdidas más graves tanto económicas, como la destrucción de recursos naturales en la agricultura, se le atribuyen a los patógenos transmitidos por el suelo; de entre los cuales los hongos son el grupo más numeroso de agentes fitopatógenos (Tyśkiewicz et al., 2022). Según la FAO, los hongos fitopatógenos afectan principalmente a los cinco cultivos más importantes del mundo: arroz, maíz, papa, trigo y soya (Almeida et al., 2019).

Algunos de los hongos fitopatógenos más peligrosos corresponden a los géneros *Botrytis*, *Aspergillus*, *Verticillium*, *Cladosporium* y *Fusarium* (Tyśkiewicz et al., 2022). La mayoría de las enfermedades fúngicas se controlan generalmente con químicos sintéticos; sin embargo, por el daño que generan en la salud humana y medio ambiente se ha incrementado la búsqueda de nuevas alternativas para el control de enfermedades que sean igual de eficientes, pero que no produzcan residualidad en el suelo y resistencia de los agentes patogénicos (Hernández-Melchor et al., 2019), siendo lo más recomendable el manejo integrado de plagas y enfermedades (MIP) (Syed Ab Rahman et al., 2018).

1.1. Definición de enfermedad

La enfermedad es un estado producido por la alteración fisiológica en organismos vivos, en especies vegetales hace referencia al crecimiento anormal de la planta por la interferencia de algún agente que no permite su correcto funcionamiento (Vera et al., 2006). Los efectos de las enfermedades pueden variar dependiendo del agente causal e incluso de la planta hospedera (Agrios, 2013). En la enfermedad, las células y tejidos de las plantas se debilitan o llegan a destruirse totalmente a causa de los organismos patógenos o condiciones ambientales que la provocan (Agrios, 2013).

1.1.1 Clasificación de enfermedades

Existen muchas formas de clasificar las enfermedades que afectan a las plantas, se pueden clasificar por los síntomas que presentan, según el órgano afectado o según las plantas

afectadas, pero la más útil es su clasificación de acuerdo con el agente causal de la enfermedad (Agrios, 2013). Por lo anterior, existen dos grandes grupos para su clasificación.

Bióticas

Las enfermedades bióticas de las plantas, consideradas también como enfermedades infecciosas, son ocasionadas por distintos organismos como los hongos, procariontes, virus, nematodos o protozoarios (Guzmán-Piedrahita et al., 2009).

Abióticas

Las enfermedades abióticas son consideradas enfermedades no infecciosas que pueden ser causadas por la ausencia de algún factor necesario para el desarrollo óptimo de la planta o por la presencia excesiva del mismo, el cual ya no resulta tolerable para la planta. Ejemplos de factores abióticos incluyen los cambios extremos de temperatura, falta o exceso de luz, falta o exceso de humedad, escasez de oxígeno, contaminación de la atmósfera, el pH del suelo, toxicidad de los agroquímicos (plaguicidas), deficiencia de nutrientes o malas prácticas agrícolas (Arauz, 2011).

1.2. Enfermedades causadas por hongos de importancia agrícola

Botrytis cinerea

Botrytis cinerea es un patógeno con estilo de vida necrótrofo, esto quiere decir que es un organismo que continúa alimentándose aun después de la muerte de su hospedante; es causante de la enfermedad de Moho gris en diversos cultivos, puede infectar a más de 200 especies de plantas (Bi et al., 2023). Es una de las enfermedades de deterioro más destructivas tanto en cultivos establecidos como en postcosecha que afecta gravemente en la producción agrícola (Terrones-Salgado et al., 2019). La infección puede empezar en campo y permanecer inactivo hasta la temporada de postcosecha donde el patógeno se activa y se desarrolla durante el almacenamiento y transporte, causando grandes pérdidas (Liu et al., 2021).

El micelio de *B. cinerea* está constituido por un conjunto de hifas o filamentos tabicados, cilíndricos; los macroconidios constituyen la principal estructura de dispersión del hongo, así como, una de las estructuras de resistencia que presenta (Williamson et al., 2007). En la Figura 1 se puede observar el desarrollo micelial del hongo en el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) a los 7 días de su inoculación. Es un patógeno tan agresivo que puede resistir condiciones extremas de sequía, calor o frío, la infección de este moho gris se ve más extendida en temporadas de lluvia donde se salpican sus esporas y permanecen en las hojas

mojadas (Alvarez et al., 2017). Bajo condiciones de humedad relativa alta, la podredumbre gris puede infectar a frutos, flores, tallos, plántulas, hojas, bulbos, raíces y semillas (Williamson et al., 2007); suele ser más destructivo en tejidos ya maduros incluso senescentes de huéspedes dicotiledóneos (Dean et al., 2012).

La infestación llega a ocurrir desde la etapa de plántula hasta la completa maduración del producto; su desarrollo suele comenzar en los restos de cosechas anteriormente contaminadas que han quedado en el área del cultivo (Dean et al., 2012). La proliferación del hongo comienza a aumentar a medida que la luz y la temperatura aumentan (Larios-Palacios et al., 2020). Su manifestación depende del cultivo al que este afectando, así como de la parte de la planta a la que este infectando. En las hojas nuevas los síntomas no son evidentes debido a que se encuentra inactivo en ese tejido; a medida que las hojas maduran, el hongo se vuelve activo. El hongo se establece inicialmente en hojas o flores que ya hayan sido dañadas por alguna otra condición ya sea ambiental o mecánica (Williamson et al., 2007). Los síntomas más tempranos de la podredumbre de *Botrytis* suelen ser unas manchas de color marrón en las hojas y capullos, o manchas oscuras en los pétalos de las flores; al avanzar la enfermedad, las flores y los frutos se pudren, y las manchas comienzan a verse como un moho veloso de tono grisáceo (Terrones-Salgado et al., 2019).

La infección de la planta hospedera es causada por una gran variedad de enzimas que degradan la pared celular (Ren et al., 2017).

La infección causada por este hongo puede volverse más grave si hay poca ventilación y luz, sumado a una humedad relativa alta. Considerando que es un hongo muy resistente *Botrytis* podrá atacar a cualquier temperatura (Larios- Palacios et al., 2020).

A diferencia de otras especies del género, *B. cinerea* es huésped de una amplia gama de cultivos como la zarzamora, fresas, arándano, grosella, frambuesa, uvas, entre otras plantas. Los daños causados por este patógeno son muy perjudiciales para las industrias de la uva de mesa y de vinificación. Es el responsable de grandes pérdidas de cosechas en todo el mundo (Weiller et al., 2021).

Fusarium oxysporum

Se trata del representante más importante del género *Fusarium* en términos de agricultura y economía (Nikitin et al., 2023). Es el causante de la enfermedad denominada

como marchitez por *Fusarium* o marchitez vascular y afecta la producción de muchos cultivos, tales como la palma de aceite, el tabaco, el tomate, el pepino, la lechuga, los claveles, el algodón y el banano (Bosland, 1988). Es un patógeno que comúnmente se transmite por el suelo, por medio de las semillas al suelo y así comienza la diseminación (Arie, 2019).

El ciclo de la enfermedad se inicia con la presencia del inóculo en el suelo o residuos de cosecha contaminados (Ocaña-López, 2013). El inóculo puede estar conformado por hifas, esporas o clamidosporas que germinan cuando entran en contacto con el hospedero (Ocaña-López, 2013). El hongo penetra la epidermis de la raíz directamente o a través de las heridas, atravesando la corteza y la endodermis. Una vez establecido en el hospedero se translocan hacia los vasos xilemáticos produciendo la oclusión del sistema vascular de la planta (Ocaña-López, 2013). El propágulo puede transmitirse mediante plántulas infectadas, semillas contaminadas o herramientas utilizadas en suelos ya infestados por clamidosporas de *F. oxysporum*, las cuales pueden sobrevivir por periodos largos que superan los 10 años (Ocaña-López, 2013).

Esta especie de hongo se caracteriza por tener un micelio de crecimiento rápido cuya coloración va del blanco a púrpura, incluso pueden tener pigmentaciones naranjas en la periferia del crecimiento constituido por tres tipos de esporas: microconidios, macroconidios y clamidosporas (Salazar et al., 2020). En la Figura 1, se puede observar el crecimiento micelial del hongo en medio de cultivo PDA a los 7 días de su inoculación.

Los síntomas en la planta se pueden presentar desde la plántula, al inicio de la floración o durante la formación de los primeros frutos. Los síntomas comienzan con un amarillamiento en las hojas jóvenes, seguido de un marchitamiento que puede derivar en la muerte de la planta completa (Agrios, 2013). Otro síntoma característico en el interior de las plantas es la necrosis de los tejidos del xilema, la cual avanza desde la parte inferior hasta la parte más alta de la planta (Ortiz & Hoyos, 2013). La marchitez causada por este hongo es el resultado de la combinación de diversas actividades fisiológicas, como la acumulación del micelio en el tejido vascular, la producción de micotoxinas, así como la detención de la defensa de la planta hospedante (Vázquez-Ramírez et al., 2017).

La incidencia de la marchitez vascular incrementa cuando las condiciones de humedad son altas o cuando las plantas crecen dentro de invernaderos (por las temperaturas

cálidas) (Ascencio-Álvarez et al., 2008). El desarrollo óptimo de *F. oxysporum* varía de los 12 a los 28 °C y crece mejor en suelos ácidos, arenosos, con bajo pH, pobres en nitrógeno y alto suministro de potasio (Ascencio-Álvarez et al., 2008).

Fusarium verticillioides

Fusarium verticillioides es un hongo patógeno que afecta principalmente la producción mundial del maíz. Es miembro de uno de los géneros fitopatógenos más importantes. Se trata de un patógeno necrótrofo que puede alternar su estilo de vida como saprófito ya que sobrevive en el rastrojo (De La Torre et al., 2014).

Es un hongo sin hospedero específico pues afecta a un gran número de gramíneas, así como algunas leguminosas; se puede encontrar en maíz, sorgo, trigo, avena, arroz, frijol, y en hortalizas tales como jitomate y pimiento verde. La marchitez causada por *F. verticillioides* es difícil de controlar por métodos convencionales, por lo que se tiene un gran potencial para el control biológico de esta enfermedad (Deketelaere et al., 2017).

Inicialmente produce micelios blancos que después se tornan violeta. En la Figura 1 se puede observar el desarrollo micelial del hongo en el medio de cultivo PDA a los 7 días de su inoculación. Los macroconidios son largos, delgados, rectos y de paredes delgadas, mientras que los microconidios forman largas cadenas y son muy abundantes. Las clamidosporas se encuentran ausentes en esta especie (Sreenivasa et al., 2017).

Esta especie se puede presentar en campo, en todas las partes de la planta y actúa invadiendo la planta de manera asintomática y también generando síntomas del daño, cuando la planta ya ha sido afectada es muy notorio, pero esto está relacionado con todas las condiciones ambientales y fisiológicas del cultivo (Gesteiro, 2018). Puede causar daño en todas las etapas del cultivo, puede atacar las plantas en su follaje y raíces; provoca una gran cantidad de síntomas, desde manchas foliares hasta marchitez y pudrición de los esquejes, la copa, el bulbo y hasta de la raíz; los síntomas que presentan las plantas afectadas son patrones de rayas blancas en el pericarpio para el caso del maíz, el tallo también puede mostrarse esponjoso cuando se aprieta y pueden aplastarse en los nudos inferiores, las plantas llegan a tumbarse cuando las empuja el viento (Figuroa-Rivera et al., 2010). Al principio de la enfermedad puede ser reversible; sin embargo, puede ser permanente hasta que la planta se seca y muere (DGSV-CNRF, 2020). La presencia de *F. verticillioides* puede verse favorecida

en un amplio rango de temperaturas que oscilan de los 22 y 37 °C, por lo que resulta ser un factor determinante en la incidencia de dicho patógeno (Castro, 2003).

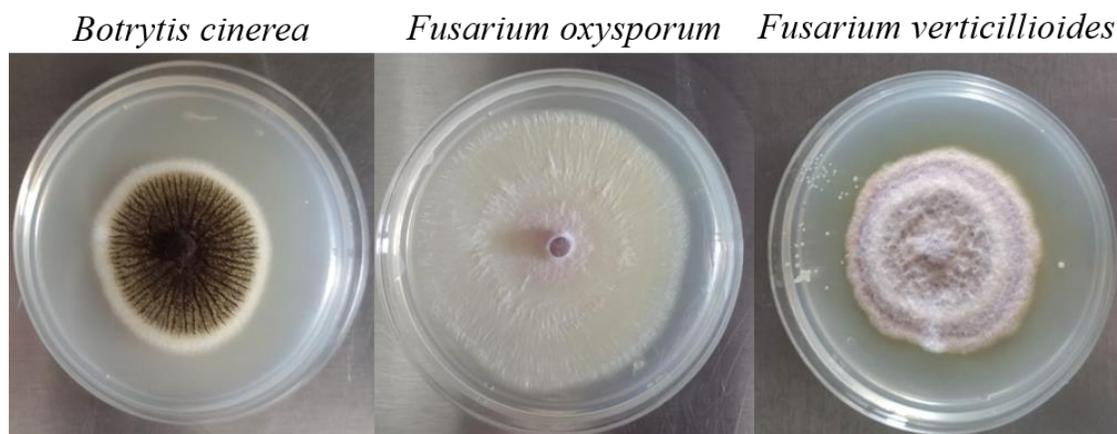


Figura 1. Desarrollo micelial de los hongos fitopatógenos

Crecimiento micelial de *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium verticillioides* en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar a los 7 días de su inoculación. (Autoría propia).

1.3. Manejo de enfermedades

Definición

El manejo de las enfermedades de plantas tiene como objetivo controlar y reducir la incidencia de patógenos de importancia agronómica (Bettioli, 2006). El control de enfermedades más utilizado hasta la actualidad es el químico por su rapidez y eficiencia de acción; no obstante, esto ha contribuido a problemas de contaminación ambiental, que impacta negativamente en la diversidad de los agroecosistemas, y en la salud humana (del Puerto et al., 2014). Esta problemática ha llevado a la búsqueda de otras técnicas de manejo menos residuales y controversiales para la salud humana y medio ambiente (Zavaleta, 1999).

Clasificación

En el manejo de enfermedades de las plantas se debe de tomar en cuenta el control del patógeno y el manejo de la planta hospedante, los métodos de control se clasifican de acuerdo con la causa y desarrollo de la enfermedad. De acuerdo a la propuesta por Archicanoy, (2001) se clasifican de la siguiente manera:

Reglamentario

Este método se trata de las disposiciones legales emitidas, cuyo fin es excluir los patógenos de sus hospederos o de un área determinada, estas medidas son la realización de cuarentenas, inspección y certificación (Achicanoy, 2001). La certificación es uno de los más importantes, ya que es el primer paso para asegurarse que el material biológico esté sano y libre de agentes patógenos (Casas, 2011). El enfoque reglamentario se basa en la exclusión o en el uso de una cuarentena para prevenir la propagación de una enfermedad a nuevas áreas (Hosak & Miller, 2017).

Cultural

La salud de una planta está muy influenciada por la forma en que se trata a medida que crece (Ferreira, 1998). Este método hace referencia a las prácticas agronómicas de manipulación directa con el agroecosistema con el fin de disminuir el daño que pueden causar las enfermedades en el cultivo recurriendo a modificaciones o cambios que desfavorezcan las fases de las enfermedades (Ocaña-López, 2013). Las estrategias culturales de manejo de enfermedades son de las más antiguas y evitan que se desarrollen las condiciones para que se establezcan enfermedades y otras plagas (Hosak & Miller, 2012). El control cultural se basa en las labores del cultivo, su objetivo es evitar que el patógeno establezca relación con el hospedero, algunas de estas técnicas de control cultural son la rotación de cultivos y el saneamiento (Casas, 2011). El control de malezas es un método cultural muy importante ya que a menudo albergan patógenos y también compiten con el cultivo (Ferreira, 1998).

Genético

Consiste en aprovechar la capacidad de ciertos cultivos para resistir o soportar el ataque de enfermedades mediante el uso de mejoramiento genético. El mejoramiento para la resistencia a las enfermedades utiliza la genética para prevenirlas, muchos cultivos y especies de plantas se mejoran para resistir enfermedades, creando un nuevo cultivar o variedad que proporciona un mejor rendimiento (Hosak & Miller, 2012). La aplicación de la ingeniería genética para mejorar la resistencia de cultivos a plagas o patógenos ha abierto un sinfín de posibilidades para su control (Serrano & Galindo, 2007).

Biológico

El control biológico es el empleo de organismos que actúan como enemigos naturales de una plaga o patógeno, con finalidad de reducir o eliminar sus efectos dañinos en las

plantas; puede erradicar total o parcialmente la incidencia de enfermedades (Serrano & Galindo, 2007).

Los organismos antagónicos, desde el punto de vista biológico, son aquellos que para sobrevivir son capaces de desarrollar mecanismos que les permiten establecer relaciones de competencia con otros organismos indeseables (García, 2022). Los microorganismos como bacterias, levaduras y hongos se han implementado como antagonistas, por su capacidad de ejercer efecto de control biológico sobre diversos patógenos de interés (Hernández-Lauzardo et al., 2007).

Los hongos antagonistas resultan una parte importante dentro del control biológico de fitopatógenos, en este sentido distintas especies del género *Trichoderma* son de las más utilizadas para el manejo biológico de fitopatógenos del suelo (Infante et al., 2009).

Los antagonistas contribuyen a la disminución de los daños que causan las enfermedades, para lograr este objetivo los microorganismos benéficos presentan diferentes modos de acción que les permiten ejercer su efecto biorregulador, su capacidad de multiplicarse abundantemente es uno de los atributos más importante para su selección como agentes de control biológico (Infante et al., 2009).

Físico

Consiste en remover o destruir las partes de la planta que se encuentren infestadas, así como la destrucción de las malezas que se encuentran dentro del terreno, por medio de herramientas mecánicas o algunas técnicas manuales. En este método son utilizadas las medidas que hacen uso de temperaturas altas o bajas, así como el uso de las radiaciones, como son la pasteurización, acolchado, solarización o la termoterapia (Casas, 2011).

Químico

Se trata de un método muy eficiente para erradicar la incidencia de patógenos en los cultivos, basado en el uso de sustancias tóxicas para controlarlas. El control químico ha sido de gran importancia para prevenir pérdidas producidas por enfermedades de las plantas, principalmente con el desarrollo de fungicidas de acción específica (Hirooka & Ishii, 2013). En la agricultura actual, el control químico es fundamental. Para algunos cultivos son necesarias aplicaciones preventivas programadas de plaguicidas, pero para la mayoría de los cultivos, el productor debe realizar inspecciones periódicas de las plantas y tratarlas sólo

cuando la enfermedad es observada, el uso de sustancia químicas nocivas requiere de conocimiento técnico para su uso adecuado (Ferreira, 1998).

Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades

El Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades (MIP) consiste en realizar diferentes prácticas de control de plagas y enfermedades con el menor impacto ambiental y en la salud de los humanos posible (Vivas-Carmona, 2017).

El MIP constituye un conjunto de técnicas enfocadas al control de plagas y enfermedades, realizando un manejo eficaz y amigable con el ambiente, el MIP combina las diferentes técnicas de control y propone un uso responsable y adecuado de las mismas (FAO, s. f.). Su principal objetivo es minimizar los riesgos para la salud humana y el medio ambiente haciendo énfasis en conseguir un cultivo saludable con la menor agresión a los agroecosistemas y fomentar los mecanismos naturales de manejo. No es el único método de manejo integrado, sino que hace referencia una serie de acciones con distintos niveles (Fig. 2).



Figura 2. Pirámide del Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades

Niveles de aplicación para las estrategias del manejo integrado de plagas y enfermedades (Autoría propia).

1.3.1. *Trichoderma* como organismo antagónico

El género de *Trichoderma* incluye especies que se consideran benéficas para las plantas, habitan naturalmente en el suelo y se caracterizan por su comportamiento saprófito y parásito (González-León et al., 2022).

Trichoderma es un hongo cosmopolita, su importancia radica en la capacidad que tiene para adaptarse a distintos entornos y a la alta producción de metabolitos como enzimas, compuestos promotores de crecimiento vegetal y compuestos volátiles, entre otros de interés biotecnológico y ambiental (Hernández-Melchor et al., 2019).

La reproducción de *Trichoderma* es asexual o sexual, produce tres tipos de propágulos: las hifas, los conidios y las clamidosporas. La mayoría de las colonias son aterciopeladas generalmente verdes y dispuestas en crecimiento radial con diferentes tonalidades, determinadas por el color de las esporas (González-León et al., 2022). En la Figura 3 se observa el desarrollo micelial de *T. asperellum* y *Trichoderma* sp. a los 7 días de su inoculación.

Las especies del género *Trichoderma* predominan dentro del ecosistema terrestre tienen un bajo requerimiento nutrimental, es un hongo con una alta capacidad de tolerancia en un amplio rango de temperatura que oscila de los 20 a los 35 °C (Hernández-Melchor et al., 2019).

Este hongo es altamente utilizado como agente controlador de hongos fitopatógenos ya que cuenta con múltiples mecanismos de acción como la antibiosis, la competencia por espacio o nutrientes, el micoparasitismo y la producción de metabolitos secundarios. Entre las especies más destacadas se encuentran *T. harzianum* y *T. asperellum* (González-León et al., 2022).

La acción biocontroladora del género *Trichoderma* se da por diferentes mecanismos de acción que regulan el desarrollo de los hongos fitopatógenos, los mecanismos de acción que realiza pueden ser directos e indirectos (Infante et al., 2009).

Los mecanismos indirectos por los que el género *Trichoderma* impiden la colonización del organismo fitopatógeno incluyen la activación de mecanismos de defensa de la planta inducidos por la interacción con las especies de este grupo (Infante et al., 2009).

Por otra parte, la acción directa que realiza *Trichoderma* incluye la competencia por nutrientes y espacio, la antibiosis y el micoparasitismo, en este último proceso ocurre una

simbiosis antagónica entre organismos en donde las especies de este hongo se desarrollan quimiotrópicamente sobre el hospedante (Ezziyyani et al., 2004).

Se ha demostrado que el género actúa como biocontrolador de un amplio rango de hongos fitopatógenos, transmitidos por el aire o por el suelo (Guédez, 2009). Se ha usado contra enfermedades de interés como pudriciones causadas por *Fusarium* y *Botrytis* (Guédez, 2009).

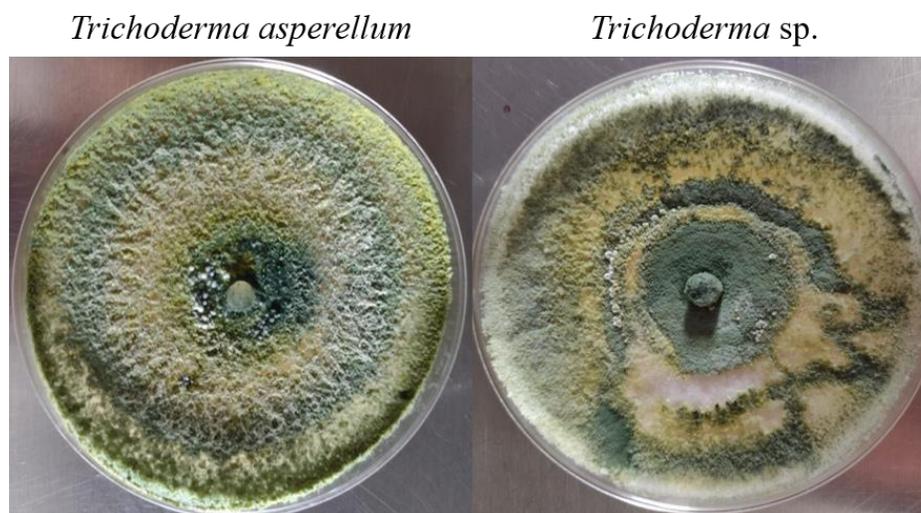


Figura 3. Desarrollo micelial de especies de *Trichoderma*

Imagen representativa del desarrollo micelial de *T. asperellum* y *Trichoderma* sp. en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar a los 7 días de su inoculación (Autoría propia).

1.3.2. Extractos vegetales

Los fitoquímicos corresponden a metabolitos secundarios sintetizados por las plantas que son responsables de proteger a las plantas frente a distintos tipos de estrés, tanto biótico como abiótico, incluyendo infecciones, depredadores, radiación ultravioleta, estrés hídrico o salino, además de entregarles colores y sabores a frutas y verduras (Gasaly et al., 2020). Los compuestos fitoquímicos que están presentes en los extractos vegetales poseen gran variedad estructural, incluyendo terpenos, ácidos fenólicos y alcaloides, lo que contribuye a combatir plagas y enfermedades en diferentes cultivos, y a estimular la tolerancia en las plantas ante distintos factores (Felix, 2018).

Definición

Los extractos vegetales son preparados concentrados con consistencia líquida, sólida o intermedia, que se obtienen de la manipulación de material vegetal mediante algún proceso

específico como la maceración o fermentación (Carrión & García, 2010). Los extractos vegetales contienen una gran cantidad de compuestos fitoquímicos que provienen del metabolismo secundario de plantas cuya eficacia para controlar o erradicar la presencia de agentes patógenos depende de la especie, variedad, así como del método de extracción (INIFAP, 2022).

Los extractos de plantas cumplen un papel muy importante en la agroecología, por el beneficio al medio ambiente cuando son usados como alternativa para el tratamiento de enfermedades infecciosas en las plantas causadas por organismos fitopatógenos (Jimenez & Mosquera, 2014).

Los metabolitos secundarios (MS) de las plantas, constituyen una amplia gama de moléculas biológicamente activas que tienen múltiples acciones farmacológicas como antimicrobianas, estimulantes, analgésicas, antihelmínticas, anticoagulantes, antiacné y antioxidantes, entre otras (Dey et al., 2020).

Principales metabolitos secundarios

Compuestos fenólicos:

Son un conjunto de moléculas que se encuentran de forma natural en las plantas. Su estructura consiste en uno o varios anillos bencénicos sustituidos al menos con un hidroxilo; constituyen el principal grupo de metabolitos secundarios presentes en las plantas. En la Figura 4 se muestra la estructura química de dichos compuestos (Santamaría-Gómez et al., 2018). Los compuestos fenólicos poseen diferentes grupos de hidroxilos y difieren en su ubicación en la molécula, depende de esto si son mono, di o polifenoles (Babenko et al., 2019).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios esenciales durante el crecimiento y reproducción de las plantas; actúan como agentes protectores frente a patógenos o factores abióticos; tienen una importancia fisiológica y morfológica para las plantas, ya que poseen propiedades como antioxidantes y antimicrobianos (Balasundram et al., 2006). El contenido de sustancias fenólicas presenta una alta correlación con su capacidad antioxidante (Gaviria et al., 2012). Pueden reducir la severidad causada por algunos organismos patógenos (Zárate-Martínez et al., 2021). La participación de los compuestos fenólicos es tan importante en la vida de las plantas que llegan a formar parte de

la fotosíntesis, de la respiración y en el desarrollo de soporte en las células y sus tejidos (Babenko et al., 2019).

Existe una clasificación general de los compuestos fenólicos, la cual los divide en cinco categorías: Ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzónicos y ácidos hidroxinámicos), Estilbenos, Quinonas, Flavonoides (flavonas, flavonoles, antocianinas e isoflavonas) y Taninos (Santamaría-Gómez et al., 2018).

Alcaloides:

Los alcaloides son un conjunto de compuestos químicos naturales, comprenden átomos de nitrógeno básicos (Dey et al., 2020). Estos metabolitos son un mecanismo de defensa contra microorganismos fitopatógenos, herbívoros y contra otras especies de plantas que causan competencia (Wink, 2003). Se trata de toxinas naturales que las plantas biosintetizan en su metabolismo secundario como un mecanismo de defensa (ACSA, 2020). Conforman uno de los grupos de metabolitos secundarios más diversos encontrados en los organismos vivos, que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica; la mayoría son heterocíclicos, aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) (Ávalos & Pérez-Urria, 2009).

Este grupo de MS está formado por una gran variedad y son frecuentes en las plantas que pertenecen a las familias: Annonaceae, Amaryllidaceae, Berberidaceae, Boraginaceae, Liliaceae, Leguminosae, Lauraceae, Loganiaceae, Magnoliaceae, Papaveraceae, Piperaceae, Rutaceae, Rubiaceae, Ranunculaceae, Solanaceae, etc (Dey et al., 2020).

El grupo de los alcaloides comprende aproximadamente 12,000 especies químicas. Se agrupan a una gran variedad de constituyentes químicos, por lo que estos metabolitos se han estructurado de acuerdo con su origen biogénico; con base en esta clasificación se tienen cuatro grupos: Alcaloides derivados de aminoácidos tales como ornitina/arginina, lisina, histidina, fenilalanina/tirosina, triptófano, y del ácido antranílico y el ácido nicotínico; Alcaloides purínicos; Terpenos aminados y Alcaloides policétidos (Loyola-Vargas et al., 2004).

La estructura de los alcaloides se clasifican en función de los anillos presentes en su molécula, algunas de sus clases son indol, isoquinolina, tropano, piperidina y purina (Ávalos

& Pérez-Urria, 2009), en la Figura 4 se pueden observar algunas de las estructuras bases de los alcaloides.

Terpenos:

Constituyen el grupo más numeroso de MS (Ávalos & Pérez-Urria, 2009). Los terpenos son los metabolitos secundarios que le dan las características organolépticas a las plantas y que constituyen la mayor parte de los aceites esenciales producidos por las plantas aromáticas, así como se le atribuye un papel en la defensa contra insectos y patógenos (Carrión & García, 2010).

La estructura química de este tipo de moléculas consiste en unidades repetitivas de isopreno, que son unidades básicas de construcción en la biosíntesis de los terpenos (Fig. 4); esta estructura les confiere propiedades únicas y les permite realizar diferentes funciones biológicas (Feliu, 2023). Se clasifican según al número de unidades isopreno presentes en su estructura química: Hemiterpenos (1 unidad), Monoterpenos (2 unidades), Sesquiterpenos (3 unidades), Diterpeno (4 unidades), Sesterterpenoides (5 unidades), Triterpenos (6 unidades), Tetraterpenos (8 unidades) y Politerpenos (>8 unidades) (Feliu, 2023).

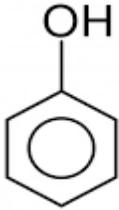
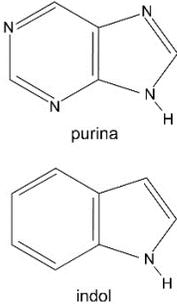
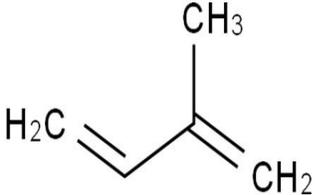
	 <p style="text-align: center;">purina</p> <p style="text-align: center;">indol</p>	
<p>Estructura química de los compuestos fenólicos.</p>	<p>Estructura química de algunos grupos de alcaloides.</p>	<p>Estructura química de los terpenos.</p>

Figura 4. Estructura química de los principales grupos de metabolitos secundarios

(Santamaría-Gómez et al.,2018), (Ávalos & Pérez-Urria, 2009) y (Dey et al., 2020)

II. ANTECEDENTES

El género *Trichoderma* se considera como uno de los mejores hongos biocontroladores, esto se debe a diversas causas: en primer lugar, tiene un fuerte potencial antagonico frente a diversos hongos causantes de grandes daños en diversos cultivos, en segundo lugar porque desarrolla una gran variedad de mecanismos de acción antagonica para atacar a hongos patógenos y en tercer lugar no es considerado como un hongo fitopatógeno (González-León et al., 2022).

Para el control de enfermedades de importancia agrícola se han utilizado técnicas biorreguladoras como el antagonismo de microorganismos (Sánchez-García et al., 2017). Diversos estudios han mostrado que *Trichoderma* es un excelente controlador para fitopatógenos (Tabla 1).

Tabla 1. Especies de *Trichoderma* frente a enfermedades de interés agrícola

Especie	Patógeno	Porcentaje de inhibición	Referencia
<i>T. asperellum</i>	<i>F. oxysporum</i>	83.28	Sánchez-García et al., 2017
	<i>F. verticillioides</i>	81.5	
	<i>B. cinerea</i>	56.15	Grados-Moreyra, 2022
<i>T. harzianum</i>	<i>F. oxysporum</i>	75.91	Sánchez-García et al., 2017
	<i>F. verticillioides</i>	80.09	
	<i>B. cinerea</i>	62.05	Geng et al., 2022

Por otro lado, los extractos vegetales son una buena alternativa en el control de enfermedades en plantas, al contar con propiedades antifúngicas debido a la presencia de diversos metabolitos secundarios (Tucuch-Pérez et al., 2021). En la actualidad el uso de extractos ha ido en aumento por sus diversas aplicaciones, entre ellas en el manejo de enfermedades de interés agrícola (Tabla 2).

Tabla 2. Extractos vegetales frente a enfermedades de importancia agrícola

Planta (tejido)	Solvente	Porcentaje de inhibición	Patógeno	Referencia
<i>Larrea tridentata</i> (hoja)	Etanol Agua	66 26.3	<i>Botrytis cinerea</i>	Martínez- Hernández, 2017
<i>Origanum vulgare</i> (hoja)	Etanol Agua	72.66 26.66		
<i>Agave lechuguilla</i> (hoja)	Etanol Agua	63 12		
<i>Agave lechuguilla</i> (raíz)	Etanol Agua	92.66 23.3		
<i>Azadirachta indica</i> (hoja)	Metanol	31.58		
<i>Allium cepa</i> (bulbo)	Metanol	31	<i>Fusarium oxysporum</i>	Abdulle et al., 2022
<i>Allium sativum</i> (bulbo)	Metanol	28.3		
<i>Zingiber officinale</i>	Metanol	23.53		
<i>Vitex mollis</i> (tallos y hojas)	Metanol Agua	91 62	<i>Fusarium verticillioides</i>	Valencia-Botin et al., 2018
<i>Jacquinia macrocarpa</i>	Metanol	56.3		Fimbres-López, 2010
<i>Allium sativum</i>	Etanol	100		Apaza Lopez & Solis Aquino, 2019
<i>Allium cepa</i>	Etanol	100		

La especie *A. salmiana*, reconocido como “maguey pulquero” es una especie endémica de México, perteneciente a la familia Asparagaceae. En el país se encuentra distribuido principalmente en los estados de Hidalgo, Tlaxcala, Estado de México y Puebla (SIAP, 2018). Son plantas perenes de hojas anchas, fuertes y suculentas, llegando a medir hasta 3. 40 m de altura y 5 m de diámetro, el punto de maduración fisiológica se considera a partir de los 8 años (García-Núñez et al., 2020).

En México el *Agave*, se ha considerado como una planta con propiedades medicinales (Paneque et al., 2019). Se ha utilizado en la fabricación de fibras textiles, en la gastronomía, como plantas ornamentales y principalmente como materia prima para la elaboración de bebidas alcohólicas, tales como el tequila, mezcal y pulque (Lappe-Oliveras et al., 2008). La especie de *A. salmiana* ha sido especialmente usada en la gastronomía como ingrediente esencial de platillos típicos, así como elemento básico en la producción de la bebida de los dioses el “Pulque”.

La planta de *A. salmiana* se ha utilizado tradicionalmente como agente antihelmíntico y como insecticida para mosquitos y para la elaboración de extractos, que han sido evaluados como agentes antimicrobianos en algunas regiones de México. El extracto alcohólico de hojas de *A. salmiana*, ha demostrado tener efecto antimicrobiano frente a las bacterias *S. aureus* y *E. faecalis* (Cavazos-Cortés et al., 2018). Por otra parte, el extracto de flores de *A. salmiana*, ha mostrado su efecto antimicrobiano frente a las bacterias *E. coli* y *Shigella sonnei* (Bernardino-Nicanor et al., 2018). Durante las últimas décadas han impulsado el análisis del uso de algunas especies de *Agave* como posible materia prima en la elaboración de compuestos bio-activos, algunas de estas especies son: *A. tequilana*, *A. scabra*, *A. lechuguilla*, *A. americana* y *A. salmiana* (Tabla 3).

Tabla 3. Extractos de *Agave* utilizados en el manejo de hongos fitopatógenos

Extracto	Patógeno	Referencias
<i>Agave americana</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Morales-Ventura, 2022
<i>Agave lechuguilla</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Martínez-Hernández, 2017
<i>Agave scabra</i>	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium spp.</i> y <i>Penicillium spp.</i>	González-Álvarez et al., 2015

III. JUSTIFICACIÓN

La producción agrícola es la actividad más importante para el abastecimiento de la alimentación humana y animal. La creciente demanda de cultivos para satisfacer las necesidades alimenticias ha dado lugar a la intensificación de la producción agrícola, que se ha logrado por el incremento en el uso de insumos químicos. Si bien, estos procesos han contribuido al aumento considerable de la productividad agrícola, también lo ha sido para la incidencia de enfermedades agrícolas, ya que diferentes organismos patogénicos han incrementado una tolerancia a los agentes químicos de control trayendo consigo una reducción de la producción anual de alimentos en el mundo en niveles del 10 al 40% (Tyśkiewicz et al., 2022).

El uso intensivo de agroquímicos destinados al control de malezas, plagas y enfermedades ha provocado graves problemas para la salud humana y medio ambiente. Actualmente, se estima que el control de las malezas, plagas y enfermedades ha reducido al menos el 25 % de la biodiversidad total mundial y ha provocado aproximadamente 385 millones casos de envenenamientos involuntarios no mortales y 11,000 de muertes (ONU, 2020). Es por ello, que resulta imperante y emergente implementar nuevas y mejores alternativas para su manejo.

Una alternativa para el manejo de las enfermedades de las plantas, amigable con el ambiente y la salud humana, es el control biológico. Como parte de esta estrategia se han usado diferentes organismos antagonistas a los fitopatógenos como son las especies del género de *Trichoderma*, las cuales tienen una rápida velocidad de colonización que, en muchas ocasiones, resulta mayor que la de los hongos patógenos. Además, los agentes biocontroladores también tienen la capacidad de sobrevivir bajo condiciones ambientales extremas que los convierte en una alternativa con gran potencial para el manejo de enfermedades de los cultivos.

Asimismo, en los últimos años se ha implementado el uso de extractos vegetales en el control de organismos fitopatógenos, ya que al contener metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas, antivirales y repelentes resultan muy efectivos. El control de enfermedades mediante el uso de extractos vegetales no produce residuos peligrosos para el

consumidor; a largo plazo suelen ser más efectivos que los controladores sintéticos, pues no desarrollan resistencia que al efecto antifúngico a los productos.

Ante la necesidad de encontrar nuevos métodos que sustituyan el control químico y que sean eficientes en el control de enfermedades de importancia agrícola, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antifúngico del extracto de *Agave salmiana* y la interacción antagonista de dos especies del género *Trichoderma* sobre los hongos fitopatógenos *B. cinerea*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides*.

En la realización del experimento se espera que las estrategias agroecológicas de antagonismo y el uso de extractos naturales, inhiban en porcentajes considerables el desarrollo micelial de hongos fitopatógenos de importancia agrícola.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la eficiencia del uso de organismos antagonicos del género *Trichoderma* y del extracto de *Agave salmiana* sobre la inhibición del crecimiento *in vitro* de tres hongos fitopatógenos de interés agrícola.

Objetivos Específicos

- Determinar la actividad antagonica de *T. asperellum* sobre los hongos fitopatógenos *B. cinerea*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides* mediante ensayos *in vitro*.
- Medir la capacidad antagonica de *Trichoderma* sp. frente a los hongos fitopatógenos *B. cinerea*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides* por medio de ensayos *in vitro*.
- Evaluar mediante ensayos *in vitro* la actividad antifúngica del extracto de *Agave salmiana* sobre los hongos fitopatógenos *B. cinerea*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides* y sobre las especies de *Trichoderma*.
- Identificar los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en el extracto de *Agave salmiana*.

V. HIPÓTESIS

Las estrategias de antagonismo de *Trichoderma* y el uso de extracto de *Agave salmiana* tendrán una alta capacidad inhibitoria sobre el crecimiento *in vitro* de los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium verticillioides*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

6.1.1. Organismos fúngicos

Las cepas de los agentes fúngicos utilizados (especies antagonistas y hongos fitopatógenos) se obtuvieron del cepario, perteneciente al Laboratorio de Fitopatología y Plagas del Instituto de Ciencias Agropecuarias.

Para su reactivación en placas de Petri con medio de cultivo PDA, se llevó a cabo la inoculación de los hongos, conservados en condiciones de crioconservación. Se colocaron 10 μ L de la suspensión fúngica y se incubó a 28 °C durante 7 días para su posterior uso experimental.

6.1.2. *Agave salmiana*

Zona de colecta

La colecta del material biológico se llevó a cabo en la localidad San Juan Hueyapan, perteneciente al municipio de Cuauhtepic de Hinojosa, estado de Hidalgo, localizada a una altitud de 2258 msnm entre los 20° 1' 48.694" de latitud norte y 98° 16' 52.645" de longitud oeste, se ubica a una distancia aproximada de 2.9 kilómetros de la cabecera municipal.

Técnica de colecta

De individuos de *A. salmiana*, se seleccionaron hojas sin plagas ni enfermedades, de cada una se tomaron muestras de 25 cm de largo aproximadamente con la ayuda de una navaja y tijeras de poda previamente desinfectadas (Alcohol etílico al 70%). Las muestras se colocaron en bolsas herméticas para su posterior traslado al Laboratorio de Fitopatología y Plagas del Instituto de Ciencias Agropecuarias.

6.2. Preparación del extracto de *Agave salmiana*

Previo a la preparación del extracto, se registró el peso húmedo de la muestra de la hoja. Posteriormente se cortó en trozos de 5 cm aproximadamente y se colocó sobre papel periódico para secar a temperatura ambiente durante un mes. Después del secado se pesó nuevamente la muestra y posteriormente se molió homogéneamente en una licuadora hasta la obtención de un polvo fino.

Se tomó la muestra pulverizada y se llevó a una solución de Metanol al 80 % para dar una proporción 1:4 (muestra: solvente). Se dejó macerar por 48 h a temperatura ambiente evitando el contacto con la luz. Transcurrido el tiempo, se llevó a cabo el filtrado de la solución del extracto. El procedimiento se realizó por triplicado hasta obtener una mezcla acuosa.

Después del filtrado se llevó a un evaporador rotativo a una temperatura de 40 °C, para separar el extracto del solvente. Posteriormente se secó a 40 °C por 48 h. El extracto se colocó en viales de vidrio, evitando la exposición a la luz y se conservó en un desecador hasta su uso experimental.

Rendimiento del extracto

Terminado el secado del extracto se pesó en una balanza analítica y se determinó el rendimiento (%R) del extracto, utilizando la siguiente fórmula.

Ecuación 1

$$\% R = \frac{\text{Peso del extracto (g)}}{\text{Peso seco del material vegetal (g)}} \times 100$$

6.3. Pruebas antagónicas

Para las pruebas de antagonismo se usaron dos especies de *Trichoderma* como biocontroladores y tres cepas de hongos fitopatógenos: *B. cinerea*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides*.

El ensayo consistió en colocar un disco micelial de 6 mm de diámetro aproximadamente de cada hongo a enfrentar en los polos opuestos de la caja Petri que contenía al medio de cultivo PDA, manteniendo una distancia de 3 cm entre cada disco de crecimiento micelial. La incubación se realizó a 28 °C durante 7 días. Se realizaron 5 repeticiones para cada caso y como control absoluto se consideraron cajas que solo contenían el hongo patógeno.

6.4. Crecimiento de hongos con extracto de *Agave salmiana*

Para determinar la actividad antifúngica de extracto de *Agave salmiana*, se utilizó el método de envenenamiento del medio de cultivo.

El ensayo consistió en preparar medio de cultivo PDA con el extracto a diferentes concentraciones (Tabla 4), posteriormente se colocó de forma independiente un disco de agar

de 6 mm de diámetro aproximadamente con crecimiento micelial de los hongos: *T. asperellum*, *Trichoderma* sp., *F. oxysporum*, *F. verticillioides* y *B. cinerea*. Los tratamientos usados como testigos fueron el control absoluto o negativo (medio PDA sin extracto ni algún otro compuesto) y el control químico o positivo (Fungicida= PDA + Captan).

Tabla 4. Concentración de los tratamientos

Tratamiento	Concentración (mg/mL)
Control negativo (-)	0
Extracto	0.5
	1
	2
	5
Control positivo (+)	0.25

Para cada tratamiento se realizaron 5 repeticiones, se midió el crecimiento radial del micelio a los 7 días posteriores de la incubación para determinar el porcentaje de inhibición en cada tratamiento.

6.5. Cálculo de porcentaje de inhibición

Para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico (% I) usando extracto de *A. salmiana* u hongos biocontroladores, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% I = \frac{(C - T)}{C} \times 100$$

Ecuación 2

Donde C es el radio en mm del patógeno en la caja control y T el radio en mm del patógeno en la caja con tratamiento (Confrontación o envenenamiento con extracto).

6.6. Tamizaje fitoquímico

6.6.1. Detección de flavonoides

En 1 mL de etanol al 96 % se disolvieron 10 mg de extracto, se le añadieron trozos de cinta de magnesio y 2 gotas HCl concentrado. El desarrollo de coloración naranja o roja indicó la presencia de flavonoides.

6.6.2. Detección de quinonas

A 10 mg de extracto se añadió 1 mL de cloroformo concentrado y se adicionó 1 mL de NaOH al 5 % en agua, se mezclaron las fases y se dejó reposar hasta su separación. La coloración roja en la fase alcalina indica la presencia de quinonas.

6.6.3. Detección de saponinas

Se disolvieron 10 mg de extracto en 1 mL de agua destilada, se tapó y se agitó durante 5 minutos. La aparición de espuma indicó la presencia de saponinas.

6.6.4. Detección de aminoácidos

A 10 mg de extracto se añadieron 2 mL de ninhidrina al 2 %, la mezcla se hirvió por 10 minutos. La coloración azul-violeta indicó la presencia de aminoácidos.

6.6.5. Detección de taninos

Se mezclaron 10 mg de extracto con 1 mL de agua destilada y 2 gotas de FeCl_3 al 2 %. La aparición de coloración azul y verde indicó la presencia de taninos.

6.6.6. Detección de compuestos fenólicos

Se diluyeron 10 mg de extracto con 1 mL de etanol al 96 %, más 3 gotas de FeCl_3 al 3% en etanol. La aparición de color verde correspondió a una reacción positiva.

6.6.7. Determinación cualitativa de constituyentes fitoquímicos

Los resultados se reportaron en un sistema de cruces para determinar la presencia de los grupos de MS tomando en cuenta el siguiente criterio:

- Ausencia (-)
- Ligera (+)
- Media (++)
- Abundante (+++)

6.7. Cuantificación de metabolitos secundarios del extracto de *Agave salmiana*

6.7.1. Determinación de fenoles totales

Fundamento

El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que al contacto con cualquier tipo de fenol reaccionan formando complejos. El método se basa en la capacidad que tienen los fenoles de reaccionar con agentes oxidantes. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdicos-fosfotúngstico en óxidos de coloración azul siendo proporcional el color azul respecto al número de grupos de hidroxilo (Cruzado et al., 2013).

Técnica

Para la determinación de fenoles totales, se utilizó el ácido gálico para realizar la curva de calibración estándar. A partir de la solución del ácido gálico (100 mg/L) se realizó una serie de diluciones hasta la obtención de concentraciones que oscilaron de los 0 - 16.25 mg/L. Posteriormente se adicionaron 0.25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N, se agitó y se dejó reposar durante 5 minutos para adicionar 0.750 mL de carbonato de sodio al 20 %, la mezcla se llevó a un volumen final de 2 mL con agua destilada y se dejó reposar durante 2 h a temperatura ambiente en oscuridad.

Para la preparación de las muestras se disolvió 0.1 g de extracto en 50 mL de etanol-agua 1:1, se colocó en baño ultrasónico durante 15 minutos, se tomaron 2 mL de dilución y se centrifugó a $10,000 \times g$ durante 10 minutos. Se utilizó el sobrenadante para la prueba, se usaron 100 μ L, en lugar de la solución de ácido gálico, y se sometió al mismo tratamiento que la curva patrón.

La absorbancia de las mezclas se midió frente al blanco a una longitud de onda de 760 nm, la concentración del contenido total de fenoles en las muestras de prueba se reporta como mg equivalentes de Acido Gálico por cada gramo de peso seco de la planta (mg EAG/g). La determinación se realizó por triplicado.

6.7.2. Determinación de flavonoides

Fundamento

La determinación de flavonoides a base de Cloruro de aluminio ($AlCl_3$), consiste en la formación de un complejo entre el flavonoide y el cloruro de aluminio, tornando una coloración amarillenta. El catión de aluminio forma complejos estables con flavonoides en metanol, en el análisis espectrofotométrico permite un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores y una intensificación de la absorción. De este modo, es posible determinar la cantidad de flavonoides, evitando la interferencia de otras sustancias fenólicas (Amaya-Rodríguez et al., 2013).

Técnica

Para la determinación de flavonoides se utilizó quercetina para realizar la curva de calibración estándar. Se realizó una solución madre de quercetina (5 mg/mL), a partir de ella se realizaron una serie de diluciones utilizando metanol como disolvente (10 - 70 μ g). Se

mezcló por separado una cantidad de 0.6 mL de solución de cada una de las diluciones de quercetina con 0.6 mL de cloruro de aluminio (AlCl_3) al 2%.

Para la preparación de las muestras, se preparó una solución de extracto de 0.01 mg/mL de metanol, se sónico durante 45 minutos, seguido de una centrifugación de $10,000 \times g$ durante 10 minutos. Se tomaron 0.6 mL de la solución y se sometió al mismo tratamiento de la curva de calibración.

Después de mezclar, la solución se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La absorbancia de las mezclas de reacción se midió frente al blanco a una longitud de onda de 420 nm con un espectrofotómetro. La concentración del contenido total de flavonoides en las muestras se reporta como μg equivalentes de Quercetina por cada gramo de peso seco de la planta ($\mu\text{g EQ/g}$). La determinación se realizó por triplicado.

6.7.3. Determinación de capacidad antioxidantes

Fundamento

El DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) es un radical libre caracterizado por poseer un electrón desapareado. Por esta propiedad es muy usado para determinar la actividad antioxidante. Su método consiste en la captación de radicales libres y se basa en la aceptación de un electrón de hidrógeno (antioxidante) que en solución de metanol se torna de un color violeta intenso. El estudio se lee a 517 nm, es la medida a la que el electrón es aceptado cuando el DPPH reacciona con un antioxidante que le dona un átomo de hidrógeno, provocando que el color violeta comience a desvanecerse hasta tornarse de color amarillo, siendo el amarillo un color indicador de las propiedades antioxidantes (Cruzado et al., 2013).

Técnica

Para la determinación de antioxidantes, se utilizó el ácido ascórbico para realizar la curva de calibración estándar. Se realizó una solución madre de ácido ascórbico a $100 \mu\text{g/mL}$. Se preparó una solución a 0.3 mM de DPPH en metanol. La solución se preparó antes de comenzar el ensayo debido a que tiende a degradarse por efecto de la luz y la temperatura. Para la curva de calibración se realizaron 10 puntos de 1-10 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico. A cada punto se le añadieron 0.5 mL de reactivo de DPPH y se llevó a un volumen final de 1.75 mL con metanol.

Se preparó una solución madre del extracto a una concentración de 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A partir de la solución madre se prepararon 5 diluciones que van de los 62.5-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se llevaron a un volumen final de 5 mL con ayuda de metanol.

De cada dilución se tomaron 1.25 mL y se le añadió 0.5 mL de reactivo DPPH. Las mezclas se agitaron y se dejaron reaccionar por 30 minutos en un ambiente oscuro. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm. La concentración del contenido de antioxidante en las muestras de la prueba se calculó a partir del gráfico de calibración reportado como concentración efectiva media μg de extracto/mL de DPPH. La determinación se realizó por triplicado.

6.8. Análisis estadístico

Para las pruebas duales se realizó la prueba de comparación de medias t de student para dos muestras independientes en el software de Excel, mientras que para el envenenamiento de medio de cultivo PDA se utilizó un diseño completamente al azar de un solo factor con 5 tratamientos, incluidos dos testigos y 5 repeticiones por tratamiento, al que se le realizó un análisis de varianza, seguido de pruebas de comparación de medias de Tukey al 5% utilizando el programa Minitab.

VII. RESULTADOS

7.1. Pruebas antagónicas de *T. asperellum* y *Trichoderma* sp. sobre diferentes hongos fitopatógenos

Para determinar la existencia de un efecto antagónico de las especies de *Trichoderma* sobre los hongos fitopatógenos incluidos en este análisis, se llevaron a cabo pruebas de confrontación en cajas Petri que contenían PDA. En la Figura 5A se muestra el efecto inhibitorio *in vitro* de ambas especies de *Trichoderma* sobre el crecimiento de los tres hongos fitopatógenos a los 7 días post-inoculación (dpi). Ambos agentes antagónicos inhibieron considerablemente el desarrollo micelial de los tres hongos fitopatógenos, pues para los tres se inhibió más del 60 %. Los dos hongos antagonistas resultaron excelentes controladores para *B. cinerea* pues produjeron más del 70 % de inhibición, siendo *T. asperellum* el más eficiente para dicho hongo. Para *F. oxysporum* también se obtuvieron inhibiciones de crecimiento que alcanzaron hasta un 75%, siendo *Trichoderma* sp. el más eficiente (Fig. 5B). Para *F. verticillioides* ambas especies de *Trichoderma* inhibieron cerca del 60 % de su crecimiento, sin que se observaran diferencias significativas entre ambas especies antagonicas.

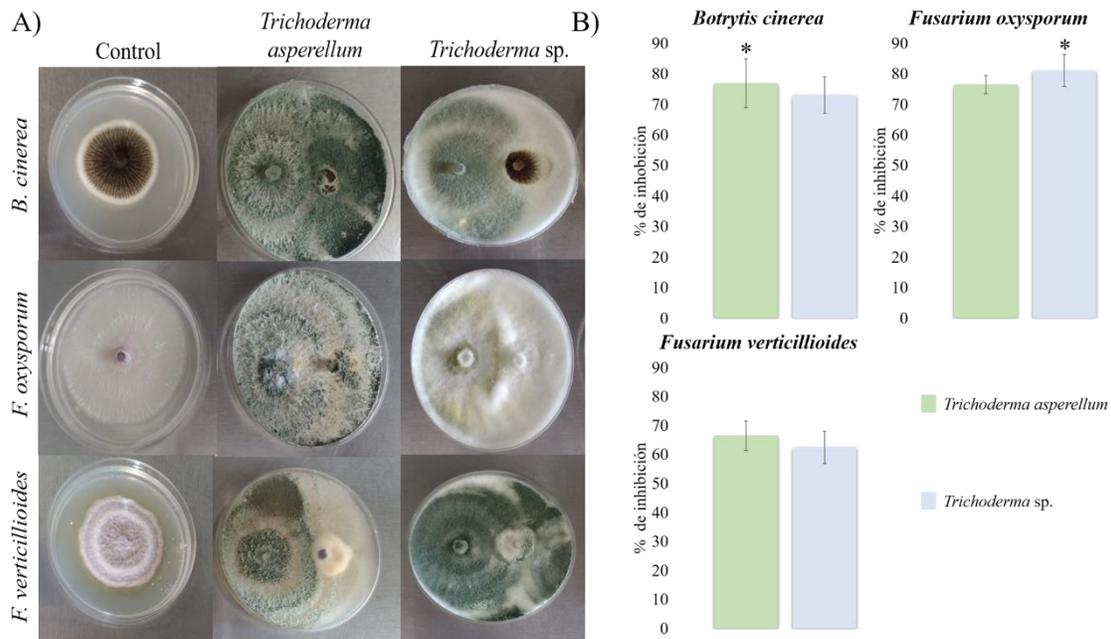


Figura 5. Capacidad antagónica de *T. asperellum* y *Trichoderma* sp. frente a distintos hongos fitopatógenos

A) Fotografía representativa de pruebas antagónicas bajo condiciones *in vitro* de dos cepas antagónicas de *Trichoderma* frente a distintos hongos fitopatógenos a los 7 dpi. El experimento se realizó por quintuplicado. B) Gráficas comparativas del porcentaje de inhibición de *T. asperellum* y *Trichoderma* sp. sobre los hongos patógenos *B. cinerea*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides*. Las columnas de la gráfica muestran el promedio del porcentaje de inhibición y las barras la desviación estándar de los 5 experimentos independientes. Los asteriscos sobre las barras indican una diferencia estadística significativa entre tratamientos de acuerdo con la prueba de medias *t* de student ($p < 0.05$).

7.2. Suplementación del medio de cultivo PDA con extracto de *Agave salmiana*

7.2.1. Efecto del extracto de *A. salmiana* sobre *Botrytis cinerea*

Para determinar la capacidad de inhibición del extracto de *A. salmiana* sobre el crecimiento del hongo patógeno *B. cinerea*, se realizó la suplementación del medio de cultivo PDA con el extracto, a diferentes concentraciones. El experimento incluyó el análisis de un control absoluto negativo (-), con ausencia del extracto, y un control positivo (+), con ausencia del extracto, pero adición captan como fungicida comercial. La inhibición del crecimiento fúngico se determinó a los 7 dpi.

Como se observa en la Figura 6A, el extracto de *A. salmiana* tuvo un considerable efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *B. cinerea* respecto al control negativo (-), mientras que el control positivo (+) superó la inhibición que se obtuvo con el extracto. La inhibición del desarrollo micelial fue dependiente de la concentración de extracto utilizada, siendo estadísticamente diferente en cada una de las concentraciones evaluadas del extracto, en la concentración más alta se alcanzó hasta un 56% de inhibición (Fig. 6B).

En la figura podemos observar que las concentraciones 0.5, 1 y 2 mg/mL el desarrollo micelial del hongo no fue radial sino en diferentes colonias de propágulos, esto se debe a la dispersión de esporas en el medio de cultivo PDA a diferencia del resto en donde no se diseminaron, lo cual fue provocado por el movimiento de las cajas durante la experimentación.

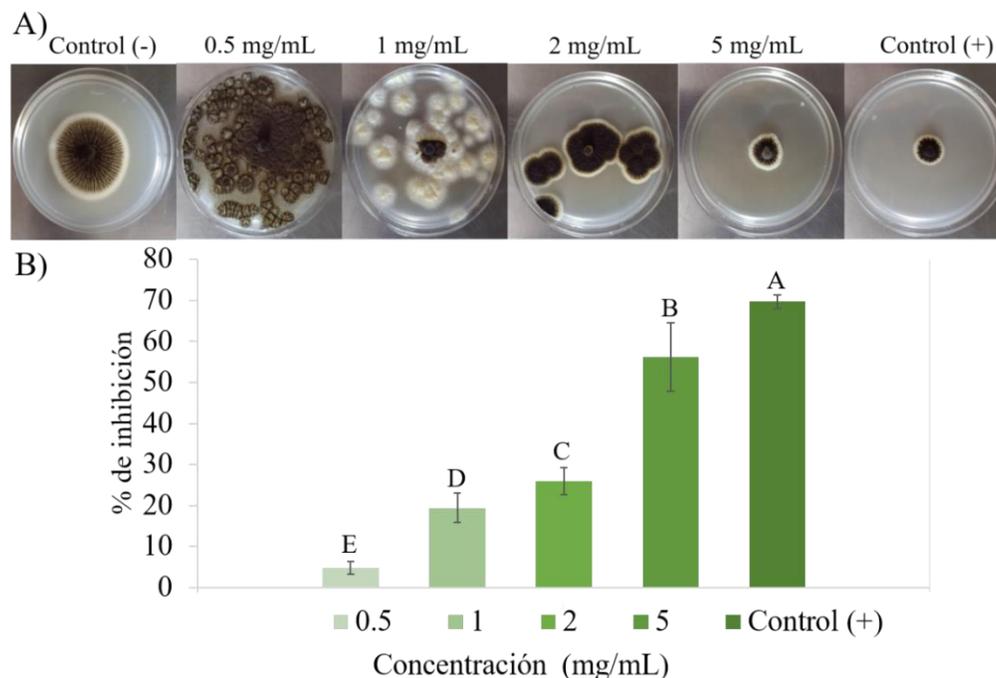


Figura 6. Efectos del extracto de *A. salmiana* sobre el crecimiento de *B. cinerea*

A) Fotografía representativa de la inoculación del hongo *B. cinerea*, sobre el medio de cultivo PDA suplementado con el extracto de *A. salmiana* a distintas concentraciones bajo condiciones *in vitro* a los 7 dpi. La experimentación se realizó por quintuplicado. B) Gráficas comparativas del porcentaje de inhibición del hongo fitopatógeno *B. cinerea* por efecto del extracto de *A. salmiana* a diferentes concentraciones. Las columnas muestran el promedio del porcentaje de inhibición y las barras la desviación estándar de los 5 experimentos independientes que se realizaron. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia estadística significativa entre tratamientos según la prueba de medias Tukey ($p < 0.05$).

7.2.2. Efecto del extracto de *A. salmiana* sobre *Fusarium oxysporum*

La determinación de la capacidad de inhibición del extracto de *A. salmiana* sobre el crecimiento del hongo patógeno *F. oxysporum* se realizó la suplementación del medio de cultivo PDA con el extracto, a diferentes concentraciones. El experimento incluyó el control negativo (-) y positivo (+). La inhibición del crecimiento micelial se determinó a los 7 dpi.

El extracto de *A. salmiana* presentó un bajo efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *F. oxysporum* que no igualó ni superó al control positivo (+), el extracto alcanzó hasta un 19 % de inhibición respecto al control negativo (Fig. 7A). La inhibición de crecimiento del hongo por efecto del extracto utilizado fue igual estadísticamente entre las cuatro concentraciones evaluadas (Fig. 7B).

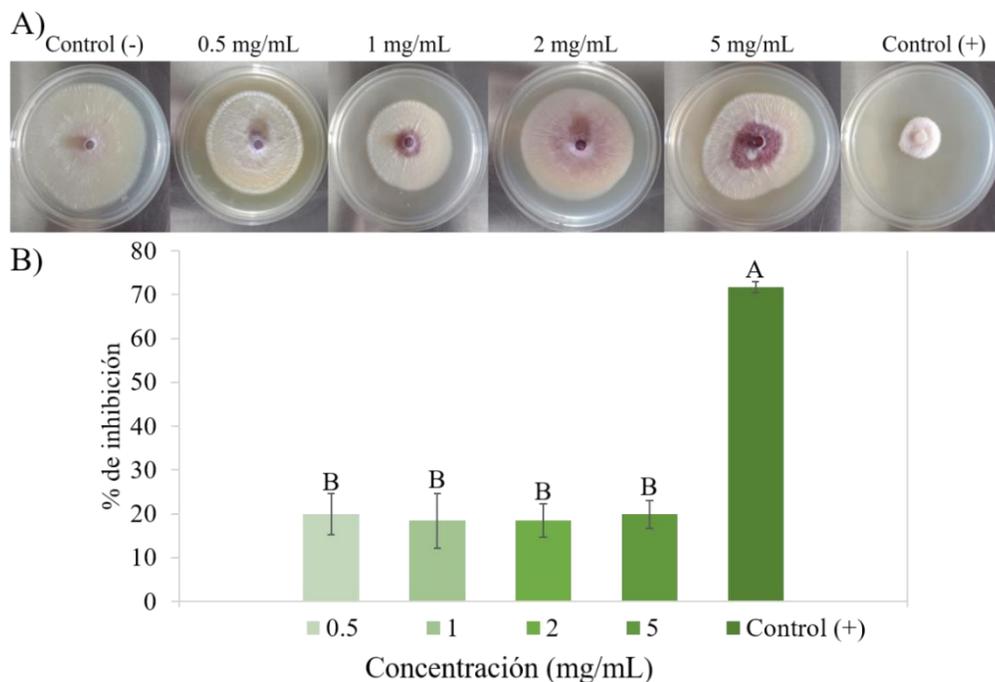


Figura 7. Efecto del extracto de *A. salmiana* sobre el crecimiento de *F. oxysporum*

A) Fotografía representativa de la inoculación del hongo *F. oxysporum*, sobre el medio de cultivo PDA suplementado con el extracto de *A. salmiana* a distintas concentraciones bajo condiciones *in vitro* a los 7 dpi. La experimentación se realizó por quintuplicado. B) Gráficas comparativas del porcentaje de inhibición del hongo fitopatógeno *F. oxysporum* por efecto del extracto de *A. salmiana* a diferentes concentraciones. Las columnas muestran el promedio del porcentaje de inhibición y las barras la desviación estándar de los 5 experimentos independientes que se realizaron. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia estadística significativa entre tratamientos según la prueba de medias Tukey ($p < 0.05$).

7.2.3. Efecto del extracto de *A. salmiana* sobre *Fusarium verticillioides*

Para determinar la capacidad de inhibición del extracto de *A. salmiana* sobre el crecimiento del hongo patógeno *F. verticillioides*, se realizó la suplementación del medio de cultivo PDA con el extracto, a diferentes concentraciones. El experimento incluyó el análisis de un control absoluto negativo (-) y un control positivo (+). La inhibición del crecimiento micelial se determinó a los 7 dpi.

Como se observa en la Figura 8A, el extracto de *A. salmiana* mostró un efecto inhibitorio considerable sobre el desarrollo micelial de *F. verticillioides* respecto al control negativo (-). La inhibición del crecimiento fue dosis-dependiente (31-85 %), siendo diferente estadísticamente en cada una de las concentraciones evaluadas del extracto. Las concentraciones de 2 y 5 mg/mL de extracto superaron la inhibición de crecimiento causada por el control positivo (+) (Fig. 8B).

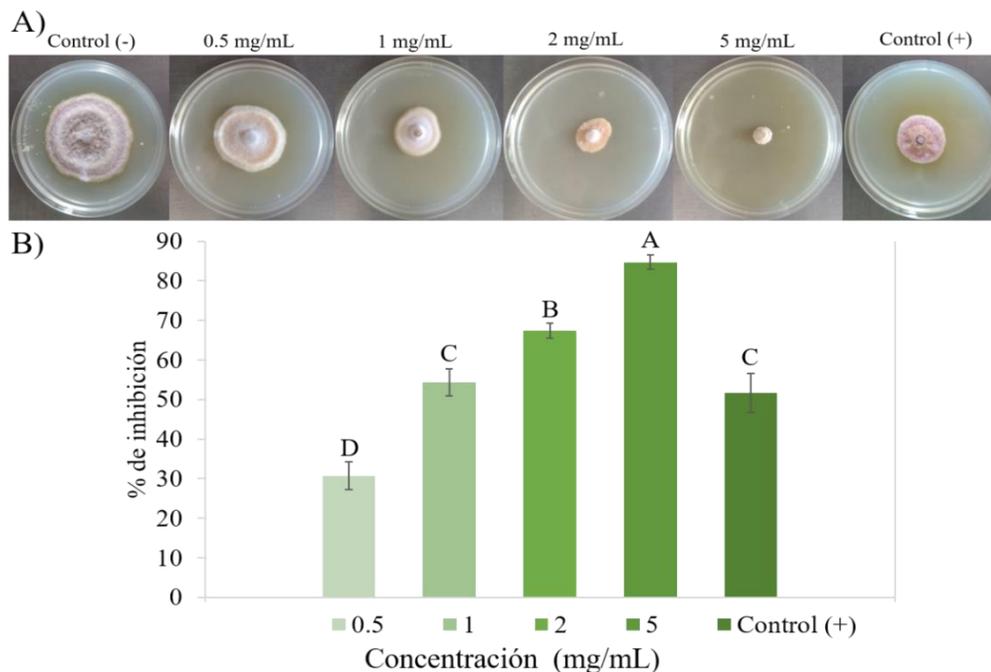


Figura 8. Efecto del extracto de *A. salmiana* sobre el crecimiento de *F. verticillioides*

A) Fotografía representativa de la inoculación del hongo *F. verticillioides*, sobre el medio de cultivo PDA suplementado con el extracto de *A. salmiana* a distintas concentraciones bajo condiciones *in vitro* a los 7 dpi. El experimento se realizó por quintuplicado. B) Gráficas comparativas del porcentaje de inhibición del hongo patógeno *F. verticillioides* por efecto del extracto de *A. salmiana* a diferentes concentraciones. Las columnas muestran el promedio del porcentaje de inhibición y las barras la desviación estándar de los 5 experimentos independientes que se realizaron. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia estadística significativa entre tratamientos según la prueba de medias Tukey ($p < 0.05$).

7.3. Efectos del extracto de *A. salmiana* sobre hongos antagonistas

Las pruebas de determinación, de la capacidad inhibitoria del extracto de *A. salmiana* frente a hongos antagonistas se realizó para evaluar si ambas estrategias de control podrían funcionar simultáneamente de manera adecuada, o si el efecto de una de ellas podría afectar el adecuado funcionamiento de la otra.

7.3.1. Efecto del extracto de *Agave salmiana* sobre *T. asperellum*

La determinación de la capacidad de inhibición del extracto de *A. salmiana* sobre el crecimiento del hongo antagonista *T. asperellum*, también se realizó por medio de la suplementación de medio de cultivo PDA con el extracto, a concentraciones diferentes. El experimento incluyó el análisis de un control absoluto negativo (-), con ausencia del extracto,

y un control positivo (+), con ausencia del extracto, pero adicionado con captan como fungicida sintético. La inhibición del desarrollo micelial se determinó a los 7 dpi.

El extracto de *A. salmiana* mostró un alto efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de *T. asperellum* respecto al control negativo (-), incluso superando el porcentaje de inhibición que se obtuvo con el control positivo (+) (Fig. 9A). La máxima inhibición de crecimiento (superior al 90%) se observó en presencia de 2 y 5 mg/mL de extracto, siendo iguales estadísticamente (Fig. 9B).

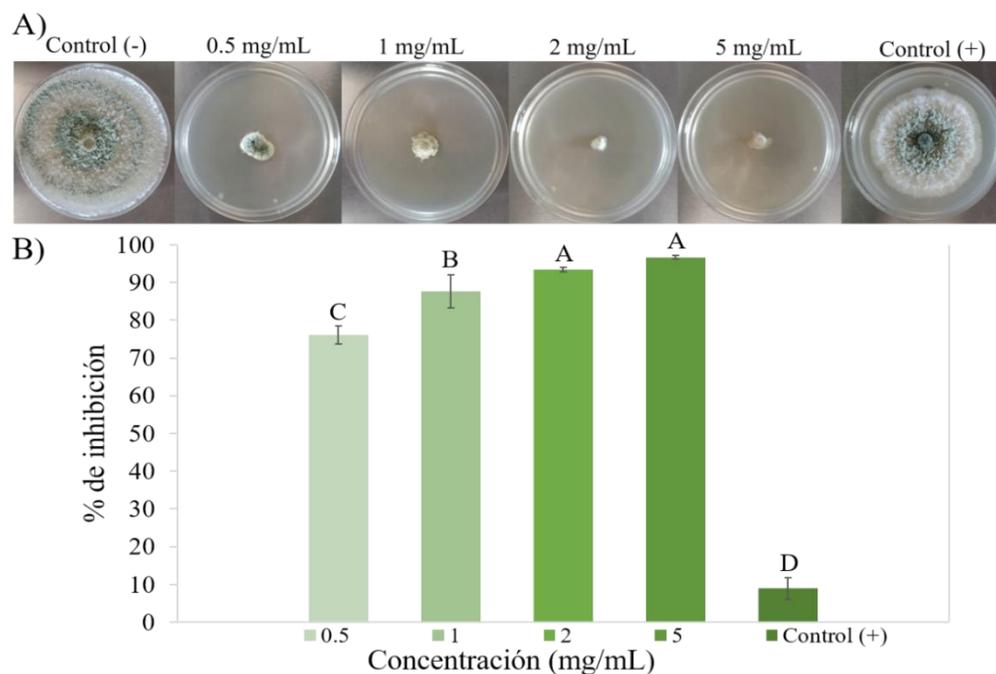


Figura 9. Efecto del extracto de *A. salmiana* sobre el crecimiento de *T. asperellum*

A) Fotografía representativa de la inoculación del hongo *T. asperellum*, sobre el medio de cultivo PDA suplementado con el extracto de *A. salmiana* a distintas concentraciones bajo condiciones *in vitro* a los 7 dpi. La experimentación se realizó por quintuplicado. B) Gráficas comparativas del porcentaje de inhibición del hongo antagonico *T. asperellum* por efecto del extracto de *A. salmiana* a diferentes concentraciones. Las columnas muestran el promedio del porcentaje de inhibición y las barras la desviación estándar de los 5 experimentos independientes que se realizaron. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia estadística significativa entre tratamientos según la prueba de medias Tukey ($p < 0.05$).

7.3.2. Efectos del extracto de *A. salmiana* sobre *Trichoderma* sp.

Para determinar la capacidad de inhibición del extracto de *A. salmiana* sobre el crecimiento del hongo antagonico *Trichoderma* sp. se realizó la suplementación del medio de cultivo PDA con el extracto, a concentraciones diferentes. El experimento incluyó él

análisis de un control absoluto negativo (-) y un control positivo (+). La inhibición del desarrollo micelial se determinó a los 7 dpi.

El extracto de *A. salmiana* mostró un alto efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. respecto al control negativo (-), llegando a superar el resultado que se obtuvo con el control positivo (+) (Fig. 10). La inhibición fue dependiente de la concentración de extracto utilizada, siendo estadísticamente iguales las dos concentraciones más bajas del extracto. Las cuatro concentraciones inhibieron más del 65 % el crecimiento fúngico (Fig. 10B).

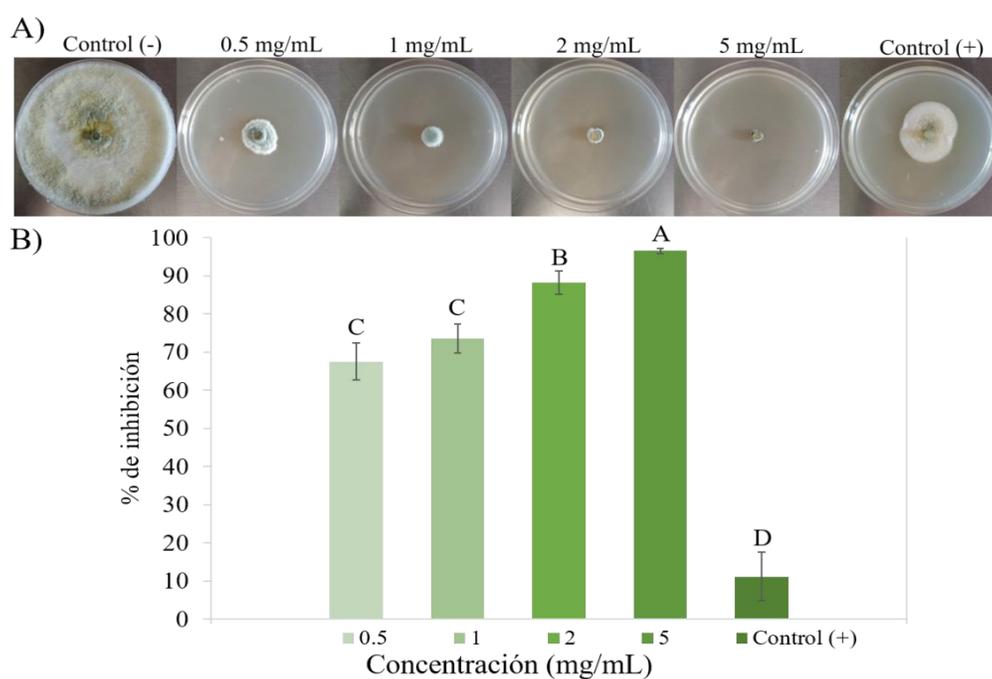


Figura 10. Efecto del extracto de *A. salmiana* sobre el crecimiento de *Trichoderma* sp.

A) Fotografía representativa de la inoculación del hongo *Trichoderma* sp., sobre el medio de cultivo PDA suplementado con el extracto de *A. salmiana* a distintas concentraciones bajo condiciones *in vitro* a los 7 dpi. La experimentación se realizó por quintuplicado. B) Gráficas comparativas del porcentaje de inhibición del hongo antagonista *Trichoderma* sp. por efecto del extracto de *A. salmiana* a diferentes concentraciones. Las columnas muestran el promedio del porcentaje de inhibición y las barras la desviación estándar de los 5 experimentos independientes que se realizaron. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia estadística significativa entre tratamientos según la prueba de medias Tukey ($p < 0.05$).

7.4. Caracterización del extracto de *A. salmiana*

7.4.1. Rendimiento del extracto

A partir de los 92.1 g del peso seco de la muestra de *A. salmiana* se obtuvo el rendimiento del extracto de la solución de Metanol (Tabla 5).

Tabla 5. Rendimiento del extracto de *A. salmiana*

Peso seco material vegetal (g)	Peso del extracto (g)	Porcentaje de rendimiento (%)
92.1	7.76	8.42

Las características físicas del extracto fueron: coloración verde oscuro de apariencia cristalina.

7.4.2. Grupos de constituyentes fitoquímicos

Para la determinación de MS y la detección de aminoácidos, se realizaron pruebas de tamizaje fitoquímico que permitieron analizar cualitativamente la presencia o ausencia de los principales constituyentes fitoquímicos del extracto de *A. salmiana*. El análisis incluyó la evaluación de fenoles, saponinas, taninos, compuestos fenólicos y quinonas. Así como la determinación de aminoácidos. De acuerdo con los indicadores para cada prueba se detectaron cinco de los seis grupos evaluados, siendo el único con resultado negativo la presencia de quinonas (Fig.11). La abundancia de estos se resume en la Tabla 6, en donde se encontró una ligera presencia de flavonoides y saponinas, una presencia media para Taninos y Compuestos fenólicos y una elevada presencia de aminoácidos.

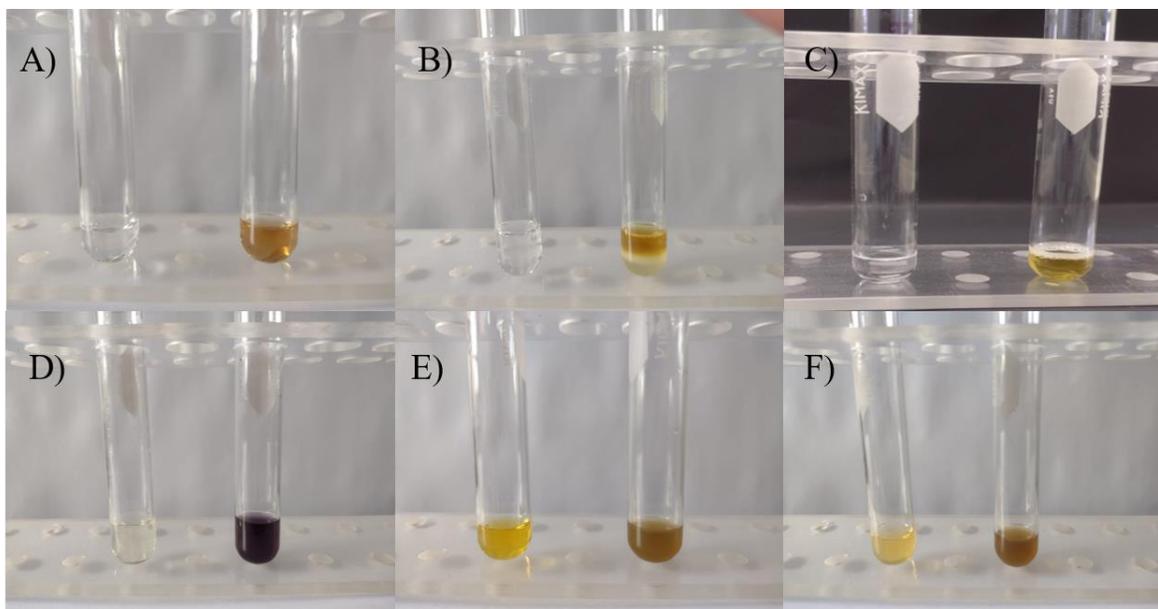


Figura 11. Detección cualitativa de los principales constituyentes fitoquímicos del extracto de *A. salmiana*

Resultado representativo para la detección de: A) Flavonoides B) Quinonas C) Saponinas D) Aminoácidos E) Taninos F) Compuestos fenólicos. El tubo de la izquierda de cada prueba representa el control negativo del ensayo y el de la derecha el que contiene el extracto de *A. salmiana*. Las pruebas se realizaron por triplicado.

Tabla 6. Resultados de las reacciones para determinación cualitativa de los principales constituyentes fitoquímicos del extracto de *A. salmiana*

	Intensidad de reacción del tamizaje fitoquímico					
	Flavonoides	Quinonas	Saponinas	Aminoácidos	Taninos	Compuestos fenólicos
Intensidad	+	-	+	+++	++	++

Interpretación de la intensidad de la reacción (-) ausencia (+) ligera (++) media (+++) abundante.

7.4.3. Cuantificación de metabolitos secundarios

Para la determinación cuantitativa de MS, se realizaron pruebas analíticas de espectrofotometría que permitieron identificar algunos grupos de metabolitos secundarios. Las pruebas incluyeron el análisis de Fenoles totales, Flavonoides y Capacidad antioxidante, de acuerdo con cada prueba se realizaron los cálculos correspondientes.

Cuantificación de fenoles totales

Para la determinación de fenoles totales se llevó a cabo una curva de calibración de Ácido Gálico, la concentración del contenido total de fenoles en las muestras del extracto se calculó a partir del gráfico de calibración. A partir de las absorbancias de ácido gálico se

realizó la gráfica patrón respecto a las concentraciones (0-16.25 mg/L de AG) y se obtuvo un $R^2 = 0.9861$, $y = 0.0513x - 0.11$. Con los resultados de las absorbancias de las muestras de extracto se sustituyeron los valores en la ecuación de la recta para el posterior cálculo de miligramos equivalentes de ácido gálico/gramo de peso seco de tejido vegetal (mg EAG/g PS).

De acuerdo con los resultados obtenidos la concentración de fenoles fue de 6.21 mg EAG/g PS ± 0.85 .

Cuantificación de flavonoides

Para la determinación de flavonoides se realizó una curva de calibración con Quercetina, la concentración de flavonoides en las muestras se obtuvo a partir del gráfico estándar. Con base a las absorbancias de quercetina se realizó una gráfica estándar respecto a las concentraciones (0-70 $\mu\text{g/mL}$ de Q) y se obtuvo un $R^2 = 0.9931$, $y = 0.0285x + 0.0421$. Con los resultados de las absorbancias del extracto se sustituyeron los valores en la ecuación de la recta para el siguiente cálculo de microgramos de quercetina/ gramo de peso seco de tejido vegetal ($\mu\text{g EQ/g PS}$).

Conforme a los datos obtenidos la concentración de flavonoides fue 486 $\mu\text{g EQ/g PS}$ ± 6.71 .

Cuantificación de Capacidad antioxidante

Para la determinación de Capacidad antioxidante se realizaron dos curvas una para el estándar Ácido ascórbico y otra para el extracto de *A. salmiana*. Los gráficos fueron realizados respecto a las concentraciones añadidas para el ácido ascórbico (1-10 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico) se obtuvo un $R^2=0.9966$, $y=9.338x + 0.0229$; mientras que para el extracto (62.5-500 $\mu\text{g/mL}$ de extracto) y se obtuvo un $R^2=0.9967$, $y=0.1871x + 6.7417$. Para esta determinación se realizó el cálculo de la IC_{50} respectivamente para cada curva sustituyendo los valores en la ecuación de la recta. La IC_{50} es la concentración de un compuesto que es necesaria para inhibir la actividad biológica en un 50 % en comparación con un control sin tratamiento.

De acuerdo con los resultados obtenidos la IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) para el ácido ascórbico fue 5.35 ± 0.23 , mientras que para el extracto la IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) fue 224.24 ± 20.71 .

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las enfermedades causadas por patógenos son una de las principales limitantes para la producción agrícola en todo el mundo, en este estudio se determinó el efecto inhibitorio de dos especies de *Trichoderma* y del extracto metanólico de *A. salmiana* sobre el crecimiento *in vitro* de tres hongos fitopatógenos de interés agrícola.

Las especies *T. asperellum* y *Trichoderma* sp. demostraron ser, en cultivos duales, excelentes controladores de los hongos fitopatógenos evaluados. La eficiencia del antagonismo en orden decreciente para *T. asperellum* fue *B. cinerea* (76.95 %), *F. oxysporum* (76.55 %) y *F. verticillioides* (66.59%), mientras que para *Trichoderma* sp. fue *F. oxysporum* (81.12 %), *B. cinerea* (73.14 %) y *F. verticillioides* (62.61 %).

Se ha reportado que *T. asperellum* inhibe el crecimiento de *F. oxysporum* hasta en un 80 % (Díaz-Gutiérrez et al., 2021), similar a los valores obtenidos en esta investigación. Respecto a *Trichoderma* sp. resultó muy eficiente para el control de *F. oxysporum* alcanzando hasta un 80 % de inhibición, lo cual coincide con lo reportado en la literatura con promedios de inhibición superiores al 70 % (Sánchez-García et al., 2017). Además, se ha reportado que *T. asperellum* inhibe hasta el 81 % y *Trichoderma* sp. el 80 % del crecimiento de *F. verticillioides* (Sánchez-García et al., 2017), valores diferentes a los obtenidos en este análisis que se encuentran por debajo del 70 % de inhibición. Asimismo, se ha registrado que *Trichoderma* sp. inhibe el 62% del crecimiento de *B. cinerea* (Geng et al., 2022), y *T. asperellum* lo inhibe en un 56.15% (Grados-Moreyra, 2022), lo cual no coincide con los resultados de esta investigación, pues se obtuvieron resultados aún más altos. Dichas diferencias pueden atribuirse a las condiciones experimentales como el tiempo de incubación y la temperatura.

El extracto de *A. salmiana* presentó actividad antifúngica para todos los hongos incluidos en el presente trabajo; sin embargo, la actividad antifúngica contra *F. oxysporum* fue el más bajo, incluso por debajo del resultado del control positivo (+) alcanzando solo el 19 % de inhibición respecto al control positivo. Este resultado coincide con los resultados obtenidos de extractos de otras especies vegetales, como de *Azadirachta indica*, *Allium sativum*, *Allium cepa* y *Zingiber officinale* en los que se han reportado porcentajes de inhibición entre un 23.53 y 31.58 % (Abdulle et al., 2022). Para el hongo patogénico *B. cinerea* se obtuvo hasta un 56 % de inhibición, lo cual difiere de los resultados obtenidos con otros extractos de *Larrea*

tridentata (66 %), *Origanum vulgare* (72.66 %) y *Agave lechuguilla* hoja y raíz (63 % y 92.66 %, respectivamente) (Martínez-Hernández, 2017). Mientras que para *F. verticillioides* se obtuvo un 85 % de inhibición micelial, superando la inhibición del control positivo, menor inhibición que la obtenida con el extracto de *Vitex mollis* (91 %) (Valencia-Botin et al., 2018) y mayor a la obtenida con el extracto de *Jaquinia macrocarpa* (56.3%). El extracto de *A. salmiana* se considera mejor controlador en comparación a extractos de otras especies vegetales especialmente para *F. verticillioides*.

Por otra parte, los hongos antagónicos fueron susceptibles al efecto del extracto alcanzando más del 90 % de inhibición micelial, por lo tanto, el uso simultáneo de ambas técnicas no es recomendable. Otros extractos como el de *Ruta graveolens* inhibe el 81 % el desarrollo micelial de *Trichoderma* (Reyes-Quintanar et al., 2014), también el extracto de *Pycnoporus* sp. inhibe hasta un 72 % el crecimiento de *Trichoderma* (Talavera-Ortiz et al., 2020). Estos datos indican que *Trichoderma* es un hongo vulnerable a los efectos de extractos vegetales.

Para *F. verticillioides* ambas técnicas (confrontación y envenenamiento) demostraron ser eficientes en el desarrollo micelial del hongo; sin embargo, se obtuvo un mejor porcentaje de inhibición con el envenenamiento del medio con 5 mg/mL del extracto de *A. salmiana* (85 %), que con la confrontación antagónica *T. asperellum* (66.59 %) y *Trichoderma* sp. (62.61 %).

Respecto a la inhibición del crecimiento de *B. cinerea* y *F. oxysporum*, el método más eficiente fue el de antagonismo pues se obtuvieron resultados más altos que en el envenenamiento con extracto. Para *B. cinerea* en antagonismo se obtuvo el *T. asperellum* (76.95 %) y *Trichoderma* sp. (73.14 %), mientras que en el envenenamiento con 5 mg/mL de extracto de *A. salmiana* (56 %). Por otra parte, para *F. oxysporum* en la confrontación se obtuvo con *T. asperellum* (76.55 %) y *Trichoderma* sp. (81.12 %); en el envenenamiento con extracto en todas sus concentraciones la inhibición fue menor al 20 %.

En la literatura no se tiene registro sobre la actividad antifúngica de extractos de *A. salmiana*, lo cual significa que el presente trabajo es pionero en esa línea de investigación. En la literatura, sí se tiene registro del efecto antimicrobiano de extracto de varias especies de *Agave* como *A. americana* (Shegute & Wasihun, 2020), *A. angustifolia* (López-

Romero,2018), *A. sisalana* (Santos et al., 2009), *A. cupreata* (Salazar-Pineda et al., 2017), específicamente contra bacterias patógenas de interés para la salud humana.

El tamiz fitoquímico del extracto de *A. salmiana* muestra la riqueza de metabolitos secundarios que posee. En este, se determinó la presencia de diferentes grupos de metabolitos, tales como flavonoides, saponinas, aminoácidos, taninos y compuestos fenólicos; dichos resultados son similares a los reportados para *A. americana* (Shegute & Wasihun, 2020), y *A. lechuguilla* (Martínez-Hernández, 2017). La capacidad antifúngica del extracto, se puede atribuir a la presencia de los compuestos identificados, ya que en la literatura se ha asociado la presencia de flavonoides con actividad antimicrobiana (Martínez-Meléndez et al., 2023). Las saponinas son consideradas como surfactantes y anfipáticas naturales con alta capacidad tensoactiva que permite la penetración de proteínas a través de membranas celulares (Góngora-Chi et al., 2023). Los aminoácidos se han relacionado con la lisis directa de microorganismos y con una alta actividad antioxidante (Calvo et al., 2009). Los taninos tienen altas propiedades para absorber el hierro e interrumpen la continuidad de membranas celulares (Martínez-Meléndez et al., 2023) e interfieren en la síntesis de proteínas y en la inhibición de la actividad enzimática celular (Martínez-Hernández, 2017). Los compuestos fenólicos actúan inhibiendo la síntesis de aminoácidos (Rodríguez-Maturino et al., 2015).

Los compuestos fenólicos son moléculas asociadas con la actividad antimicrobiana por la presencia y ubicación del grupo hidroxilo en su estructura química. La presencia de dicho grupo en el anillo aromático del fenol confiere mayor probabilidad de reaccionar; debido a que el grupo hidroxilo es un sustituyente activador que facilita la sustitución de átomos de hidrógeno (Biharee et al., 2020).

Los resultados obtenidos de la cuantificación de fenoles totales indicaron una alta presencia de ellos en el extracto de *A. salmiana* (6.21 mg AG/g) que supera a la reportada para otras especies de *Agave*: *A. shrevei* con 3.75 mg EAG/g (Delgado-Alvarado et al., 2021) y *A. angustifolia* con 3.89 mg EAG/g (Pollorena-López, 2012); pero menor respecto a *A. americana* con 9.9 mg EAG/g (Chirinos et al., 2013).

Respecto al contenido de flavonoides, en el extracto se determinó una concentración de 486 µg EQ/g, mientras que para *A. shrevei* se ha reportado 2.63 mg EQ/g (Delgado-Alvarado et al., 2021), para *A. americana* 3.07 mg EQ/g (Chirinos et al., 2013) y para *A.*

angustifolia 4.59 mg EQ/g (Pollorena-López, 2012). La presencia de estos compuestos en el extracto de *A. salmiana* es de suma importancia, ya que se sabe que los flavonoides son compuestos con actividad antibacteriana, antioxidante, antifúngica y antiviral (Bellatar et al., 2021).

Estos resultados indican que la presencia y concentración de compuestos bioactivos depende de la especie planta analizada del género *Agave*.

Sobre la evaluación de la capacidad antioxidante usando la técnica del DDPH, se calculó el valor de IC₅₀ de una referencia (ácido ascórbico) y del extracto de *A. salmiana*. El valor calculado de IC₅₀ para la solución de referencia (IC₅₀ de 5.35 µg/mL) coincidió con lo reportado en la literatura, en los que se ha reportado una IC₅₀ de (5.40 µg/mL) (Egharevba et al., 2019), mostrando reproducibilidad en el desarrollo de la técnica. En referencia al valor de la IC₅₀ (µg/mL) del extracto de *A. salmiana* fue de 224.24 µg/mL, dicho valor es menor que el reportado para *Agave angustifolia* que presenta una IC₅₀ de 378 µg/mL (López-Romero et al., 2023). La capacidad antioxidante que tiene un extracto se asocia a la estructura química de los compuestos presentes en el extracto, ya que los grupos de hidroxilo determinan su potencial (López-Romero et al., 2022). La capacidad antioxidante mostrada por el extracto pudiera estar asociada con los compuestos bioactivos presentes en la planta, particularmente con los compuestos fenólicos y las saponinas (López-Romero et al., 2022).

Los resultados indican que el extracto de *A. salmiana* es una fuente de compuestos bioactivos, a los que se les atribuye su potencial antifúngico.

Los estudios sobre nuevas estrategias agroecológicas, tienen importantes implicaciones en el sector agrícola, por lo tanto, sería bueno continuar con la identificación de los compuestos fitoquímicos presentes en el extracto de *A. salmiana*, que nos permitan determinar algunos otros grupos de MS. Así como la determinación de la abundancia en la que se encuentran presentes.

IX. CONCLUSIONES

Los ensayos realizados confirman que el género *Trichoderma* presenta capacidad antagonica frente a hongos fitopatógenos, en cultivos duales bajo condiciones *in vitro*, específicamente *T. asperellum* demostró ser el hongo antagonista más eficiente en la inhibición de crecimiento de *B. cinerea* excediendo el 75 % de inhibición, mientras que *Trichoderma* sp. rebasa el 80 % de inhibición de *F. oxysporum*, en el caso de *F. verticillioides* no se encontraron diferencias significativas en el efecto inhibitorio de ambos agentes antagonicos, ambos superan el 60 %.

Al evaluar la eficiencia del extracto metanólico de *A. salmiana* sobre el crecimiento *in vitro* de hongos fitopatógenos, se comprobó que posee efecto antifúngico frente a las 3 especies evaluadas, asimismo para las 2 especies de *Trichoderma*. El extracto metanólico de *A. salmiana* inhibió el crecimiento *in vitro* aproximadamente del 80 % para *F. verticillioides*, 50% para *B. cinerea* y 20 % para *F. oxysporum* a una concentración de 5 mg/mL. Además, el extracto de *A. salmiana* afectó de manera considerable el desarrollo micelial de los hongos antagonicos rebasando el 90 %, siendo más susceptibles que los hongos fitopatógenos evaluados.

El tamiz fitoquímico reveló la presencia de varios grupos de compuestos siendo los más abundantes el grupo de los aminoácidos, seguido de taninos y compuestos fenólicos. Además, las pruebas fueron positivas a saponinas y flavonoides en menor abundancia. La cuantificación espectrofotométrica de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante demostró altos contenidos en la concentración de estos compuestos en la especie de *A. salmiana*.

El efecto antifúngico del extracto, se le atribuye a la presencia de los compuestos identificados.

X. REFERENCIAS

- Abdulle, Y. A., Osman, A. A., Awale, M. A., Heile, A. O., Bilal, M., & Subhani, M. N. (2022). Efficacy of biocontrol agents, plant extracts and fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences, 12(1): 34-43.
- Achicanoy, H. (2001). Estrategias integradas para el control de enfermedades de las plantas. Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 54(1 y 2):1251-1273.
- ACSA (2020). Alcaloides de la pirrolizidina. Toxinas naturales en plantas. Recuperado 01 de septiembre de 2023, de <http://acsa.gencat.cat/es/actualitat/butlletins/acsa-brief/alcaloides-de-la-pirrolizidina.-toxines-naturals-en-plantes/index.html>
- Agrios, G. N. (2013). Fitopatología (2da ed.). Editorial Limusa. México. 833p.
- Almeida, F., Rodrigues, M. L., & Coelho, C. (2019). The still underestimated problem of fungal diseases worldwide. Frontiers in Microbiology, 10: 214.
- Álvarez, S. R. H., Leyva Mir S., Marban Mendoza N., & Rebollar Alviter Á. (2017). Resistencia de *Botrytis cinerea* de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) a fungicidas en Michoacan México. Agrociencia, 51: 783-798.
- Amaya-Rodríguez, L. M., & Portillo-Membreño, C. E. (2013). Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el ingenio chaparrastique por el método de espectrofotometría ultravioleta-visible. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química y Farmacia. Universidad del Salvador, San Salvador, El Salvador. 130p.
- Apaza-López, A. G., & Solis-Aquino, L. S. (2019). Eficiencia de extractos etanólicos de vegetales para el control *in vitro* del hongo fitopatógeno (*Fusarium verticillioides*). Tesis de Licenciatura. Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental. Universidad César Vallejo, Lima, Perú. 107p.
- Arauz, L. F. (2011). Fitopatología: un enfoque agroecológico (2da ed.). Editorial Universidad de Costa Rica. 544p.
- Arie, T. (2019). *Fusarium* diseases of cultivated plants, control, diagnosis, and molecular and genetic studies. Journal of Pesticide Science, 44(4), 275-281.
- Ascencio-Álvarez, A., López-Benítez, A., Borrego-Escalante, F., Rodríguez-Herrera, S. A., Flores-Olivas, A., Jiménez-Díaz, F., & Gámez-Vázquez, A. J. (2008). Marchitez

- vascular del tomate: II. herencia de la resistencia a la raza 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) snyder y hansen en tres especies del género *Lycopersicon*. Revista Mexicana de Fitopatología, 26(2):180-183.
- Ávalos, A., & Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología), 2(3):119-145.
- Babenko, L. M., Smirnov, O., Romanenko, K., Trunova, O., & Kosakivska, I. (2019). Phenolic compounds in plants: Biogenesis and functions. Ukrainskii Biokhimičeskii Zhurnal, 91:5-18.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry, 99(1): 191-203.
- Bellatar, H., Himour, S., & Yahia, A. (2021). Cribado fitoquímico y evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *Ficus carica*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 12(1):1-9.
- Bernardino-Nicanor, A., Castro-Rosas, J., Conde, E., González-Cruz, L., Negrete-Rodríguez, M., & Medina-Galván. (2018). Antimicrobial and antioxidant activity of flower scape extracts of *Agave salmiana*: Effect of the extraction solvent and development stage. Research journal of biotechnology, 13:1-9.
- Bettiol, W. (2006). Productos alternativos para el manejo de enfermedades en cultivos comerciales. Fitosanidad, 10(2):85-98.
- Bi, K., Liang, Y., Mengiste, T., & Sharon, A. (2023). Killing softly: a roadmap of *Botrytis cinerea* pathogenicity. Trends in Plant Science, 28(2), 211-222.
- Biharee, A., Sharma, A., Kumar, A., & Jaitak, V. (2020). Antimicrobial flavonoids as a potential substitute for overcoming antimicrobial resistance. Fitoterapia, 146:104720.
- Bosland, P. W. (1988). *Fusarium oxysporum*, a pathogen of many plant species. Advances in Plant Pathology, 6:281-289.
- Calvo, J., & Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 27(1):42-52.
- Carrión, A. V., & García, C. R. (2010). Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador. 150p.

- Casas, A. T. (2011). Los métodos de control de enfermedades: presente y futuro. *Phytoma España*, 233. 71-73.
- Castro, V. (2003). Ficha técnica, marchites del Agave (*Fusarium verticillioides*). Recuperado 03 de julio de 2023, de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/244027/Ficha_Tecnica_Fusarium_verticillioides_en_agave_Versi_n_FINAL.pdf
- Cavazos-Cortés, C. L., Villegas, J. J., Ramírez, K. A., Ábrego, N., Cantú, M. E., Chávez, L., & Silva, J. (2018). Evaluación del extracto alcohólico de las hojas de *Agave salmiana* como agente antimicrobiano y su posible aplicación en una fermentación alcohólica. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina*, 2: 49.
- Chirinos, R., Pedreschib R., Rogez, H., Larondelle, Y., & Campos, D. (2013). Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. *Industrial Crops and Products*, 47:145-152.
- Cruzado, M., Pastor, A., Castro, N., & Cedrón, J. C. (2013). Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de alcachofa (*Cynara scolymus* L.). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 79(1):57-63.
- De La Torre, M., Sánchez-Rangel, D., Galeana-Sánchez, E., & Plasencia-de La Parra, J. (2014). Fumonisin –síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1):77-91.
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4):414-430.
- Deketelaere, S., Tyvaert, L., França, S. C., & Höfte, M. (2017). Desirable traits of a good biocontrol agent against *Verticillium* wilt. *Frontiers in Microbiology*, 8:1186.
- del Puerto, A. M., Suárez Tamayo, S., & Palacio Estrada, D. E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3):372-387.

- Delgado-Alvarado, E. A., Ávila-Reyes, J. A., Torres-Ricario, R., Naranjo-Jiménez, N., Chaidez-Ayala, A. I., & Almaraz-Abarca, N. (2021). Caracterización fitoquímica de *Agave shrevei* Gentry. e-CUCBA, 16:56-59.
- Dey, P., Kundu, A., Kumar, A., Gupta, M., Lee, B. M., Bhakta, T., Dash, S., & Kim, H. S. (2020). Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). Recent Advances in Natural Products Analysis, 15:505-567.
- DGSV-CNRF. (2020). Ficha técnica (*Fusarium* spp.). Recuperado 30 de agosto de 2023, de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/633031/Fusarium_spp_ma_z_2020.pdf
- Díaz-Gutiérrez, C., Arroyave, C., Llugany, M., Poschenrieder, C., Martos, S., & Peláez, C. (2021). *Trichoderma asperellum* como agente preventivo y curativo para el control del marchitamiento por *Fusarium* en *Stevia rebaudiana*. Biological Control, 155: 104537.
- Egharevba, E., Chukwuemeke-Nwani, P., Eboh, U., Okoye, E., Bolanle, I. O., Oseghale, I. O., Imieje, V. O., Erharuyi, O., & Falodun, A. (2019). Evaluation of the antioxidant and hypoglycaemic potentials of the leaf extracts of *Stachytarphyta jamaicensis* (Verbenaceae). Tropical Journal of Natural Product Research, 3(5):170-174.
- Ezziyyani, M., Sánchez, C. P., Ahmed, A. S., Requena, M. E., & Emilia, M. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). Anales de Biología, 26:35-45.
- FAO. (s. f.). Gestión de plagas (manejo integrado de plagas y plaguicidas). Recuperado 12 de enero de 2024, de <https://www.fao.org/pest-and-pesticide-management/ipm/integrated-pest-management/es/>
- Feliu, X. (2023). ¿Qué son los terpenos? estructura, funciones y beneficios. The Tree CBD blog. Recuperado 01 de septiembre de 2023, de <https://thetreecbd.com/es/blog/terpenos-que-son>
- Felix, I. (2018). Uso de extractos vegetales en el sector agrícola. Fagro blog, Recuperado 02 de octubre de 2023, de <https://blogdefagro.com/2018/02/28/extractos-vegetales/>
- Ferreira, S. A. (1998). Management practices to prevent and control plant diseases. Plant Disease, 14:1-2.

- Figuroa-Rivera, M. G., Rodríguez-Guerra, R., Zulema, B., González-Chavira, M. M., & Pons-Hernández, J. L. (2010). Caracterización de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición de raíz de maíz en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28(2):124-134.
- Fimbres-Lopez, F. (2010). Efecto de extractos de plantas silvestres en el desarrollo de *Fusarium verticillioides*. Tesis de Maestría. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora. 78p.
- Grados-Moreyra, N. J. (2022). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* sp. frente a *Botrytis* spp. y *Fusarium* spp., aislados de *Fragaria ananassa* “fresa”. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Humanga, Ayacucho, Perú. 87p.
- García, D. (2022). Hongos antagonistas y enfermedades fúngicas de la viña. *Acenología* blog. Recuperado 24 de noviembre de 2023, de https://www.acenologia.com/congresoace_2022_dania_garcia/
- García-Núñez, R. M., Galán-Reséndiz, M., Cuevas, J. A., & Álvarez, R. (2020). Identificación y caracterización morfológica de agaves en sistemas agroforestales con metepantle en tierras campesinas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(4):917-929.
- Gasaly, N., Riveros, K., & Gotteland, M. (2020). Fitoquímicos: Una nueva clase de prebióticos. *Revista Chilena de Nutrición*, 47(2):317-327.
- Gaviria, C., Hernández Arredondo, J. D., Lobo Arias, M., Medina Cano, C. I., & Rojano, B. A. (2012). Cambios en la actividad antioxidante en frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* Sw.) durante su desarrollo y maduración. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 65(1):87-6495.
- Geng, L., Fu, Y., Peng, X., Yang, Z., Zhang, M., Song, Z., Guo, N., Chen, S., Chen, J., Bai, B., Liu, A., & Ahammed, G. J. (2022). Potencial de biocontrol de *Trichoderma harzianum* contra *Botrytis cinerea* en plantas de tomate. *Biological Control*, 174: 105019.
- Gesteiro, N. (2018). Búsqueda de compuestos de defensa en el maíz frente al hongo *Fusarium verticillioides*. Recuperado 2 de Julio de 2023, de <https://digital.csic.es/handle/10261/175742>

- Góngora-Chi, G. J., Lizardi-Mendoza, J., López-Franco, Y. L., López-Mata, M. A., & Quihui-Cot, L. (2023). Métodos de extracción, funcionalidad y bioactividad de saponinas de *Yucca*: una revisión. *Biocencia*, 25(1):147-155.
- González-Álvarez, M., Moreno-Limón, S., Salcedo-Martínez, S. M., & Pérez-Rodríguez, E. C. (2015). Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de extractos de *Agave* (*Agave scabra*, Salm Dyck) sobre hongos postcosecha. *Phyton* (Buenos Aires), 84(2):427-434.
- González-León, Y., Ortega-Bernal, J., Anducho-Reyes, M. A., & Mercado-Flores, Y. (2022). *Bacillus subtilis* y *Trichoderma*: características generales y su aplicación en la agricultura. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 25:1-14.
- Guédez, C., Cañizález, L., & Castillo, C. (2009). Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29:34-38.
- Guzmán-Piedrahita, Ó. A., Castaño-Zapata, J., & Villegas-Estrada B. (2009). Diagnóstico de enfermedades de las plantas de origen biótico. *Agronomía*, 17(2):7-24.
- Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G., & Hernández-Rodríguez, A. (2007). Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(1):66-74.
- Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). *Trichoderma*: importancia agrícola, biotecnológica y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 35(1):98-112.
- Hirooka, T., & Ishii, H. (2013). Chemical control of plant diseases. *Journal of General Plant Pathology*, 79(6):390-401.
- Hosak, P., & Miller, L. (2017). Preventing and managing plant diseases. Recuperado 11 de agosto de 2023, de <https://extension.missouri.edu/publications/mg13>
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1):14-21.

- INIFAP (2022). Manuales prácticos para la elaboración de bioinsumos. Recuperado 31 de agosto de 2023, de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/737322/10_Extractos_vegetales.pdf.
- Jiménez, E. V., & Mosquera. O. M. (2014). Actividad antifúngica *in vitro* de tres extractos de plantas frente a *Botrytis cinerea* (Moho gris). *Salud & Sociedad*, 1(2):16-21.
- Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizón-Gaviño, J., Herrera-Suárez, T., García-Mendoza, A., & Gschaedler-Mathis, A. (2008). Yeasts associated with the production of mexican alcoholic nondistilled and distilled *Agave* beverages. *Yeast Research*, 8(7): 1037-1052.
- Larios- Palacios, O., López-Vázquez, É., Curiel-Rodríguez, A., Ruíz-Ezpiñoza, F., Solano-Vidal, R., & Serrato- Cruz, M. (2020). Evaluación *in vitro* de métodos contra *Botrytis cinerea*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(3):593-606.
- Liu, S., Fu, L., Tan, H., Jiang, J., Che, Z., Tian, Y., & Chen, G. (2021). Resistance to Boscalid in *Botrytis cinerea* from greenhouse-grown tomato. *Plant Disease*, 105(3): 628-635.
- López-Romero, J. C., Ayala-Zavala, J. F., Peña-Ramos, E. A., Hernández, J., & González-Ríos, H. (2018) Antioxidant and antimicrobial activity of *Agave angustifolia* extract on overall quality and shelf life of pork patties stored under refrigeration. *Journal of Food Science and Technology*, 55(11):4413-4423.
- López-Romero, J. C., González-Ríos, H., Valenzuela-Melendres, M., Ayala-Zavala, J. F., & Meza-Callado, A. G. (2023). Compuestos químicos, capacidad antioxidante y antimicrobiana de dos extractos metanólicos de hojas de *Agave angustifolia*. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 10: 3644.
- López-Romero, J. C., Torres-Moreno, H., Vidal-Gutiérrez, M., Cabrera-Cabrera, G. G., Robles-Zepeda, R. E., Rodríguez-Martínez, K. L., Ortega-García, J., Villegas-Ochoa, M. A., Salazar-López, N. J., Domínguez-Avila, J. A., & González-Aguilar, G. A. (2022). *Caesalpinia palmeri*: first report on the phenolic compounds profile, antioxidant and cytotoxicity effect. *Chemistry & Biodiversity*, 20(1):631.
- Loyola-Vargas, V. M., Sánchez-Iturbe, P., Canto-Canché, B., Gutiérrez-Pacheco, L. C., Galaz-Ávalos, R. M., & Moreno-Valenzuela, O. (2004). Biosíntesis de los alcaloides indólicos. *Revista de la Sociedad Química de México*, 48(1):67-94.

- Martínez-Hernández, E. (2017). Actividad antifúngica de extractos vegetales contra *Botrytis cinerea* en fresa. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila. 77p.
- Martínez-Meléndez, A., Cruz-López, F., & Kuzhuppillymyal-Prabhakarankutty, L. (2023). Los metabolitos secundarios como agentes antimicrobianos. *Biología y Sociedad*, 6(12):33-40.
- Morales-Ventura, D. U. (2022). Efectos del *Agave americana* L. sobre hongos fitopatógenos. Tesis de Licenciatura. Instituto de Ciencias Biológicas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 82p.
- Nikitin, D. A., Ivanova, E. A., Semenov, M. V., Zhelezova, A. D., Ksenofontova, N. A., Tkhakakhova, A. K., & Kholodov, V. A. (2023). Ecological characteristics and identification of some problematic phytopathogenic *Fusarium* in soil. *Diversity*, 15(1):49.
- Ocaña-López, M. E. (2013). Actividad antifúngica *in vitro* de extractos vegetales contra *Fusarium oxysporum* Snyd y Hans. Tesis de Licenciatura. División de Agronomía. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Coahuila, México. 55p.
- ONU (2020). Efectos de plaguicidas y fertilizantes sobre el medio ambiente y la salud y formas de reducirlos. Recuperado 12 de enero de 2024, de https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/34463/JSUNEPPF_Sp.pdf
- Ortiz, E., & Hoyos, L. M. (2013). Descripción de la sintomatología asociada a fusariosis y comparación con otras enfermedades en gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) en la región del Sumapaz (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 6(1):110-116.
- Paneque, T., Polanco, M., Jiménez, C., & Piquera, Y. (2019). Estudio etnofarmacológico de algunas especies endémicas de *Agave* utilizados en la medicina tradicional. *Revista Científica y Tecnológica*, 6(2):57-66.
- Pollorena-López, G. (2012). Capacidad antioxidante y antimicrobiana de extractos de hojas de *Agave angustifolia* Haw y su efecto sobre la calidad de hamburguesas de res. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora. 93p.

- Ren, H., Wu, X., Lyu, Y., Zhou, H., Xie, X., Zhang, X., & Yang, H. (2017). Selection of reliable reference genes for gene expression studies in *Botrytis cinerea*. *Journal of Microbiological Methods*, 142:71-75.
- Reyes-Quintana, C. K., Martínez-Carrera, D., Morales-Almora, P., Sobal-Cruz, M., Escudero-Urbe, A. H., & Ávila-Acevedo, J. G. (2014). Efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) en el crecimiento micelial de *Trichoderma*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 5(8):1433-1446.
- Rodríguez-Maturino, A., Troncoso-Rojas, R., Sánchez-Estrada, A., González-Mendoza, D., Ruiz-Sanchez, E., Zamora-Bustillos, R., Ceceña-Duran, C., Grimaldo-Juarez, O., & Aviles-Marin, M. (2015). Efecto antifúngico de extractos fenólicos y de carotenoides de chiltepín (*Capsicum annum* var) en *Alternaria* y *Fusarium oxysporum*. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(1):72-77.
- Salazar, C., Lagos, L. E., Díaz, V., Mora, S., & Betancourth, C. (2020). Caracterización de *Fusarium* spp. asociado con la pudrición basal de la cebolla de rama. *Actualidad & Divulgación Científica*, 23(1):1471.
- Salazar-Pineda, D., Castro-Alarcón, N., Moreno-Godínez, M. E., Nicasio-Torres, M. P., Pérez-Hernández, J., & Álvarez, P. (2017). Actividad antibacteriana y antiinflamatoria de extractos y fracciones de *Agave cupreata*. *Revista Internacional de Farmacología*, 13(8):1063-1070.
- Sánchez-García, B. M., Espinosa-Huerta, E., Villordo-Pineda, E., Rodríguez-Guerra, R., & Mora-Avilés, M. A. (2017). Identificación molecular y evaluación antagónica *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre hongos fitopatógenos de raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agrociencia*, 51(1):63-79.
- Santamaría-Gómez, J. M., Piloni-Martini, J., Quintero-Lira, A., Bernardino-Nicator, A., & Güemes, N. (2018). Compuestos fenólicos y actividad antioxidante antes y después del proceso de extrusión. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3:406-410.
- Santos, J., Branco A., Ferreira-Silva, A., Pinheiro, C., Góes-Neto, A., Uetanabaro, A., Queiroz, S. R., & Osuna, J. (2009). Antimicrobial activity of *Agave sisalana*. *African Journal of Biotechnology*, 8:6181-6184.

- Serrano, L., & Galindo, E. (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos: Un reto multidisciplinario. *Ciencia*, 58(1):77-88.
- Shegute, T., & Wasihun, Y. (2020). Antibacterial activity and phytochemical components of leaf extracts of *Agave americana*. *Journal of Experimental Pharmacology*, 12: 447-454.
- SIAP (2018). Maguey pulquero. Recuperado 25 de junio del 2024, de <https://www.gob.mx/siap/articulos/maguey-pulquero?idiom=es>
- Sreenivasa, M. Y., & Deepa, N. (2017). *Fusarium verticillioides*, a globally important pathogen of agriculture and livestock. *Journal of Veterinary Medicine and Research*, 4(4):1084.
- Syed Ab Rahman, S. F., Singh, E., Pieterse, C. M. J., & Schenk, P. M. (2018). Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 267:102-111.
- Talavera-Ortiz, A., Chaverri, P., Diaz-Godinez, G., Acosta-Urdapilleta, M. L., Villegas, E., & Tellez-Tellez, M. (2020). Inhibición micelial de *Trichoderma* spp. (*Hypocreaceae*) aislado del cultivo de *Pleurotus ostreatus* (*Pleurotaceae*) con un extracto de *Pycnoporus* spp. (*Polyporaceae*). *Acta Botanica Mexicana*, 127:1537.
- Terrones-Salgado, J., Nieto-Angel, D., Nava-Díaz, C., Téliz-Ortiz, D., García-Velasco, R., Vallejo-Pérez, M. R., & Sánchez-García, P. (2019). *Botrytis cinerea* causing gray mold in blackberry fruit in México. *Mexican Journal of Phytopathology*, 37(3):365-382.
- Tucuch-Pérez, M. A., Bojórquez-Vega, J. J., Arredondo-Valdes, R., Hernández-Castillo, F. D., & Anguiano-Cabello, J. C. (2021). Actividad biológica de extractos vegetales del semidesierto mexicano para manejo de *Fusarium oxysporum* de tomate. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 8(2):2745.
- Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., & Jaroszek-Ścisiel, J. (2022). *Trichoderma*: the current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4): 2329.
- Valencia-Botin, A. J., Gutiérrez-Lomelí, M., Morales-Del-Río, J. A., Guerrero-Medina, P. J., Robles-García, M. A., Ruiz-Cruz, S., Wong-Corral, F. J., Borboa-Flores, J., Rueda-

- Puente, E. O., & Del-Toro-Sánchez, C. L. (2018). Efecto inhibitorio de extractos *Vitex mollis* Kunth contra bacterias y especies de *Fusarium* de importancia humana y agrícola. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 41(4):353-363.
- Vázquez-Ramírez, L., & Cataño-Zapata, J. (2017). Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate (*Fusarium oxysporum*): una revisión. *Revista Actualidad & Divulgación Científica*, 20(2):363-374.
- Vera, M. E., & Ramírez, E. C. (2006). Reflexiones sobre el concepto de enfermedad y la praxis de su manejo en plantas. *Revista Luna Azul*, 23:38-4.
- Vivas-Carmona, L. (2017). El manejo integrado de plagas (mip): perspectivas e importancia de su impacto en nuestra región. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 5(2):67-69.
- Weiller, F., Schückel, J., Willats, W. G. T., Driouich, A., Vivier, M. A., & Moore, J. P. (2021). Tracking cell wall changes in wine and table grapes undergoing *Botrytis cinerea* infection using glycan microarrays. *Annals of Botany*, 128(5):527-543.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & Van Kan, J. L. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5):561-580.
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1):3-19.
- Zárate-Martínez, W., González-Morales, S., Ramírez-Godina, F., Robledo-Olivo, A., & Juárez-Maldonado, A. (2021). Efecto de los ácidos fenólicos en el sistema antioxidante de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.). *Agronomía Mesoamericana*, 32(3): 854-868.
- Zavaleta, E. (1999). Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. *Terra Latinoamericana*, 17(3):201-207.